UNIVERSITE LILLE 1 - SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Ecole Doctorale des Sciences de la Matière du Rayonnement et de l'Environnement

(ED-SMRE)

THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN SCIENCES

Option **: Ingénierie des fonctions biologiques**

Préparée au laboratoire ProBioGEM - UPRES EA 1026

Polytech'Lille, France

Hydrolyse ménagée de l'hémoglobine bovine par la pepsine porcine en mélanges hydro-alcooliques et obtention d'une nouvelle famille de peptides antimicrobiens

Par

Estelle Yaba ADJE

Sous la direction du Pr Naima NEDJAR-ARROUME

Soutenue le 21 octobre 2010 devant Jury composé de :

Naïma NEDJAR-ARROUME, Professeur, Laboratoire ProBioGEM, IUT « A » Lille1, France	Directrice
Didier GUILLOCHON, Professeur, Laboratoire ProBioGEM, Polytech'Lille1, France	Co-Directeur
Stéphanie BORDENAVE-JUCHEREAU, maître de conférences HDR, LIENSs ; université de la Rochelle	Rapporteur
Said BOUHALLAB, Directeur de Recherche INRA, Agrocampus Rennes	Rapporteur
Djamel DRIDER, Maitre de Conférences HDR, ONIRIS Nantes-Atlantique	Examinateur
Pascal DHULSTER, Professeur, Directeur du Laboratoire ProBioGEM, Polytech'Lille1, France	Président

DEDICACE

A mon père

et à ma mère

Estelle Y. ADJE

REMERCIEMENTS

« Ce n'est pas à nous, non, ce n'est pas à nous que revient la gloire mais à toi, pour ta bonté et ta fidélité ». Comment ne pas commencer par t'exprimer à toi qui m'a toujours tenu la main et qui a toujours été à mes cotés, ma profonde gratitude. Merci Seigneur pour tout.

Cet travail a été effectué au laboratoire de Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien (ProBioGEM) à Lille, grâce au financement du Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique, de la ***République de Côte d'Ivoire,*** *à qui je dis merci de m'avoir donné la chance de pouvoir faire de la recherche tout en bénéficiant des meilleurs équipements. Merci de m'avoir permis de passer cette grande étape de ma vie.*

Je tiens à exprimer toute ma gratitude et toute ma reconnaissance à ***Naïma NEDJAR-ARROUME*** *non seulement pour l'encadrement scientifique et la confiance accordée, mais aussi et surtout pour cette aventure humaine vécue, cet exemple de persévérance et de force de caractère. Merci pour ces conseils mère-fille, pour toute l'aide apportée et pour la chance que vous m'avez donné, de pouvoir enseigner et faire de la recherche avec diverses collaborations.*

Je tiens à exprimer tout particulièrement ma reconnaissance au Pr ***Didier GUILLOCHON,*** *du laboratoire ProBioGEM, d'avoir accepté de m'accueillir dans ce laboratoire. Merci très sincèrement pour cette grande aide scientifique, votre sympathie et votre humour.*

Merci à vous, Pr ***Pascal DHULSTER,*** *responsable du laboratoire ProBioGEM, d'avoir bien voulu prendre le temps de juger ce travail et d'en être l'examinateur. Merci pour l'aide technologique et pédagogique.*

Merci au Pr ***Said BOUHALLAB,*** *Directeur de Recherche INRA, Agrocampus à Rennes et à* ***Stéphanie BORDENAVE-JUCHEREAU,*** *maître de conférences HDR, du laboratoire LIttoral ENvironnement et SocietéS, à l'université de la Rochelle qui ont accepté, avec beaucoup d'amabilité, de juger ce travail en prenant la responsabilité d'en être les rapporteurs.*

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux à ***Djamel DRIDER,*** *Maitre de Conférences HDR, à 0NIRIS, L'Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation de*

Nantes-Atlantique, d'avoir bien voulu examiner cette thèse. Je vous remercie pour la sympathie que vous m'avez toujours témoignée.

Un très grand merci au ***Dr Mostafa Kouach,*** *Ingénieur de Recherche au Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses "CUMA" de la Faculté de Pharmacie. Merci pour ta disponibilité, ta bonne humeur, merci pour tous ces très beaux moments vécus au sein de l'équipe de spectrométrie. Merci pour tous ces cafés très chaleureux et ces anniversaires. Merci pour tous tes conseils et ton soutien. Un grand merci à Brigitte et à toute l'équipe pour l'ambiance, la bonne humeur et le soutien moral.*

Merci à ***Gerard Defives*** *et à toute l'équipe du laboratoire RMN de l'institut pasteur de Lille. Pour votre disponibilité et votre gentillesse.*

Je tiens à dire merci à ***tous les membres permanents du laboratoire ProBioGEM*** *pour leur sympathie, leur gentillesse, leur soutien et leur disponibilité.*

J'adresse tout particulièrement mes remerciements au Pr. ***Dominique Vercaigne*** *pour l'aide accordée, pour sa disponibilité et ses conseils. Vous m'avez toujours ouvert la porte chaque fois que j'en avais besoin.*

Un grand merci à tout le personnel du département de génie Biologique de l'IUT « A ». Je pense particulièrement à ***Chantal Lefèvre****, qui a toujours été très compréhensive et qui m'a toujours aidé chaque fois qu'il le fallait. Merci au* ***Dr Eliane Aïssi*** *pour son soutien, sa simplicité et sa gentillesse.*
Merci à Monsieur ***Patrice Mary*** *pour m'avoir accueilli dans son département.*

Mes remerciements vont aussi à l'endroit de tous mes amis du laboratoire. Je pense particulièrement aux techniciens du laboratoire ***Estelle Hamon, Laurent, Rattana****. Je pense à tous les doctorants, post doctorants et ATER,* ***Omar, Layal, Mathieu, Aurelien, Arthur, Lucie, Angelique, Sameh, Walaa, Joany, François, Jovana, Pascal Tankam, Marwan, Pauline****. Merci à* ***Rafik, Robert, Ali****. Merci pour tous ces moments très agréables vécus, pour cette grande aventure humaine. Merci pour les fous rires, pour l'ambiance, la bonne humeur. Merci à tous pour votre soutien et votre aide. Un grand merci à tous les stagiaires du laboratoire, pour leur aide technique. Je pense spécialement à l'équipe de Hand-ball de ProBioGEM malgré sa courte durée de vie.*

Ces quatre années de thèse n'auraient pas été possibles, sans le soutient infaillible de toute ma famille, de mes parents qui bien qu'étant à plus de 7000 kilomètres demeuraient quotidiennement à mes cotés. Merci à mes frères, ***Herman-n, Narcisse*** *et* ***Serge****. Merci à ma grande sœur* ***Sandrine*** *et aux deux mousquetaires* ***Josiane*** *et* ***Armelle****. Votre soutien et votre aide ont été le moteur m'ayant permis d'arriver jusqu'au bout. Mention spéciale à* ***Armelita*** *et* ***Johoo****, on continue la course !!!. Merci à toute la grande famille* ***ADJE.***

Sincèrement merci à tous mes amis qui ont vécu cette thèse à part entière. Merci à ***Djasmine Cyrielle****, et* ***Julie (blonde)****. Merci spécialement à* ***Karen KOFFI*** *et à* ***Fanfy*** *pour votre soutien, votre confiance, votre présence dans les bons ou les mauvais moments. Merci à toi* ***Gaëtan VANFRAECHEM****, pour m'avoir soutenu dans les premiers moments de cette thèse, Merci d'avoir écouté mes « Histoires du labo » ; merci pour ton implication dans mon après thèse ; merci d'avoir été présent. Merci à toi* ***Yahaya SYLLA****, pour tout le soutien que tu ne cesses de me témoigner chaque jour que Dieu fait. Merci de m'avoir aidé à la rédaction de cette thèse, merci pour tout.*

Merci à tous ceux qui demeurent à mes cotés.

Merci à tout ceux que j'ai eu la chance de rencontrer et qui m'ont témoigné leur sincère amitié. Vous resterez à jamais gravés dans mon cœur.

Table des matières

DEFINITIONS ET ABREVIATIONS **10**

LISTE DES FIGURES **11**

LISTE DES TABLEAUX **15**

LISTE DES PHOTOS **17**

INTRODUCTION GENERALE **18**

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES **24**

I- Structures de l'hémoglobine bovine 25

I.1- Structure primaire de l'hémoglobine bovine 25

I.2- Structure secondaire de l'hémoglobine bovine 27

I.3- Structure tertiaire de l'hémoglobine bovine 29

I.4- Structure quaternaire de l'hémoglobine bovine 30

II- La méthémoglobine et la carboxyhémoglobine 32

- La Méthémoglobine : 32
- La carboxyhémoglobine 32

III- La pepsine porcine 32

IV- Effet du milieu sur la structure de l'hémoglobine 35

IV.1- Effet de quelques agents physiques 35

- La température 35
- Le pH 36

IV.2- Effet de quelques agents chimiques 36

- L'urée 36
- Les alcools 37
- Effet des alcools sur l'hydrolyse protéique 38
- Les sels 38

V- Les agents chimiques utilisés pour l'étude des structures protéiques ou peptidiques : 39

- Le DMSO 39
- TFE 40

VI- Méthodes d'étude des structures de protéines : cas de l'hémoglobine 41

VI.1- Méthode d'étude des structures secondaires de l'hémoglobine 42

VI.2- Méthodes d'étude de la structure tertiaire des protéines 42

VI.3- Etude des variations structurales protéiques sans identification du niveau structural 44
➢ La spectrophotométrie et la spectrofluorimétrie 44
➢ La spectrométrie de masse 46
VII- Intérêt des peptides issus de l'hydrolyse enzymatique 46
VIII- Peptides actifs issus de l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine 49
IX- Activité biologique: Peptides antimicrobiens 53
IX.1- Caractéristiques des peptides antimicrobiens 54
IX.2- Etapes de l'action des peptides antimicrobiens 56

MATERIELS ET METHODES 62

I- Hydrolyse de l'hémoglobine bovine 63
I.1- Préparation et dosage de la solution d'hémoglobine native 63
a- Préparation de la solution mère d'hémoglobine bovine 63
b- Dosage de l'hémoglobine par le réactif de Drabkin 63
I.2- Préparation des solutions d'hémoglobine dénaturée 1% et 2% 64
II- Préparation de la solution de pepsine porcine et dosage de l'activité enzymatique….. 65
III- Hydrolyse de l'hémoglobine bovine en conditions natives et dénaturantes 65
III.1- Hydrolyse de l'hémoglobine sans solvant : conditions natives 65
III.2- Hydrolyse de l'hémoglobine en présence de solvants 66
III.3- Hydrolyse de l'hémoglobine bovine en conditions dénaturantes 66
IV- Détermination du degré d'hydrolyse par la méthode de l'OPA 67
V- Analyses structurales 67
V.1- La spectrofluorimétrie 68
V.2- La spectrophotométrie 68
V.3- Le dichroïsme circulaire 69
VI- Analyse des hydrolysats pepsique d'hémoglobine bovine 72
VI.1- Analyse des peptides par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) 72
VI.2- Identification des peptides par la spectrométrie de masse 73
VI.3- Couplage LC/MS 75
VII- Tests antimicrobiens 76

VII.1- Mise en évidence de l'activité antimicrobienne : Technique modifiée de l'antibiogramme 76

VII.2- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) 78

RESULTATS ET DISCUSSION 81

Chapitre 1: **Obtention de peptides potentiellement actifs et amelioration de l'obtention de ces peptides..... 81**

I- Hydrolyse pepsique de l'hémoglobine en milieu aqueux 82

I.1- Effet du pH sur la conformation de l'hémoglobine 82

a- Etude structurale de l'hémoglobine par spectrofluorimétrie 83

b- Etude structurale de l'hémoglobine par spectrophotométrie UV-visible 85

c- Etude structurale de l'hémoglobine par le dichroïsme circulaire 87

I.2- Hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine à pH 5,5 91

II- Hydrolyse de pepsique de l'hémoglobine en milieu hydroalcoolique 97

II.1- Hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine en présence de TFE..... 97

II.2- Etude comparative des hydrolysats en absence et en présence de TFE 101

III- Amélioration de l'obtention des peptides intermédiaires et hydrophobes 105

III.1- Hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine en présence de méthanol, d'éthanol, de propanol ou de butanol 105

III.2- Stabilité de l'activité pepsique en présence des alcools aux concentrations choisies 120

Conclusion……..……124

Chapitre 2**: Effets des melanges hydro-alcooliques sur la structure de l'hemoglobine bovine et sur l'hydrolyse pepsique..... 124**

I- Etude des variations structurales de l'hémoglobine par spectrofluorimétrie..... 126

II- Etudes structurales de l'hémoglobine par spectrophotométrie UV-Visible 128

III- Etudes structurales de l'hémoglobine par dichroïsme circulaire 130

Conclusion……..……137

Chapitre 3**: Identification et caracterisation des peptides issus des hydrolysats : etudes comparatives et obtention d'une nouvelle famille peptidique..... 137**

I- Peptides issus de l'hydrolysat à faible degré d'hydrolyse : Conséquences de l'utilisation des alcools 138

I.1- Analyse comparative des peptides obtenus en absence et en présence de solvants : mise en évidence des domaines de flexibilité de l'hémoglobine 142

I.2- Impact de la présence des solvants sur l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine 149

I 3- La famille α 67-106 : Une nouvelle famille peptidique..... 151

II- Peptides issus de l'hydrolysat après 24h d'hydrolyse..... 152

Conclusion……..……155

Chapitre 4 **: Mise en evidence de l'activite antimicrobienne : interet des peptides obtenus en milieu hydroalcoolique..... 155**

I- Mise en évidence des activités biologiques des fractions peptidiques issues de l'hydrolysat obtenu en milieu hydro alcoolique 156

II- Analyse de l'activité antimicrobienne de peptides issus de la famille α 67-106 : effet bactéricide ou bactériostatique ?..... 163

Conclusion……..……166

Chapitre 5 : **Autre activité induite par la famille α 67-106 : inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine..... 166**

I- Rappels bibliographiques..... 167

II- Mise en évidence de l'activité anti hypertensive 168

III- Activité antihypertensive de la famille alpha 67-106 170

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES..... 172

***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:* 176**

***LISTE DES ANNEXES ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES*..... 200**

***ANNEXES* 202**

DEFINITIONS ET ABREVIATIONS

Annémies ferriprives : Annemie due à une carence des réserves en fer de l'organisme

Constante diélectrique : elle caractérise la permittivité du solvant et indique la capacité d'un solvant à séparer les charges. elle augmente le pouvoir dissociant.

Cosolvant : Solvant rajouté en petite quantité à un solvant principal en vue d'en modifier les propriétés.

Ectoenzyme : ou exoenzyme : Toute enzyme fabriquée par une cellule, puis qui est exportée et agit à l'extérieur de cette cellule. Les exemples sont très nombreux, notamment au niveau des enzymes digestives. Ex. l'amylase, qui hydrolyse les molécules d'amidon à l'extérieur de la cellule.

Peptide amphiphile : Enchainement d'acides aminés composés de groupements hydrophiles et hydrophobes

pHi = pi = pH isoélectrique : pH où une molécule est sous sa forme zwitterionique ou ion mixte, sa charge globale étant alors nulle.

Psi: Pour « pound per square inch », livre par pouce carré

Random coil: Conformation en pelote statistique non périodique présente lorsque la conformation locale d'un segment protéique ne correspond à aucune des structures secondaires connues.

Salting "out": Précipitation d'une protéine en solution aqueuse due à la présence d'une forte concentration en sel, empêchant l'hydratation de celle-ci.

Salting "in": Augmentation de la solubilité d'une protéine en solution saline liée à des interactions électrostatiques

UA : Unité Anson ; quantité d'enzyme qui sous des conditions standards produit un milliéquivalent Tyrosine par minute à partir d'hydrolysat de l'hémoglobine soluble dans l'acide trichloracétique.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Réactions de l'hème avec l'oxygène

Figure 2 : Structures secondaires de la chaîne alpha (a) et béta (b) de l'hémoglobine bovine.

Figure 3 : Structure quaternaire de l'hémoglobine bovine

Figure 4: Conformation quaternaire de l'hémoglobine bovine (Lehninger, A. L; 2000).

Figure 5 : Structure quaternaire (à gauche) et caractéristiques de la séquence peptidique (à droite) de la pepsine porcine.

Figure 6 : Nomenclature Schechter et Berger (1967) pour la description des sites de la protéase

Figure 7 : Descriptif du modèle « barrel stave » et du model « carpet » (Duclohier H., 2006).

Figure 8 : Modèle de Shai-Matsuzaki-Yang. (Zasloff. 2002)

Figure 9 : Mécanisme en Coarse grain molecular dynamics. (Lopez *et al.,* 2006)

Figure 10: Spectres de dichroïsme de polypeptides en hélices alpha, en feuillet béta, en random coil ou riche en un seul acide aminé tel que la proline (Brahms et Brahms, 1980).

Figure 11 : Descriptif d'un appareil de CLHP

Figure 12 : Descriptif d'un spectromètre de masse

Figure 13 : Source Electrospray/Ionspray

Figure 14 : Principe de la détermination de la CMI à T_{24h}

Figure 15 : Descriptif des effets d'un agent antimicrobien sur une population bactérienne.

Figure 16 : Spectres de fluorescence de l'hémoglobine bovine (3µM) en milieu tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1M à différents pH (3 ; 4,5 ; 5,5 ; 6,8) et à l'état dénaturé par l'urée 6 M.

Figure 17: Spectres d'absorption de l'hémoglobine bovine (3µM) en milieu tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1M à différents pH (3 ; 4,5 ; 5,5 et 6,8). a) spectre de 200-700 ; b) de 450-700 nm

Figure 18 : Spectres de dichroïsme circulaire de l'hémoglobine bovine de 200-250 nm en milieu tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1M à différents pH (3 ; 4,5 ; 5,5 et 6,8) et a l'état dénaturée (urée 6M).

Figure 19 : Spectres de dichroïsme circulaire de l'hémoglobine bovine de 245-595 nm en milieu tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1M à différents pH (3 ; 4,5 ; 5,5 et 6,8) et à l'état dénaturée (urée 6M).

Figure 20 : Profils chromatographiques (a) et (b) de la cinétique d'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine native 1% (p/v) à pH 5,5 et à 23°C

Figure 21 : Profils chromatographiques (a) et (b) de la cinétique d'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine dénaturée 1% (p/v) par l'urée 6M à pH 5,5 et à 23°C.

Figure 22 : Etude de la stabilité de l'activité enzymatique de la pepsine en absence et en présence de concentrations variables de TFE (10, 20, 30 et 50%).

Figure 23 : Spectre de fluorescence de la pepsine en présence de TFE à concentrations variables

Figure 24: Spectre d'absorbance de la pepsine en présence de TFE à concentrations variables (10, 20, 30 et 50 % v/v)

Figure 25 : Profils chromatographiques (a) et (b) de la cinétique d'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine en présence de 10% de TFE (v/v) à pH 5,5 et à 23°C.

Figure 26 : Etude comparative des hydrolysats de 2,5 min en présence des alcools à concentration variable. La zone de présence des peptides intermédiaires est délimitée par des traits discontinus.

Figure 27 : Récapitulatif des hydrolysats effectuée à un dégrée d'hydrolyse identique et faible (DH= 1% correspondant à un temps d'hydrolyse de 2,5 min) en présence d'alcools.

Figure 28 : Cinétique d'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine pH 5,5 à 23°C en présence de méthanol 40% (a), d'éthanol 30% (b), de propanol 20% (c) et de butanol 10% (d). Volume d'injection= 50µl

Figure 28 : Cinétique d'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine pH 5,5 à 23°C en présence de méthanol 40% (a), d'éthanol 30% (b), de propanol 20% (c) et de butanol 10% (d). Volume d'injection= 50µl

Figure 29 : Profils comparatifs des hydrolysats 2,5 min de 10 à 40 min (a) et 24 h (b) de l'hémoglobine bovine pH 5,5 à 23°C en absence ou en présence de solvant.

Figure 30 : Etude de la stabilité de l'activité enzymatique de la pepsine en absence et en présence de concentrations variables de méthanol, d'éthanol, de propanol et de butanol

Figure 31 : Spectres d'absorption de la pepsine de porc (17µM) en milieu tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1M en présence d'alcools

Figure 32 : Spectre de fluorescence de la pepsine (11,2 µM) à pH 5,5 en présence ou en absence d'alcool.

Figure 33: Spectre de fluorescence de l'hémoglobine bovine (3µM) à pH 5,5 en absence de solvants (0%), en présence d'urée 6M et en présence de 40% de méthanol, 30% d'éthanol, 20% de propanol ou de 10% de butanol (v/v) (a) et graphique des constantes diélectriques des milieux d'étude (b).

Figure 34 : Spectre d'absorbance UV-Visible de l'hémoglobine bovine (3µM) à pH 5,5 en absence de solvants (0%), en présence d'urée 6M et en présence de 40% de méthanol, 30% d'éthanol, 20% de propanol ou de 10% de butanol (v/v)

Figure 35: Dichroïsme circulaire de l'hémoglobine bovine (3 µM) en présence d'alcools, sous forme native et dénaturée dans du tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1 M pH 5,5

Figure 36 : Dichroïsme circulaire de l'hémoglobine bovine (18,6 µM) en présence d'alcools, sous forme native et dénaturée dans du tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1 M pH 5,5

Figure 37 : Cartographie peptidique de l'hydrolysat pepsique de l'hémoglobine bovine native à pH 5,5, DH=1%

Figure 38 : Cartographie peptidique de l'hydrolysat pepsique de l'hémoglobine à pH 5,5 en présence d'alcool DH=1%.

Figure 39 : Localisation du domaine α 1-30

Figure 40 : Cartographie peptidique de l'hydrolysat pepsique de l'hémoglobine bovine à pH 5,5, après 24h

Figure 41 : Profil chromatographique de l'hydrolysat à DH=1% en présence d'alcool présentant les différentes fractions.

Figure 42: Représentation du Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (SRAA)

Figure 43 : Régression linéaire du pourcentage d'inhibition de l'ECA en fonction de la concentration peptidique

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Récapitulatif de la composition en acides aminés de la chaîne alpha de l'hémoglobine bovine.

Tableau 2: Récapitulatif de la composition en acides aminés de la chaîne béta de l'hémoglobine bovine.

Tableau 3 : Récapitulatif des propriétés de la pepsine porcine

Tableau 4 : Récapitulatif des longueurs d'ondes caractéristiques des différentes formes de l'hémoglobine

Tableau 5 : Peptides bioactifs isolés d'hydrolysats protéiques d'origine animale ou végétale

Tableau 6 : Peptides actifs issus de l'hémoglobine bovine

Tableau 7 : Données statistiques du nombre de peptides à activités variables existant dans la banque de donnés des peptides antimicrobiens

Tableau 8 : Gamme Etalon de leucine

Tableau 9 : Intensité d'absorption des cultures bactériennes après incubation.

Tableau 10 : Localisation des peptides intermédiaires dans les hydrolysats pepsique de l'hémoglobine bovine en présence d'alcools.

Tableau 11: Etude comparatives des peptides obtenus dans les différents hydrolysats après un temps d'hydrolyse de 2,5 min.

Tableau 12: Masse moléculaire, séquences peptidiques, pourcentage d'hydrophobie et charge globale des peptides issus de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine native par la pepsine en absence d'alcool.

Tableau 13: Masse moléculaire, séquences, pourcentage d'hydrophobie et charge globale des peptides issus de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine en présence d'alcools (40% méthanol, 30% éthanol, 20% propanol or 10% butanol).

Tableau 14 : Etude comparative des spécificités de coupure primaires de la pepsine en début d'hydrolyse (DH= 1%)

Tableau 15 : Activité antimicrobienne de fractions issues de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine en présence de 10% de butanol.

Tableau 16 : Activité antimicrobienne de fractions issues de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine en présence de 10% de butanol.

Tableau 17 : CMI des peptides contenus dans les fractions issues de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine en présence de 10% de butanol.

Tableau 18: CMI des peptides issus de la famille α 67-106

Tableau 19: Taux de mortalité induit par les peptides issus de la famille α 67-106

Tableau 20: Caractéristiques des peptides purs

Tableau 21 : CI_{50} des peptides purs

LISTE DES PHOTOS

Photo 1 : Chaîne CLHP

Photo2: Boite de pétri présentant des zones d'inhibition. La souche testée est *Staphilococcus aureus.*

INTRODUCTION GENERALE

Depuis la mise en évidence d'une activité opiacée d'un hydrolysat du gluten par Zioudrou *et al.,* (1979), la recherche de peptides actifs à partir d'hydrolysats de protéines alimentaires constitue une voie très attractive pour le développement de nouvelles molécules. A ce jour, de nombreux peptides actifs ont été obtenus à partir d'hydrolysats protéiques. Ces peptides, avec des activités diverses, peuvent intervenir dans des domaines très variées : aliments santé, pharmaceutique, cosmétique,... Les peptides actifs obtenus par hydrolyse protéique possèdent des caractéristiques très variées.

Parmi ces peptides actifs, les peptides amphiphiles, de charge globale positive et de taille moyenne (10-40 acides aminés), capables d'adopter une structure secondaire s'avèrent être très intéressants. En effet, ces molécules sont connues comme possédant des propriétés intéressantes employées dans divers domaines, telle que la diététique médicale pour la prévention des anémies ferriprives (Erickson, 1981), grâce à leur capacité de transport de la protoporphirine IX (Cempel *et al.,* 1995) et de l'hème (Lebrun *et al.,*1998).

L'abondance des données récentes sur les peptides préférentiellement structurés en hélice α, actifs dans la translocation, l'ancrage (peptides signaux) et la lyse membranaire (peptides cytoliques du type de la mélinite), peut être exploitée dans le domaine de la santé. Les propriétés interfaciales de ce type d'oligopeptides ainsi que leur capacité d'interaction avec les phospholipides sont intéressants pour la formulation de mousses, d'émulsions, de films et peuvent être utilisés dans le secteur alimentaire.

Dans le domaine pharmaceutique, les peptides offrent plusieurs avantages par rapport aux petites molécules que constituent les médicaments traditionnels (Decaffmeyer *et al.,* 2008). Le premier avantage est que, représentant souvent la plus petite partie fonctionnelle d'une protéine, ils offrent une efficacité, une sélectivité et une spécificité que les concepteurs de petites molécules ont du mal à atteindre (Hummel *et al.*, 2006).

Un deuxième avantage, et non des moindres, est que les produits de dégradation des peptides sont des acides aminés, ce qui élimine grandement les risques de toxicité (Loffet, 2002). Troisièmement, les peptides s'accumulent peu dans les tissus en raison de leur temps de demi-vie court. Toutefois, cela constitue aussi un désavantage quant à la durée d'action.

De plus, les peptides amphiphiles sont une classe de molécules qui combinent les caractéristiques structurelles des tensioactifs avec les fonctions de peptides bioactifs. Ces

propriétés sont aujourd'hui beaucoup exploitées dans le domaine des nanostructures. A cet effet, un type spécifique de peptides amphiphiles sont connus pour s'auto-assembler dans une dimension de nanostructures et ce, dans les conditions physiologiques. Cette auto assemblage les rend hautement bioactifs. Ces peptides sont donc d'un grand intérêt pour de nombreuses applications biomédicales, y compris l'ingénierie tissulaire, la médecine, de régénération et de délivrance de médicaments (Cui *et al.,* 2010).

En plus de ces précédentes potentialités, ces peptides amphiphiles sont aussi connus comme étant doués d'activité antimicrobienne. En effet, les peptides antimicrobiens sont généralement amphiphiles, capables d'adopter une structure secondaire en hélice, de charge globale positive à pH neutre et sont constitués de 10-40 résidus d'acides aminés, comprenant 40-50% de résidus hydrophobes (Hancock R. E., 1997 ; Hwang et Vogel, 1998 ; Yeaman et Yount, 2003). Ces peptides ont un large spectre d'activité, car étant capables de neutraliser de nombreuses bactéries gram négatives (gram-) et gram positives (gram +), y compris certaines souches résistantes aux antibiotiques ainsi que de nombreux champignons, virus et parasites (Hancock R. E., 2001).

L'utilisation des peptides antimicrobiens est donc promise à un grand avenir, notamment afin de contrer la perte d'efficacité des antibiotiques classiques (Gordon *et al.,* 2005 ; Marr *et al.*, 2006). De plus, depuis plus d'une trentaine d'année aucune nouvelle famille d'antibiotique n'a encore été découverte (Zinner S.H., 2007). Ils peuvent donc constituer une source d'inspiration pour concevoir les nouveaux antibiotiques de demain (Hancock et Sahl, 2006).

Notre laboratoire s'intéresse donc à la production de peptides amphiphiles à activité antimicrobienne à partir d'hydrolysats de protéines alimentaires telle que l'hémoglobine bovine.

Grâce aux hydrolyses pepsiques réalisées au sein du laboratoire (Nedjar-Arroume *et al.,* 2008 et 2006 ; Froidevaux *et al.,* 2001 ; Lebrun *et al.,* 1998,…), l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine peut aujourd'hui être considérée comme une grande source de ces peptides antimicrobiens. Les caractéristiques des peptides issus de l'hydrolyse de l'hémoglobine sont fortement dépendantes du mécanisme d'hydrolyse mis en jeu.

Selon l'état structural initial de l'hémoglobine, deux principaux mécanismes d'hydrolyse ont précédemment été décrit par Linderstrom-Lang en 1953 :

Sous sa forme native (sans aucune modification structurale), l'hémoglobine est immédiatement hydrolysée en peptides de petites tailles. La protéase dégrade une molécule d'hémoglobine à la fois. Dans ce cas, l'hydrolysat obtenu n'est composé que d'une partie de l'hémoglobine intacte et de peptides finaux. Il ne contient aucune quantité appréciable de peptides intermediaires. Ce mécanisme d'hydrolyse est dit de type « one by one ».
Par contre, sous sa forme dénaturée (avec de fortes modifications structurales), en début d'hydrolyse, la protéase procède à une conversion immédiate de l'hémoglobine en peptides intermédiaires de plus grandes tailles. Il s'en suit donc un clivage progressif (par étapes) des intermédiaires formés. Ce mécanisme d'hydrolyse est dit de type « zipper ».

Les procédés d'hydrolyse précédemment mis en jeu en vue de l'obtention des peptides antimicrobiens, impliquaient une dénaturation totale de l'hémoglobine. Cette dénaturation suivant un mécanisme d'hydrolyse de type « zipper », aboutit à un mélange peptidique très complexe comprenant plus d'une centaine de peptides. Parmi lesquels les peptides antimicrobiens sont pour la plupart des peptides intermédiaires produits au cours de l'hydrolyse. Ces peptides purifiés, ont montré une activité vis à vis des souches bactériennes gram + ou gram-. Toutefois, l'isolement de ces peptides d'intérêt s'est avéré très difficile compte tenu de la complexité du mélange obtenu, suite au processus d'hydrolyse appliqué.

Afin d'améliorer l'obtention de ces peptides, leur isolement, ne doit plus être guidé par le hasard, comme ce fut le cas jusqu'à présent. L'orientation de l'hydrolyse vers la formation de ces peptides intermédiaires par la réalisation d'une hydrolyse contrôlée et limitée, c'est à dire une hydrolyse ménagée, permettrait une production plus aisée et constituerait le point de départ pour l'obtention de meilleurs rendements d'extraction.

Cette hydrolyse ménagée peut être effectuée en milieu aqueux ou non. L'hydrolyse contrôlée en milieu aqueux n'ayant pas conduit à des résultats satisfaisants, a constitué la première approche de nombreuses études scientifiques.

Par contre, l'utilisation d'un milieu non aqueux a montré que l'ajout de solvants organiques auraient un effet sur la sélectivité de protéases telle que la pepsine dans le cas de l'hydrolyse de divers autres protéines (Welinder, 1988 ; Dalgalarrondo *et al.,* 1993 ; Brigitte Lignot 1998,…).

L'objectif principal de cette thèse a été de trouver à partir du système hémoglobine/pepsine, les meilleures conditions d'hydrolyse permettant l'obtention d'un hydrolysat moins complexe et enrichi en peptides actifs connus ou nouveaux. L'activité biologique principalement recherchée étant celle antimicrobienne, cette recherche cible donc l'obtention de peptides intermédiaires amphiphiles, de taille moyenne (10-40 acides aminés), de charges globales positives, capables d'adopter une structure secondaire.

La stratégie adoptée a été l'utilisation de solvants structurants. Ces solvants sont connus dans la littérature comme étant capables d'induire la formation de structures secondaires ou de faire varier la structure tertiaire des protéines. L'utilisation de ces solvants permettra d'induire, au cours de l'hydrolyse, des modifications structurales de l'hémoglobine autres que celles présentes à l'état natif ou à l'état dénaturée. Ceci, en vue d'aboutir à une hydrolyse ménagée de l'hémoglobine bovine.
Il s'agit notamment d'alcools primaires tels que le 2, 2, 2-TriFluoroEthanol (TFE), le méthanol, l'éthanol, le propanol ou le butanol.

L'élaboration d'un système enzymatique satisfaisant passe d'abord par la connaissance de tous les paramètres impliqués dans ce système et la compréhension de tous les phénomènes associés. C'est pour cela que dans un premier temps, un rappel bibliographique est effectué. Ce rappel bibliographique porte sur le modèle d'étude (hémoglobine bovine/pepsine porcine), sur l'effet des variantes impliquées dans l'hydrolyse enzymatique vis-à-vis de la structure protéique. Il porte aussi sur l'élaboration d'un bilan des hydrolyses protéiques, notamment des hydrolyses de l'hémoglobine et des peptides actifs précédemment obtenus.

Une section matériels et méthodes, suivra ce rappel bibliographique afin d'énumérer et de décrire les outils ayant permis de réaliser cette étude.

Dans un troisième temps les résultats obtenus porteront d'abord dans un premier chapitre, sur la mise en place du système c'est-à-dire du milieu adéquat favorisant l'hydrolyse contrôlée de l'hémoglobine par la pepsine. Puis, dans un second chapitre, nous tenterons par des études structurales, d'expliquer les mécanismes d'hydrolyse mis en jeu. Ensuite, dans un troisième chapitre, nous identifierons, caractériserons et effectuerons une étude comparative de tous les peptides obtenus en fonction des mécanismes d'hydrolyse impliqués. La mise en évidence d'une nouvelle famille peptidique, une des conséquences de l'hydrolyse dans ce milieu hydro

alcoolique sera aussi effectuée. Dans un quatrième chapitre nous mettrons en évidence l'activité antimicrobienne de tous les peptides obtenus grâce à ce nouveau milieu d'hydrolyse et enfin dans un dernier chapitre nous mettrons également en évidence une autre activité biologique, la capacité d'inhibition de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine (ECA) de cette nouvelle famille peptidique.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I- Structures de l'hémoglobine bovine

L'hémoglobine, de masse moléculaire 64500 Da, est la protéine majoritaire du sang dont la fonction principale est le transport de l'oxygène. Elle est composée de quatre chaînes polypeptidiques renfermant chacune un groupement prosthétique : l'hème.

L'hème est un complexe tétrapyrrolique de fer ferreux. La liaison de l'oxygène (O_2) à l'hémoglobine forme l'oxyhémoglobine et l'O_2 se fixe au niveau du fer Fe^{2+} de l'hème entrainant un changement conformationnel du complexe. Le changement de conformation de l'hème suite à l'oxygénation entraîne aussi une modification de la conformation protéique (schéma 1).

La partie protéique de l'hémoglobine est appelée globine ou apoprotéine et est constituée de deux chaînes alpha (ou chaînes α) identiques et de deux chaînes béta (ou chaînes β) identiques.

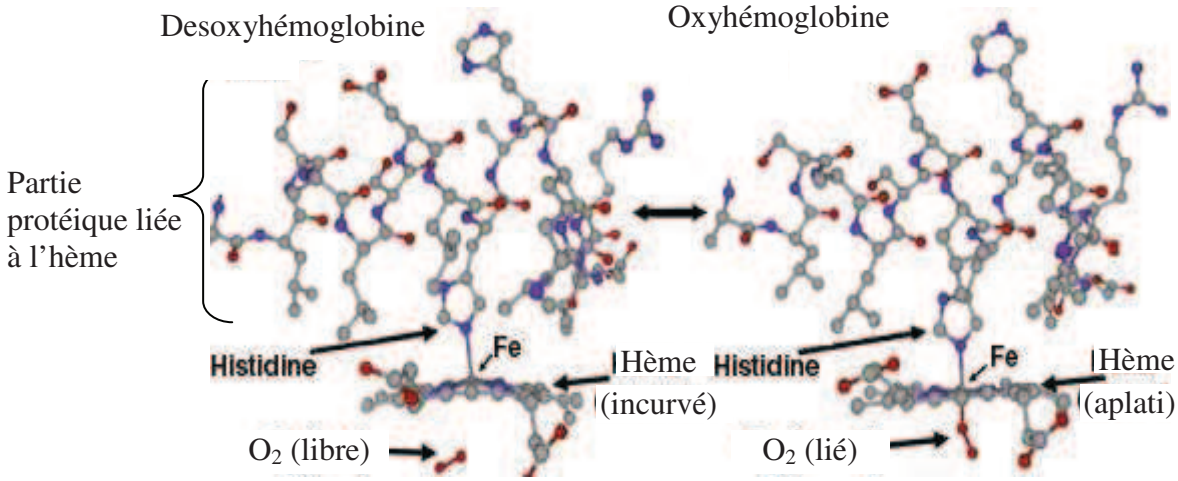


Figure 1 : Réactions de l'hème avec l'oxygène (Markham *et al.*, 2007).

I.1- Structure primaire de l'hémoglobine bovine

La structure primaire est représentée par l'enchaînement des acides aminés liés les uns aux autres par des liaisons covalentes (liaisons peptidiques).

- La chaîne alpha :

La première séquence a été proposée en 1967 par Schroeder *et al.,* à partir de l'hémoglobine fœtal bovin. La chaîne alpha de hémoglobine adulte bovin est composée de 141 acides aminés dont, 76 sont hydrophobes (non polaires), 52 hydrophiles (polaires) et 13 faiblement polaires. Son poids moléculaire est de 15053,1 Da et son point isoélectrique théorique est de 8,19. Le récapitulatif du pourcentage des différents acides aminés (tableau 1) montre que la chaîne alpha est constituée à majorité de leucine et d'alanine. Le nombre total de résidus chargés négativement (Asp/Glu) est de 13 et celui des résidus chargés positivement (Arg/Lys) est de 14.

Tableau 1 : Récapitulatif de la composition en acides aminés de la chaîne alpha de l'hémoglobine bovine.

Acides aminés	Quantité	Pourcentage
Ala (A)	20	14,20%
Arg (R)	3	2,10%
Asn (N)	3	2,10%
Asp (D)	8	5,70%
Cys (C)	0	0%
Gln (Q)	1	0,70%
Glu (E)	5	3,50%
Gly (G)	9	6,40%
His (H)	10	7,10%
Ile (I)	0	0%
Leu (L)	20	14,20%
Lys (K)	11	7,80%
Met (M)	1	0,70%
Phe (F)	7	5%
Pro (P)	6	4,30%
Ser (S)	13	9,20%
Thr (T)	8	5,70%
Trp (W)	1	0,70%
Tyr (Y)	3	2,10%
Val (V)	12	8,50%

La séquence de la chaîne alpha se présente comme suit :

^{1}VLSAADKGN ^{10}VKAAWGKVGG
^{20}HAAEYGAEAL ^{30}ERMFLSFPTT
^{40}KTYFPHFDLS ^{50}HGSAQVKGHG
^{60}AKVAAALTKA ^{70}VEHLDDLPGA
^{80}LSELSDLHAH ^{90}KLRVDPVNFK
^{100}LLSHSLLVTL ^{110}ASHLPSDFTP
^{120}AVHASLDKFL
^{130}ANVSTVLTSK
^{140}YR

- La chaîne béta

Elle est composée de 145 acides aminés dont 82 hydrophobes, 55 hydrophiles et 8 acides aminés faiblement polaires. Le nombre total de résidus chargés positivement ou négativement est identique (17 acides aminés). Le poids moléculaire est de 15954,3 Da. Son point isoélectrique théorique est de 7,02.

Tableau 2: Récapitulatif de la composition en acides aminés de la chaîne béta de l'hémoglobine bovine.

Acides aminés	Quantité	Pourcentage
Ala (A)	14	11,00%
Arg (R)	4	2,80%
Asn (N)	7	4,80%
Asp (D)	9	6,20%
Cys (C)	1	0,70%
Gln (Q)	3	2,10%
Glu (E)	8	5,50%
Gly (G)	11	7,60%
His (H)	6	4,10%
Ile (I)	0	0%
Leu (L)	17	11,70%
Lys (K)	13	9,00%
Met (M)	3	2,10%
Phe (F)	10	7%
Pro (P)	4	2,80%
Ser (S)	5	3,40%
Thr (T)	6	4,10%
Trp (W)	2	1,40%
Tyr (Y)	2	1,40%
Val (V)	18	12,40%

La séquence de la chaîne bêta se présente comme suit :

^{1}MLTAEEKAA ^{10}VTAFWGKVKV
^{20}DEVGGEALGR ^{30}LLVVYPWTQR
^{40}FFESFGDLST ^{50}ADAVMNNPKV
^{60}KAHGKKVLDS ^{70}FSNGMKHLDD
^{80}LKGTFAALSE ^{90}LHCDKLHVDP
^{100}ENFKLLGNVL ^{110}VVVLARNFGK
^{120}EFTPVLQADF ^{130}QKVVAGVANA
^{140}L AHRYH

I.2- Structure secondaire de l'hémoglobine bovine

La structure secondaire se rapporte aux interactions entre les acides aminés proches les uns des autres dans une séquence linéaire (Voet D. *et al.,* 2007). On distingue plusieurs types

de structures. Cependant, les plus souvent rencontrées sont les hélices alpha (caractérisées par l'enroulement des liaisons peptidiques autour d'un axe sous forme de « tire bouchon » et comportant 3,6 résidus consécutifs par tour. Cette structure est stabilisée par des liaisons hydrogènes entre les groupements CO et NH de 2 liaisons peptidiques superposées.) ou les feuillets béta (structure périodique constituée de plusieurs brins dont les liaisons hydrogènes se font entre résidus distants). La structure secondaire de la globine est hélicoïdale à plus de 75%.

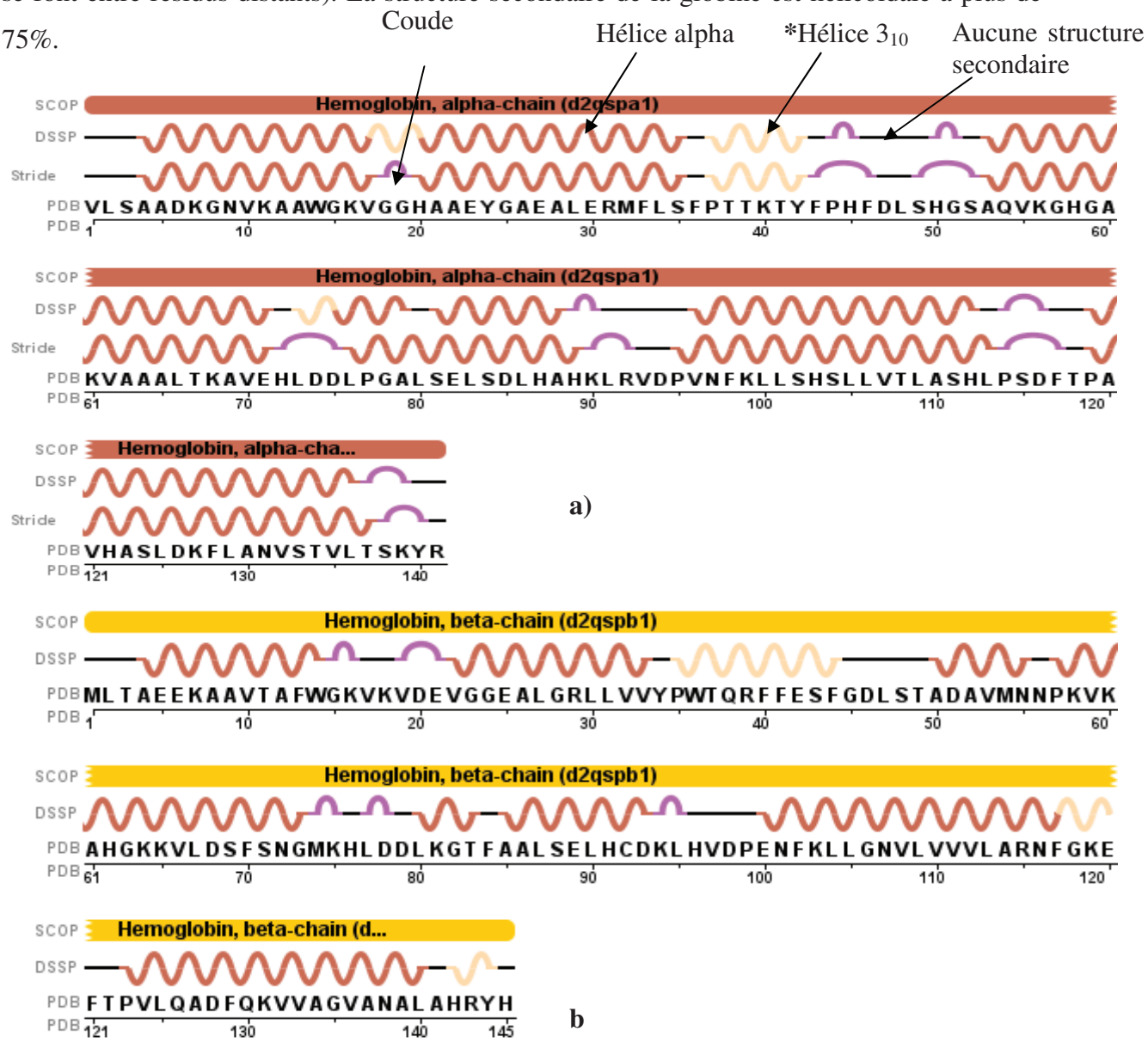


Figure 2 : Structures secondaires de la chaîne alpha (a) et béta (b) de l'hémoglobine bovine. SCOP, DSSP, Stride et PDB constituent des bases de données protéiques.
***** hélice 3_{10} : Structure ressemblant à une hélice alpha et comportant 3 résidus par tour (au lieu de 3,6). Chaque pont hydrogène ferme une boucle de dix atomes, d'où le nom de 3_{10} (3 résidus par tour, 10 atomes dans la boucle).
(http://www.pdb.org/pdb/explore/remediatedSequence.do?structureId=2QSP).

Les chaînes alpha et les chaînes béta sont respectivement composées de 8 et de 11 hélices alpha reliées les unes aux autres par des coudes. Les extrémités N et C sont elles aussi désordonnées.

I.3- Structure tertiaire de l'hémoglobine bovine

La structure tertiaire d'une protéine constitue le troisième niveau de l'identité structurale d'une molécule protéique. Elle correspond au repliement de la chaîne polypeptidique dans l'espace. Cette structure tertiaire dépend aussi de la composition en acides aminés de la protéine et de son environnement. Les propriétés fonctionnelles des protéines dépendent de leur structure tertiaire.

Ces structures sont formées par l'assemblage d'éléments structuraux dans unes ou plusieurs unités compactes globulaires appelées domaines.

Lors des études réalisées par Kendrew dès les années 60, il a été constaté que l'intérieur de la myoglobine avait presque exclusivement des chaînes latérales hydrophobes (Kendrew 1958, 1959, 1962, 1963, Kendrew *et al.,* 1960). Ce fut un des premiers principes généraux important à émerger des études des structures des protéines. La force principale qui permet le repliement des molécules protéiques globulaires solubles dans l'eau est l'empilement des chaînes latérales hydrophobes à l'intérieur de la molécule. Ce qui entraîne la formation d'un cœur hydrophobe et d'une surface hydrophile. Les structures secondaires présentes permettent de neutraliser les groupements NH et CO de la chaîne latérale polaire en formant des liaisons hydrogènes dans un environnement hydrophobe.
La structure tertiaire ne peut être prédite correctement ; elle nécessite une expérimentation. Il existe trois méthodes principales :
- La microscopie électronique : Elle a une faible résolution (environ 20 Å).

- La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) : Elle est efficace pour des masses moléculaires inférieures à 30 KDa.

- La cristallographie : Plus adaptée dans le cas de l'étude des macromolécules, sans limitation de masse moléculaire, possède une grande résolution (1 à 2 Å). Ses premiers succès datent des années 60.

Les premières études cristallographiques sur l'hémoglobine furent menées par Perutz dès 1962. Il décrit quatre structures très semblables associées par des liaisons non covalentes où chacune de ces sous unités tiennent dans une crevasse spéciale un noyau porphyrique : l'hème, qui porte un atome de fer (Perutz, 1962).

I.4- Structure quaternaire de l'hémoglobine bovine

La structure quaternaire se définie comme la conformation qu'adopte la protéine suite aux différentes interactions entre les chaînes polypeptidiques de la molécule protéique. La structure quaternaire de l'hémoglobine est la disposition spatiale de ses différentes sous-unités (Figure 3).

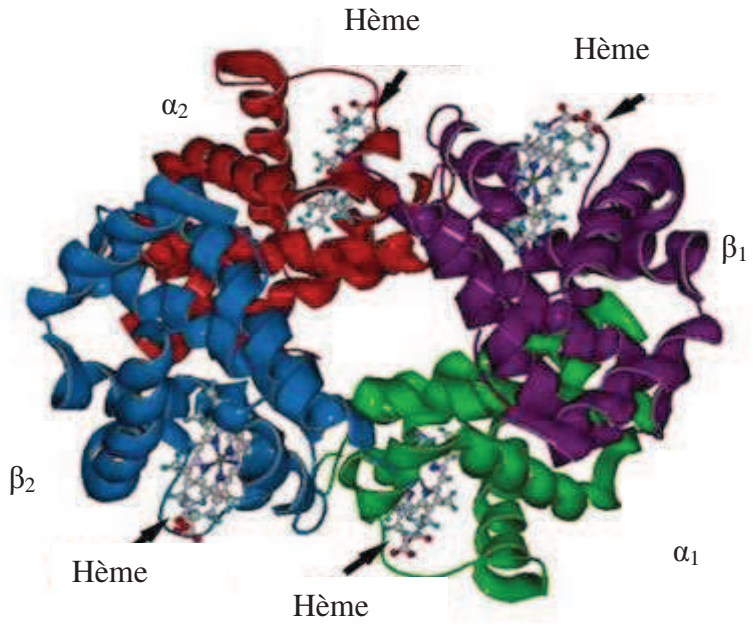
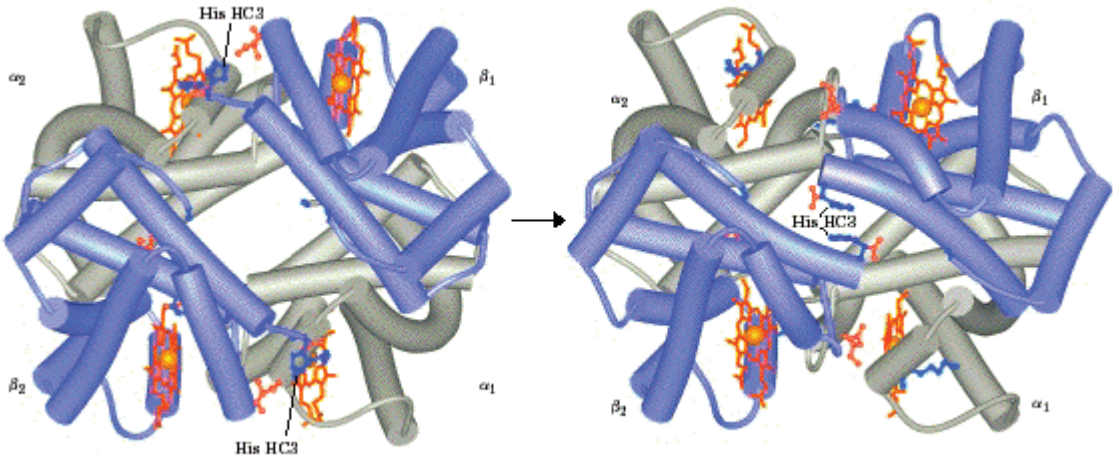


Figure 3 : Structure quaternaire de l'hémoglobine bovine
(*erasmeinfo.ulb.ac.be/globule/images/Tetra2.jpg*)

Chaque sous-unité a sa propre structure tertiaire. Le tétramère d'hémoglobine est une molécule sphéroïde de dimension 64x55x50 Å. Il existe un petit nombre de liaisons entre les deux chaînes alpha d'une part et entre les deux chaînes béta d'autres part. En revanche, des liaisons hydrophobes fortes existent entre les chaînes de nature différente ($\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_1\beta_2$ et $\alpha_2\beta_2$). Les liaisons entre un monomère α et un monomère β sont plus fortes que les interactions α-α, β-β ou que celles établies entre les deux dimères α-β. Ainsi lors du traitement par l'urée 8M par exemple, l'hémoglobine est plutôt dissociée en dimères α-β qu'en dimères

α-α ou β-β. Quand l'hémoglobine fixe son premier oxygène, la structure quaternaire change. La fixation d'un atome d'oxygène sur le fer, modifie la conformation de l'hémoglobine (Baillet *et al.,* 2003).

Une rotation des 2 sous-unités α par rapport aux autres ainsi qu'une rupture de 8 liaisons électrostatiques sont observées. Il s'en suit une différence dans la facilité de fixer l'O_2 : le premier a une fixation difficile et elle est de plus en plus facile pour les suivants.



Etat T Etat R

Figure 4: Conformation quaternaire de l'hémoglobine bovine (Lehninger, 2000).

La conformation quaternaire de la désoxyhémoglobine correspond à l'état T (« Tendu ») et celle de l'oxyhémoglobine, état R (« Relâché »). Elle reste la même quelque soit le ligand (O_2, CO, Met, CN et NO). L'espace qui existe entre les sous-unités est plus important dans la désoxyhémoglobine que dans l'oxyhémoglobine. L'analyse de la structure cristalline par rayons X a fourni des instantanés des états R et T de l'hémoglobine dans différents états de liaison au ligand mais n'a pas expliqué comment la protéine passe d'un état à un autre (Voet *et al.,* 2007a). Il est à ce jour difficile de déterminer la séquence des événements qui se produisent lors de ces transformations car pour y parvenir il faudrait comprendre les mécanismes internes de la protéine ce qui n'est actuellement pas le cas.

II- La méthémoglobine et la carboxyhémoglobine

- La Méthémoglobine :

In vivo ou in vitro, lorsque le sang est exposé à d'autres agents oxydants (le monoxyde d'azote, le monoxyde de carbone ou les composés nitrosoaromatiques), le fer ferreux normalement présent dans la molécule est converti en fer ferrique, formant ainsi la méthémoglobine. Celle-ci est due à une autooxydation de l'oxyhémoglobine. In vivo, dans les érythrocytes, cette méthémoglobine est régénérée en une hémoglobine fonctionnelle par le système enzymatique de la NADH-méthémoglobine réductase ou autres systèmes (voie du glutathion, voie de l'acide ascorbique,…) permettant ainsi de maintenir le niveau de méthémoglobine à environ 1% de l'hémoglobine totale. In vitro, l'autooxydation de l'oxyhémoglobine se fait de façon irréversible dans l'eau, les tampons ou en présence d'agents nucléophiles.

- La carboxyhémoglobine

L'oxyde de carbone (CO) réagit avec l'hémoglobine pour former la carboxyhémoglobine. Comme l'hémoglobine a une affinité beaucoup plus grande pour le CO que pour l'oxygène, le CO déplace donc l'O_2 de l'hémoglobine, réduisant ainsi sa capacité de transport de l'oxygène.

III- La pepsine porcine

Définie comme une protéase à aspartate relativement non spécifique, la pepsine porcine est une protéine de 34 600 Da, composée de 326 acides aminés. Elle constitue la protéase digestive prédominante dans le suc gastrique des vertébrés. Ses chaînes polypeptides se reploient pour former une structure tertiaire composée de deux domaines repartis de façon analogue. Chacun de ces deux domaines est constitué de 2 feuillets bêta et de deux courtes hélices alpha. Les deux domaines (ou lobes) sont reliés par un feuillet béta à six brins anti parallèles (Figure 5).

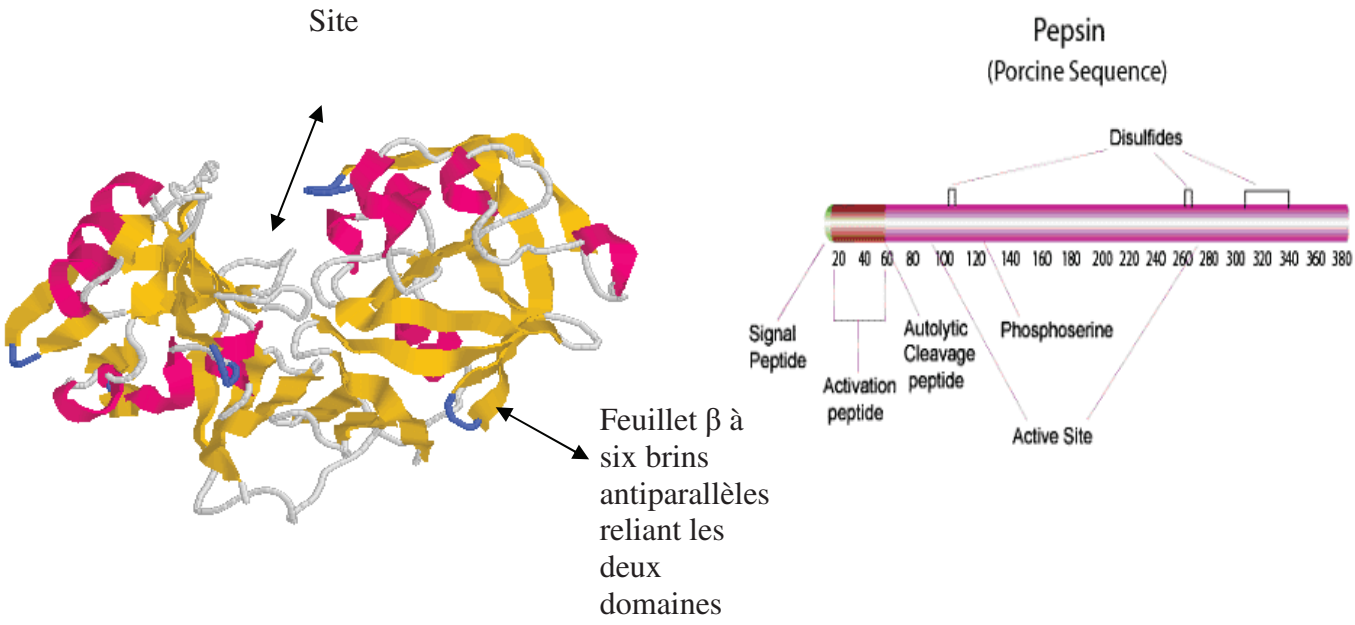


Figure 5 : Structure quaternaire (à gauche) et caractéristiques de la séquence peptidique (à droite) de la pepsine porcine.

La pepsine hydrolyse des liaisons peptidiques seulement ; n'hydrolysant pas d'amide non-peptide ou des liaisons ester. La pepsine porcine est composée entre autres, de deux acides aspartiques catalytiques (Asp32 et Asp 215) disposés en son centre. Son mécanisme d'action est basé sur la reconnaissance d'un motif structural dont la nomenclature a été établie par Schechter et Berger (Schechter et Berger 1967 ; 1968), présentée par la figure 6.

Dans ce système, il est considéré que les résidus d'acides aminés du substrat polypeptidique se fixent au niveau des sous-sites du site actif de l'enzyme. Par convention, ces sous-sites sur la protéase sont appelés S (pour les sous-sites) et les résidus acides aminés du substrat sont appelés P (pour le peptide). Les résidus d'acides aminés de la partie N-terminale de la liaison hydrolysable sont numérotés P3, P2, P1, et les résidus de la partie carboxyle-terminale sont numérotés P1', P2', P3', etc. P1 ou P1' sont ces résidus situés à côté de la liaison hydrolysable. Les résidus de substrat considérés comme étant autour du site de clivage peuvent être numérotés jusqu'à P8. Les sous-sites sur la protéase qui s'emboitent aux résidus du substrat sont numérotés S3, S2, S1, S1', S2', S3', etc. Les coupures préférentielles de la pepsine se situent en position C-terminale des acides aminés aromatiques ou de la leucine. Son pH optimum est compris entre 2 et 3,2 (Garette *et al.*, 2000) et perd son activité enzymatique à pH neutre. La pepsine est irréversiblement dénaturée entre pH 8.5 - 11 à

température ambiante (Ryle A. P., 1970). Le tableau 3 est un récapitulatif des propriétés de la pepsine.

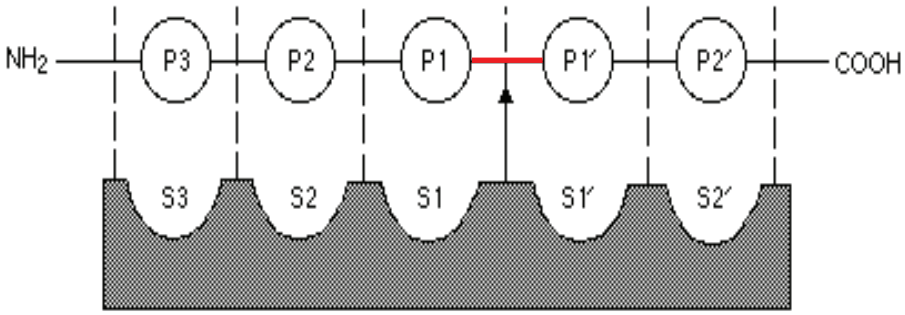


Figure 6 : Nomenclature Schechter et Berger (1967) pour la description des sites de la protéase

Tableau 3 : Récapitulatif des propriétés de la pepsine porcine

Caractéristiques EC 3.4.23.1 : Pepsine A porcine (*sus scrofa*)		Références
pH optimum	2,1	Tanaka et Yada, 2001
Température optimale	42°C [a] ou 37°C[b]	[a]Ryle, 1984, hunkapiler et richard, 1972
Clivage	Préférentiel: en position P1 et P1'des AA hydrophobes, de préférence aromatiques. Coupures : Phe[1]-/-Val, Gln[4]-/-His, Glu[13]-/-Ala, Ala[14]-/Leu, Leu[15]-/-Tyr, Tyr[16]-/-Leu, Gly[23]-/-Phe, Phe[24]-/-Phe et Phe[25]-/-Tyr dans la chaîne β de l'insuline.	http://www.brenda-enzymes.org Sweeney et Walker., 1993
	Augmentation de la sensibilité à l'hydrolyse se produit si un acide aminé soufré est proche de la liaison peptidique impliquant un acide aminé aromatique. Amidation du groupe C-terminal carboxyle empêche l'hydrolyse par la pepsine de la valine, l'alanine et la glycine	Dixon et Webb, 1979
Solvants organiques	Éthanol et acétonitrile : incubation pendant 20 min à pH 2 et 25 ° C, l'enzyme conserve son activité avec l'augmentation de la concentration de solvants organiques à 60% Méthanol : Aucun effet délétère observé	[a]Simon *et al.*, 2007 [b]Dunn et Fink, 1984

IV-Effet du milieu sur la structure de l'hémoglobine

Les protéines, de par leur composition en acides aminés, sont très sensibles à l'environnement extérieur qu'elles soient globulaires (hémoglobine, myoglobine, etc.) ou fibrillaires (actine, kératine, etc.). Différents facteurs peuvent conduire à une modification de l'état natif de la protéine et à leur dénaturation totale ou partielle. La dénaturation implique la rupture des liaisons qui participent à la consolidation des structures tertiaires et secondaires. Dans certains cas, la protéine perd alors sa structure organisée et la chaîne d'acides aminés prend une configuration aléatoire (Sherwood et Lockart, 2006). Les différents facteurs responsables de la variation de l'état natif des protéines peuvent être des facteurs physiques ou des facteurs chimiques.

IV.1- Effet de quelques agents physiques

- La température

L'augmentation de la température modifie toutes les propriétés dont dépend la conformation (pouvoir rotatoire, viscosité, absorption en UV). Cette augmentation de température entraîne un affaiblissement des liaisons entre les différentes sous unités et une augmentation de la mobilité de la protéine (Yan *et al.*, 2004). Différentes études montrent que l'effet de la température entraîne un dépliement coopératif de la molécule protéique (Takahashi et Fukada, 1985 ; Solis-Mendiola *et al.*, 1993 ; Potasevich *et al.*, 1997). Cependant, Goto et Hamaguchi (1982) démontrent que la chaîne polypeptidique appartenant à un seul domaine peut se replier de façon indépendante. Ce repliement local entraîne la déstabilisation de la structure restante (Ramdom coil). Pour toute protéine, une température Tm, correspondant à la température de dénaturation irréversible peut être définie. Selon la théorie de Sanchez-Ruiz *et al.* (1988), la dénaturation irréversible de la protéine peut être représentée par :

$$N \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} U \xrightarrow{k_3} D$$

La protéine à l'état natif (N), passe par un état déplié U (« Unfolded ») réversible puis atteint l'état final irréversible D (« Denatured »). Où k est la constante de cinétique de premier ordre qui varie en fonction de la température. Si $k_3 >> k_2$, toutes les molécules sont transformées en agrégats empêchant le retour de la molécule protéique à l'état natif (Sanchez-Ruiz *et al.*, 1988). Cependant, de récentes études ont démontré que les processus de dépliement et de

formation d'agrégats se chevauchent. En effet, dans le cas de l'hémoglobine, le dépliement de la protéine a lieu autour de 42-72°C, tandis que la formation d'agrégats commence de 57-67°C, pour être complète à 87°C (Jansson et Swenson, 2008).

- Le pH

Les acides aminés des protéines grâce aux groupements amines et carboxyles, ont la capacité d'être chargés positivement ou négativement en fonction du pH du milieu. Cette propriété confère à la molécule protéique un pH isoélectrique (pH au cours duquel la protéine a une charge neutre). Dans le cas de l'hémoglobine, la variation du pH a un effet important sur la structure quaternaire, mais aussi sur ses structures tertiaires et secondaires.

Une dénaturation acide de l'hémoglobine entraîne une dissociation du tétramère en dimères αβ (Griffith et Kaltashov, 2003, Brian *et al.,* .2007 ; Brian et Konerman 2007). En effet, la diminution du pH de la solution d'hémoglobine de 6,8 à 4,4 entraîne un bouleversement progressif de l'équilibre du tétramère. Pour des pH très faibles (pH 2,1), tous les contacts entre les sous unités et toutes les interactions hème-protéine sont rompues et la sous unité monomérique est fortement dépliée en solution (Dobo et Kaltashov, 2001 ; Konerman, 2007). Selon Brian *et al.*, cette dissociation due à l'effet du pH peut être schématisée de la façon suivante (Brian *et al.*, 2007) :

$$(\alpha^h\beta^h)_2 \longrightarrow 2\alpha^h\beta^h \longrightarrow 2\alpha^h{}_{\text{repliée}} + 2\beta^h{}_{\text{repliée}} \longrightarrow 2\alpha^a{}_{\text{depliée}} + 2\beta^a{}_{\text{depliée}} + 4 \text{ hèmes}$$

IV.2- Effet de quelques agents chimiques

- L'urée

Encore appelé carbamide, l'urée est un composé organique de formule chimique CON_2H_4. Utilisé à forte concentration (6-8 M), une dissociation du tétramère de l'hémoglobine est observée. En effet, selon Eduardo *et al.,* (1983), l'urée peut séparer l'hémoglobine en deux moitiés de molécules. En absence d'urée, ses demi-molécules se réunissent pour former des molécules complètes et fonctionnelles. Cette union est très spécifique et ne peut se faire qu'entre les demi-molécules. Ce phénomène défini le principe de l'autoassemblage (Eduardo *et al.,* 1983). L'utilisation d'urée 8M, n'entraîne pas cependant, la perte totale des structures secondaires de la protéine, comme ce fût le cas du sérum albumine bovine (Gonzales-Jimenez et Cortijo, 2002). La dénaturation par l'urée rend les

molécules insolubles, car les groupements hydrophobes qui étaient à l'intérieur se retrouvent à l'extérieur.

Plusieurs peptides actifs ont été obtenus à partir de l'hémoglobine après traitement à l'urée (Arroume *et al.,* 2008). L'hydrolyse de l'hémoglobine en présence d'urée aboutit à la formation de peptides intermédiaires de taille comprises entre 600-7000 Da et de structures variables, allant de l'hélice alpha, au feuillet béta et au structure ramdom coil (Daoud *et al.,* 2005). Avec cependant une forte prédominance de peptides en hélices compte tenu de la structure de départ de la molécule protéique.

- Les alcools

L'une des premières observations en présence de solvants, est qu'il n'existe pas de formation de nouvelles liaisons covalentes entre le solvant et la protéine. La seconde observation importante est que la stabilité de la structure des biomolécules est maintenue presqu'exclusivement en milieu aqueux, l'addition de co-solvants conduit à la déstabilisation de la structure (Voet *et al.,* 2007).

L'effet des alcools résulte de la faible polarité des solvants. Cette faible polarité affaiblit les liaisons hydrophobes qui stabilisent la structure mais renforce simultanément des interactions électrostatiques. Il s'agit par exemple, des liaisons hydrogènes, liaisons responsables de la conformation des structures secondaires, renforçant donc ces structures.

L'effet des alcools sur les protéines a longtemps été étudié par plusieurs scientifiques (Kientz et Bigelow, 1966 ; Jacobson et Krueger, 1975 ; Dev *et al.,* 1984, Bhakumi, 1998). Les solvants organiques miscibles à l'eau tels que l'acétone et l'éthanol entraînent une précipitation des protéines. Cette précipitation est due à leur faible constante diélectrique qui entraîne une diminution du pouvoir de solvatation des solutions aqueuses. La précipitation varie en fonction de la nature de l'alcool, de la longueur de la chaîne aliphatique et du nombre de groupements hydroxyles greffés sur cette chaîne. Des concentrations élevées de substances organiques solubles dans l'eau interfèrent avec les forces hydrophobes qui stabilisent les structures protéiques et ceci à cause de leurs propres interactions hydrophobes avec l'eau. Les substances organiques ayant plusieurs groupements hydroxyles comme l'éthylène glycol ou même le saccharose sont cependant des agents dénaturants médiocres car leur possibilité d'établir des liaisons hydrogènes les rend moins aptes à déstabiliser la structure de l'eau (Gregory, 1995).

- Effet des alcools sur l'hydrolyse protéique

En 1993, l'équipe de Dalgalarrondo *et al.,* a effectué l'hydrolyse de la lactoglobuline (E/S=1/50) et de la caséine (E/S=1/500) par la pepsine à pH 2,5 et à 20°C en milieu éthanol (10, 20, 25,30, 35, 40, 50 et 60%). les peptides obtenus ont été analysés par CLHP et identifiés par la méthode d'Edman et par Pico-tag. L'état des deux protéines dans les alcools a été vérifié par dichroïsme circulaire. L'analyse chromatographique a montré, dans le cas de la lactoglobuline (LGB), que de 0-20% l'éthanol n'entraîne pas l'hydrolyse de la protéine. La vitesse d'hydrolyse est plus importante de 30-35% ; par contre, à partir de 40%, on observe un effet inhibiteur de l'alcool. A 25 % d'éthanol, l'hydrolyse pepsique de la LGB conduit à une forte population de peptides hydrophiles de petite taille et à 30% on obtient des peptides hydrophobes dès le début puis la concentration de ceux–ci diminue à long terme laissant place à des peptides de petite taille plus hydrophiles.

La LGB n'est pas digérée par la pepsine dans les solutions aqueuses car la plupart des acides aminés aromatiques et des acides aminés hydrophobes sont à l'intérieur du noyau hydrophobe de la protéine empêchant ainsi l'hydrolyse. L'ajout d'alcool déstabilise le noyau hydrophobe entraînant un changement de phase des acides aminés apolaires qui deviennent plus exposés et mieux solvatés dans le milieu.

De même, Tchorbanov et lliev en 1993, ont observé une hydrolyse limitée de la caséine par des protéases présentant une spécificité différente (chymotrypsine, trypsine, subtilisine) dans des milieux contenant 20- 60% d'éthanol (v/v).

Iyer et Acharya, en 1987, avaient aussi observé que l'utilisation de 25% de propanol entraînait une hydrolyse sélective par la protéinase V8, des polypeptides α1-30 et α31-141 issus de α-globine.

- Les sels

Certains sels comme le sulfate d'ammonium ($(NH_4)_2SO_4$) et le phosphate de potassium ($K_2H_2PO_4$) stabilisent la structure de la protéine native. Le NaCl et le KCl ont peu d'effet. KSCN et LiBr, stabilisent la structure protéique. L'ordre d'efficacité des sels dépend de l'effet « salting out » défini par la série d'Hofmeister (Voet *et al.,* 2007):

Anions :

$SO_4^{2-} > H_2PO_4^- > CH_3COO^- > Cl^- > Br^- > I^- > ClO_4^- > SCN^-$

Cations

$NH4^+$; Cr^+ ; K^+ ; Na^+>$\underline{Li^+>Mg^{2+}>Ca^{2+}>Ba^{2+}}$

Ces ions chaotropiques (ions soulignés) ont tendance à dénaturer la molécule protéique.

Certains sels comme le thiocyanate de sodium (NaSCN), ou le perchlorate de sodium ($NaClO_4$) augmentent la solubilité de certains modèles peptidiques (Laurel *et al.,* 2008). Nandi et robinson (1972) ont en conclue que l'effet des sels sur les groupes peptidiques est additionné et estimé par la constante de « salting in » qui est spécifique aux sels pour interpréter l'effet des sels sur le repliement des protéines. L'effet des ions sur l'activité enzymatique et la stabilité suit habituellement la série de Hofmeister (Zhao, 2005).

Les liquides ioniques offrent de nouvelles possibilités d'application pour les réactions biocatalytiques (Kragl *et al.,* 2002 ; Yang, 2009) car ils améliorent bien souvent les processus d'hydrolyse en induisant une sélectivité enzymatique (Zhao *et al.,* 2006). Ne possédant pas de pression de vapeur, ils sont capables de dissoudre de nombreux composés, et peuvent être utilisé pour former des systèmes à deux phases avec de nombreux solvants. À ce jour, les réactions impliquant des lipases ont le plus bénéficié de l'utilisation de liquides ioniques, mais l'utilisation de liquides ioniques avec d'autres enzymes a également été décrite. Dans certains cas, des résultats remarquables en ce qui concerne le rendement, la sélectivité ou la stabilité de l'enzyme ont été observés.

V- Les agents chimiques utilisés pour l'étude des structures protéiques ou peptidiques :

- Le DMSO

Encore appelé DiMethyl SulfOxide ou sulfinylbismethane $(CH3)_2SO$, le DMSO est un solvant dipolaire aprotique de grande permittivité relative, entraînant une bonne dissociation des paires d'ions. Longtemps utilisé comme cryoprotecteur des cellules ou gamètes, il intervient beaucoup dans le monde cristallographique.

Le DMSO est beaucoup utilisé comme solvant pour l'analyse des peptides en RMN parce que les signaux des protons échangeables, qui sont souvent atténués ou manquants dans les spectres enregistrés dans les solvants aqueux, sont aisément observables dans le DMSO.

La conformation native et la fonction des protéines sont significativement influencées par le DMSO parce que ce solvant organique peut rivaliser et rompre les liaisons non covalentes (liaisons hydrogènes, pont salins et forces de van der Waals) qui stabilisent la structure des protéines. L'environnement hémique (dans le cas de l'hémoglobine de mammifères) est sensible au DMSO et complètement détruit pour des concentrations supérieures à 50% (v/v) (Liu *et al.,* 1998). Dans le cas d'autres protéines cette limite de concentration en DMSO induisant des changements structuraux est variable. Elle est de 55% dans le cas de la concanavaline (Jackson et Mantsch, 1991) ou encore de 35% dans celui du Ca^{2+} ATPase (Buchet *et al.*, 1989).

- TFE

Le 2, 2, 2-TriFluoroÉthanol (TFE), comme le 1,1,1,3,3,3-HexaFluoro-2-Propanol (HFIP), ont la capacité d'induire la formation d'hélices alpha de polypeptides ou de dénaturer la structure native des protéines (Reiersen et Rees, 2000). Le TFE est un alcool totalement miscible à l'eau. Il est utilisé comme cosolvant lors de l'étude cinétique des processus de repliement des peptides et des protéines (Kumar *et al.,* 2005) à cause de sa capacité (selon sa concentration) de solubilisation de ces molécules.

Le TFE est aussi utilisé pour suivre et stabiliser la formation de structures secondaires (Howard et Smales, 2005).

Des études de dichroïsme circulaire, de RMN et d'autres méthodes spectroscopiques ont démontré que le TFE favorise la formation d'hélice alpha mais aussi de structure bêta (Buck *et al.,* 1995 ; Buck, 1998 ; Xu et Kinderling, 2005). L'effet du TFE sur les protéines et leurs fragments est spécifique. Le mécanisme par le lequel le TFE entraîne une modification structurale est que ce solvant diminue la force des interactions hydrophobes, désorganise la structure de l'eau et augmente les liaisons hydrogènes intramoléculaires (Wei *et al.,* 2006). Ces observations ont préalablement été démontrées par Buck en 1998, lors de l'étude de l'effet du TFE sur le lysozyme de l'œuf de la poule et sur la bêta lactoglobuline. Selon ces études, le TFE déstabilise les liaisons hydrophobes des protéines et stabilisent les liaisons hydrogènes, entraînant ainsi la conservation et la formation de structures secondaires. Les observations faîtes par différents auteurs après étude par RMN de la structure de protéines telles que le lysozyme (Miranker *et al.,* 1991 ; Radford *et al.,* 1992 ; Povey *et al.,* 2007), le PF4 ou « Platelet Factor 4 », une protéine de 70 résidus (Barker et Mayo, 1995) ont démontré

que les solutions TFE-eau entraînent la destruction des structures tertiaires des protéines, bien que les structures secondaires soient conservées. Cette déstabilisation des structures tertiaires des protéines est aussi dûe à la pénétration du TFE dans le cœur hydrophobe des protéines (Buck *et al.,* 1993).

L'effet du TFE sur les protéines est dépendant de sa concentration. En effet, les études réalisées par Povey *et al.,* en 2007, ont démontré après analyse du lysozyme de poule et d'un peptide synthétique, qu'à faible concentration (de 10-15 %), le TFE interagit avec les groupements CO et les groupes hydrophobes situés à la surface latérale des protéines et entraîne une augmentation des interactions internes de la protéine. Tandis qu'à forte concentration, ce solvant pénètre à l'intérieur du cœur hydrophobe, détruisant ainsi les interactions présentes et entraînant un dépliement de la protéine. Des études sur la carbonique anhydrase bovine ont démontré que de fortes concentrations (>30% v/v) conduisent à la formation de structure en hélice de cette protéine. Ce qui n'est pas le cas lors de l'utilisation de concentrations plus faibles. Cependant, pour des concentrations inferieures à 30% (v/v), la structure tridimensionnelle est détruite mais pas la structure secondaire (Wei *et al.,* 2006). Les études réalisées sur la concanavaline A ont montré que le TFE (50% v/v) est capable d'induire une transition de structure (β – α – β) (Xu et Kinderling, 2005).

VI- Méthodes d'étude des structures de protéines : cas de l'hémoglobine

Etudier les modifications structurales d'une protéine revient à étudier les changements de conformation de cette protéine ; il s'agit notamment de l'étude des structures secondaires, tertiaires et même quaternaires.

Le pouvoir rotatoire, la présence ou la position d'acides aminés aromatiques et l'intensité d'absorption sont les principales caractéristiques permettant d'observer une variation structurale. Ces caractéristiques représentent les principes de base à partir desquelles ont été développées les différentes méthodes d'étude ; en identifiant ou non les niveaux structuraux concernés. Les premiers travaux sur l'enroulement et le dépliement des petits polypeptides et de grandes molécules reposaient essentiellement sur des techniques de mélange rapide dont celle par blocage d'écoulement (Méthode d'étude des réactions chimiques dans laquelle les réactifs sont très rapidement mélangés et le flux réactionnel brusquement bloqué après un très court intervalle de temps) (Kuwajima *et al.,* 1980 ; Taylor *et al.*, 1979 ; Elieser *et al.,* 1993 ;

Aria et Kuwajima, 1996) ; Ces expériences sont idéales pour isoler des événements à l'échelle de la milliseconde. Toutefois les données disponibles indiquent également que, dans un certain nombre de protéines, une large partie de l'enroulement en hélice se produit en moins de 1 ms (10-100 microseconde), c'est-à-dire trop rapidement pour être suivi.

VI.1- Méthode d'étude des structures secondaires de l'hémoglobine

Le Dichroïsme Circulaire (DC) :

Le spectre DC d'une protéine donne, par comparaison avec les spectres polypeptidiques étalons, son contenu global en hélices, en feuillets et en pelotes statiques (Durliat, 1997). La prédiction des hélices alpha par cette méthode est excellente, l'erreur absolue pour la prédiction de β-turn est généralement faible, bien qu'une petite gamme de prévisions montre un coefficient de corrélation irrégulièrement bas (Curtis, 1988). Le DC sert d'outils pour de nombreuses recherches afin de comprendre et d'analyser les variations structurales de diverses protéines, dont l'hémoglobine.

Les premières investigations datent des années 60 et furent menées sur l'hémoglobine humaine afin de mettre en évidence les différences structurales existant entre l'oxyhémoglobine, la désoxyhémoglobine, la méthémoglobine, les chaînes alpha et bêta (Urry et Pettegrew, 1967 ; Nagai *et al.,* 1969; Ueda *et al.,* 1969 ; Gersonde et Wollmer, 1970). Aujourd'hui, le dichroïsme circulaire permet de mettre en evidence l'effet de certains agents physiques tels que la température (Artman *et al.,* 2004, Zerlin *et al.* 2007), le pH (De Swati et Girigoswami, 2006), ou l'effet de certains agents chimiques tels que les surfactants (Wang *et al.,* 2009) etc…

VI.2- Méthodes d'étude de la structure tertiaire des protéines

L'analyse des séquences protéiques permet à la bioinformatique de prédire les structures et les fonctions des protéines. La prédiction de la structure tertiaire d'une séquence d'acides aminés est un problème non résolu de la biologie moléculaire. La méthode principale reste l'analyse des homologies de séquence ; les protéines avec des séquences d'acides aminés homologues ont des structures tridimensionnelles similaires. Normalement, elles ont des fonctions similaires. Les protéines homologues ont un cœur, une région centrale formée par

les charpentes des éléments de structure secondaire dans lequel les reploiements des chaînes polypeptidiques sont très similaires. Les régions des boucles qui relient les structures secondaires peuvent considérablement varier tant pour ce qui concerne leur longueur que pour leur structure. La connaissance des structures secondaires est un préalable nécessaire à la prédiction des structures tertiaires car les méthodes actuelles de prédiction de la structure tertiaire s'appuient sur la prédiction des structures secondaires. La structure tertiaire de la sous unité alpha du tryptophane synthétase par exemple, a été prédite de façon indépendante par deux laboratoires, avant qu'elle soit déterminée par les rayons X, cet exemple illustre à la fois la puissance et les pièges des méthodes actuelles de prédiction. Il n'existe aucun logiciel capable de simuler avec exactitude les lois physiques élémentaires qui s'appliquent dans un tube à essai ou dans une cellule vivante quand une chaîne polypeptidique avec sa séquence spécifique se reploie en une structure tridimensionnelle très précise. Dans le cas des structures tertiaires la seule méthode fiable reste l'expérimentation.

- la cristallographie ou diffraction aux rayons X :

Ses premiers succès datent des années 60 ; elle est plus adaptée car elle a une haute résolution (1-2Å) ; Cette technique permet l'étude des macromolécules sans limitation de masse moléculaire. La concentration minimale de protéine doit être ≥ 5 mg/ml. C'est en 1962 que Perutz a décrit pour la première fois, grâce à la cristallographie, la structure tridimensionnelle de l'hémoglobine (Perutz, 1962). En effet l'hémoglobine, la myoglobine (Nobbs *et al.,* 1966) et le lysozyme (Johnson, 1966), furent les premières protéines à bénéficier de cette technique.

- La résonance magnétique nucléaire (cas de petites molécules protéiques ≤ 30 KDa) :

Cette technique est utilisée pour l'étude des petites molécules (inférieure ou égale à 30 kDa) pour des concentrations allant de 1 à 2 mM de pH inférieur à 6 car à des pH plus grand les protons des NH de la chaîne principale s'échangent si rapidement que leur observation est difficile en RMN ; elle donne des informations sur les distances intramoléculaires des molécules qui permettent d'en déduire une structure tridimensionnelle. Cette déduction de structure est donc indirecte. On obtient généralement une série de structures possibles plutôt qu'une structure réelle. Les séries de structure que l'on voit fréquemment dans les articles de RMN ne représentent donc pas les diverses conformations réelles de la molécule en solution. Elles représentent plutôt les différentes structures qui sont compatibles avec les résultats donnés par les méthodes actuelles. La source principale de cette ambiguïté provient du trop petit nombre des contraintes de distances mesurées. A cause de cette ambiguïté, la précision

d'une structure déterminée par RMN n'est pas constante sur toute la molécule, et cette précision est difficile à quantifier.

- La microscopie électronique (faible résolution environs 20 Å)

- La spectrométrie infrarouge :
C'est une technique d'analyse complémentaire à la RMN et la spectrométrie de masse, elle est idéale pour confirmer la présence de groupements fonctionnels. Cette méthode implique l'examen des mouvements de torsion, de courbure, de rotation et de vibration des atomes dans une molécule.

VI.3- Etude des variations structurales protéiques sans identification du niveau structural

Hormis ces précédentes techniques conçues pour l'analyse des structures tertiaires des protéines, certaines méthodes ont été adaptées par différents auteurs afin de suivre les changements conformationnels des protéines.

- La spectrophotométrie et la spectrofluorimétrie

Ces deux méthodes d'étude sont généralement utilisées en complément des méthodes précédemment décrites.

- **La spectrophotométrie** : Le taux d'absorption varie avec la conformation il décroît de la chaîne statique à la forme bêta et à l'hélice alpha. La longueur d'onde d'absorption d'une molécule est une valeur caractéristique de cette molécule. La comparaison de l'intensité d'absorption (absorbance) en absence et en présence d'agent dénaturant est un moyen permettant de déceler et de quantifier un changement d'état, une dénaturation. Elle est généralement suivie d'une spectrofluorimétrie. L'étude spectrophotométrique a permis d'obtenir des profils caractéristiques des différents états structuraux de l'hémoglobine.

Tableau 4 : Récapitulatif des longueurs d'ondes caractéristiques des différentes formes de l'hémoglobine

Etats de l'hémoglobine	Absorption maximale dans la bande Q (500-660 nm) et bande de Soret	Références
Oxyhémoglobine/forme R	540 ; 570 ; 413	Zijlstra W., 1991
Désoxyhémoglobine/forme T	555 ; 430	Zijlstra W., 1991
Méthémoglobine	500 ; 632, 405	Vaubourdolle M,. 2002
hémichrome	535, 565, 405 ou 410	Wang *et al.,* 2009

L'analyse des variations au niveau de la bande Soret et de la bande Q permet de mettre en évidence le processus d'autoxydation, conduisant à l'oxydation du fer (Santiago *et al.,* 2008). En effet ce changement structural est caractérisé entre autre, par une diminution de l'intensité d'absorption au niveau de la bande Soret. L'analyse des variations au niveau de ces 2 bandes (Soret et Q) permet aussi de déceler la présence de nouvelles structurations de l'hémoglobine telles que les hémichromes (Wang *et al.,* 2009) ou la formation d'agrégat dans la chymotrypsine par exemple (Rezaei-Ghaleh *et al.,* 2007 et 2008).

-**La spectrofluorimétrie** : Les molécules comme le tryptophane, la tyrosine, les groupements chromophores et les liens peptidiques fluorescent en présence d'une irradiation en ultraviolet. Les protéines sont beaucoup plus fluorescentes que leur hydrolysat. L'énergie lumineuse est absorbée entre 270 et 300 nm. La protéine restitue l'énergie reçue en une émission de fluorescence qui est le plus souvent d'une longueur d'onde supérieure à celle du rayonnement d'excitation (340-360 nm). La mesure de la fluorescence joue un rôle analogue à celui de l'absorption en ultraviolet. Mais elle détecte des concentrations cent fois plus faibles. Elle permet donc d'étudier les structures et les comportements de la molécule en fonction de son environnement. La fluorescence de l'hémoglobine a longtemps été étudiée par plusieurs auteurs (Hirsch, 1994 et 2003, Hirsch et Noble, 1987 ; Hirsch et Nagel, 2003 ; Crespin *et al.,* 2005). Grâce à ces études, la principale source d'émission à 345 nm a été localisée au niveau du Tryptophane β-37. En conditions dénaturantes on assiste à une augmentation de l'intensité d'émission à cette longueur d'onde.

- La spectrométrie de masse

Hormis ce rôle d'identification de biomolécules, les spectres de masse sont utilisés par plusieurs auteurs (Konerman et Douglas, 1998 ; Griffith et Kaltashov, 2003 ; Simmons *et al.,* 2004) afin d'analyser les changements structuraux des chaînes de l'hémoglobine. Se servant du nombre de protonation, de nouveaux principes structuraux émergent de cette technique. C'est le cas de Brian et Konermann (2007) qui, aidés de différentes méthodes telles que le suivi d'absorbance, le dichroïsme circulaire et la fluorescence, ont étudié le repliement et l'assemblage de l'hémoglobine native et de l'hémoglobine dénaturée en présence de 40% d'acétonitrile à pH 10 par spectrométrie de masse couplée à un système de dialyse. En effet se basant sur le fait qu'à l'état déplié ou dénaturé, le spectre de masse après ESI (Ionisation Electro Spray) donne des charges (m/z) plus grandes (2000-3000 Da) que ce qui est observé à l'état natif (600-1800 Da). Une cassette de dialyse (slide-A-lyser dialysis) permettant le maintient de la protéine en contact avec l'agent dénaturant sous différents temps d'exposition est reliée à un spectromètre de masse de type ESI/MS à l'aide d'un capillaire. Ainsi, les spectres de la chaîne alpha (15053 Da), la chaîne bêta (15954 Da) et de l'hème (616 Da) sont analysés en fonction des différents temps d'exposition allant de 1-35 min. Les résultats obtenus ont montré que plus la dénaturation est poussée, plus les spectres représentatifs des différentes sous unités donnent des charges (m/z) très élevées.

VII- Intérêt des peptides issus de l'hydrolyse enzymatique

L'intérêt de l'hydrolyse enzymatique réside dans la diversité des applications potentielles (cosmétique, pharmaceutique et alimentaire) des peptides obtenus. Parallèlement aux différentes découvertes scientifiques de la médecine, la recherche peptidique a beaucoup évolué. Après avoir extrait les peptides connus pour avoir une activité thérapeutique (insuline extraite de pancréas de porc), elle est passée à la synthèse totale de ces peptides dont la séquence d'acides aminés avait préalablement été identifiée. Puis la découverte des récepteurs cellulaires et de leur affinité pour certaines fractions protéiques ont abouti au développement de la synthèse partielle de ces fractions peptidiques reconnues par les récepteurs. Une fois liée au récepteur, la séquence peptidique peut l'activer, dans le cas où cette séquence est identique au peptide naturel (agoniste) ou l'inactiver en cas de séquence modifiée par rapport à l'original (antagoniste).

Pour obtenir et isoler des peptides différents dont certains à activité biologique et thérapeutique, les chercheurs peuvent apporter des changements au niveau de la surface des protéines et/ou jouer sur les conditions d'hydrolyse. Par exemple, la glycation ou l'estérification induit en effet une modification du repliement protéines et donc une modification de l'attaque enzymatique, ce qui aboutit à des peptides issus de l'hydrolyse complètement différents dont certains pourraient avoir des activités thérapeutiques. Advitech (une entreprise des sciences de la vie et des technologies) a entrepris des essais cliniques sur un peptide laitier pour le traitement du psoriasis (inflammation de la peau). Grâce à des techniques de séparation de plus en plus poussées (réacteur enzymatique à membranes: ultrafiltration), les industriels ont isolé des peptides laitiers qui présentent des effets multiples sur la santé: agents antithromboses ou antihypertension artérielle, régulateurs de l'immunité, transporteurs de minéraux. Ces peptides étant issus pour la plupart de dégradations protéolytiques.

Aujourd'hui, de nombreux peptides issus d'hydrolysats protéiques de sources variées ont été identifiés. Le tableau 5 illustre quelques exemples de peptides bioactifs provenant d'hydrolysats protéiques d'origine animale ou végétale.

Tableau 5 : Peptides bioactifs isolés d'hydrolysats protéiques d'origine animale ou végétale

Source	Activité biologique	Références
Hémoglobine bovine	Antibactérienne	Daoud *et al.,* (2005) Nedjar-Arroume *et al.*, (2006 ; 2008)
Lécithine	Antimutagène	Park *et al.,* (2001)
Cerveau de porc	Opioïde	Zhang, (2004)
Protéine de petit lait	Immunomodulatrice	Mercier *et al.,* (2004)
Hémoglobine bovine	Stimulatrice de la croissance de certaines bactéries Gram$^-$	Zhao *et al.,* (1996)
Caséine de lait	Stimulatrice de la croissance de *Lactobacillus lactis*	Bouhallab *et al.,* (1993)
Caséine Blanc d'oeuf Gluten de blé	Comportement hormonal	Nishi *et al.,* (2001)
α-caséine Gluten	Opioïde	Zioudrou *et al.,* (1979)
β-caséine humaine	Opioïde	Yoshikawa *et al.,*., (1986)
Caséine α-lactalbumine β-lactoglobuline Ovalbumine Serum albumine	Antibactérienne et stimulation de la capacité phagocytaire des macrophages	Biziulevicius *et al.,* (2006)
Graine de *Moringa oleifera*	Coagulante	Kebreab *et al.,* (2005)
Pâtes de soja	Inhibitrice de l'agrégation plaquettaire	Fiat *et al.,* (1993)
Gluten de blé	Immunologique	Mills *et al.,* (1992)
Gluten de blé	Antibactérienne	Del Castillo *et al.,* (2007)
Gluten de blé	Opioïde	Kong *et al.,* (2008)
Morue	Secrétagogue Immunomodulatrice Antiprolifération	Ravallec-Plé et Van Wormhoudt, (2003) Gildberg *et al.,* (1996) Picot *et al.,* (2006)
Co-produit de Sardine (*Sardinella pilchardus*)	Stimulatrice de la croissance et la réponse immunitaire	Kotzamanis *et al.,* (2007)
Muscle de thon	Vasodilatatrice	Kohama *et al.,* (1988)
Caséine du lait maternel	Antibiotique	Liepke *et al.,* (2001)
Wallago (*Wallago attu*)	Antibactérienne	Sattar *et al.,* (2006)
Huitre (*Crassostrea gigas*)	Antifongique	Liu *et al.,* (2007)

VIII- Peptides actifs issus de l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine

L'hémoglobine a été décrite par Ivanov *et al.,* en 1997), comme une source endogène de peptides actifs. La découverte de fragments peptidiques issus de l'hémoglobine et isolés de l'hypothalamus de porc ayant la capacité d'augmenter l'activité des hormones, a ouvert la voie à l'extraction et l'indentification de fragments peptidiques responsables de diverses activités biologiques (Schally *et al.,* 1971). L'hémoglobine constitue in vivo une forte source de peptides bioactifs qui joueraient un grand rôle dans l'homéostasie. L'obtention de peptides bioactifs peut se faire in vivo au niveau d'organes cibles ou après hydrolyse in vitro de l'hémoglobine.

Dès 1979, ont été découvert la kyotorphine (Takagi *et al.,* 1979 ; Satoh *et al.,* 1980) et la néokyotorphine (Takagi *et al.,* 1982) isolés du cerveau de bœuf. Ils correspondent respectivement aux fragments 140-141 et 137-141 issus de la chaîne alpha de l'hémoglobine bovine. Ces deux peptides endogènes possèdent une activité opioïde en agissant spécifiquement sur la met-enképhaline (neurotransmetteur et neuromodulateur possédant aussi des propriétés analgésiques et qui est présent dans le système nerveux central). En 1986 Brantl *et al.,* aboutissent après digestion enzymatique de l'hémoglobine à une série de peptides possédant une activité opioïde ; les hémorphines ; il s'agit notamment de l'hémorphine 5 (β 34-38) et de l'hémorphine 4 (β 34-37). Dès lors, l'hydrolyse chimique ou enzymatique de l'hémoglobine a conduit in vitro à la synthèse et à l'identification de plusieurs peptides à activités biologiques diverses : telles que l'activité opioïde.

En effet cette activité opiacée est fortement représentée par la grande famille des hémorphines, comprenant 13 peptides provenant tous du segment β 31-40 de l'hémoglobine bovine (Chang *et al.,* 1980 ; Glämsta *et al.,* 1991 ; Lantz *et al.,* 1991 ; Piot *et al.,* 1992a, Barkhudaryan *et al.,* 1992 et 1993; Zhao *et al.,* 1994, …). Cette activité opiacée des peptides peut être due à la fixation des peptides sur un récepteur opiacé spécifique. La plupart des hémorphines identifiées possèdent d'autres activités telles que l'activité antihypertensive (inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine). Quelques hémorphines peuvent être citées : la LVV-hémorphine 7 (β 31-40) et la VV-hémorphine 7 (β 32-40) (Piot *et al.,* en 1992a), la LVV-hémorphine 6, β31-39 (Glämsta *et al.,* 1991), la VV-hémorphine 6, β32-39 (Nyberg *et al.,* 1997), l'hémorphine-6, β34-39 (Nyberg *et al.,* 1997).

D'autres activités de segments peptidiques de l'hémoglobine ont été identifiées : la potentialisation de la bradykinine (ces peptides permettent la fixation spécifique de la quinine stimulant ainsi sa production et augmentant son efficacité) β 129-134 (Piot *et al.,* 1992b) ; Le coronaro-constructeur (ces peptides permettent l'oblitération des artères coronaires du muscle cardiaque) (β 31-40) par Barkhundaryan *et al.,* en 1993, l'inhibition de l'*ECA* (Enzyme de Conversion de l'Angiotensine) (β 129-134, β 129-135, β 118-126) par Mito *et al.,* en 1996 ainsi que les peptides β 34-39 et α 34-46 identifiés par Yu *et al.,* en 2006 ; l'activité hypolipidemiante (ces peptides interviennent dans la diminution du taux de lipide au niveau hépatique et digestif en inhibant l'adsorption des graisses au niveau de l'appareil digestif ou en actionnant l'activité de la lipase hépatique sur les triglycérides) il s'agit du peptide β 32-35 (Kagawa *et al.,* 1996 et 1998). On distingue aussi des activités telles que la solubilisation de l'hème (β 1-30) par Lebrun *et al.,* en 1998, l'activité hématopoïétique (ces peptides interviennent, au niveau de la moelle rouge des os, dans la formation des globules rouges) 18 peptides possédant cette activité ont pu être identifiés (Ivanov *et al.,* 1992 ; Ivanov *et al.*, 1997 ; Vercaigne-Marko *et al.*, 2000), la stimulation de la croissance Bactérienne (β 48-52 par Zhao *et al.,* 1996).

Trente peptides antibactériens issus de l'hydrolyse de l'hémoglobine ont notamment déjà été isolés au sein du laboratoire, on peut citer le peptide α 1-23 (Froidevaux *et al.,* 2001), le peptide α 107-136, (Daoud *et al.,* 2005) et les peptides α 107-141, α 137-141, α 133-141, β 126-145 (Nedjar-Arroume *et al.,* 2006), les 24 autres peptides (Nedjar-Arroume *et al.,* 2008) ; et enfin le peptide β 112-141, préalablement découvert par Liekpe *et al* (2003) et destiné au traitement de l'herpès (Forssmann *et al.,* 2008).

Quelle que soit la voie d'obtention des peptides actifs, il est observé que les peptides biologiquement actifs appartenant aux chaînes alpha et béta de l'hémoglobine sont tous de taille relativement faible (3-30 acides amines) dont 70% sont compris entre 3 et 20 acides aminés (Ivanov *et al.,* 1997).

Un résumé de l'ensemble des peptides obtenus à partir de l'hémoglobine est présenté dans le tableau 6 :

Tableau 6 : Peptides actifs issus de l'hémoglobine bovine

Fragments	Activités	Références
Kyotorphine (α140-141) Néokyotorphine (α137-141) Néokyotorphine 1-4 (α137-140) α137-139	Opioïde	Tagaki *et al.,* 1979 ; Satoh *et al.,* 1980 Takagi *et al.,* 1982 Zhao et Piot 1998 Orts *et al.,* 1978
Hémorphine 4 (β 34-37)		Brantl *et al.,* 1986 ; Barakhundaryan *et al.,* 1993
LVV hémorphine 4 (β31-37)		Nishimura et Hazato ,1993
VV hémorphine 4 (β32-37)		Barakhundaryan *et al.*, 1992
Hémorphine 5 (β 34-38)		Brantl *et al.,*1986
VV hémorphine 5 (β32-38)		Zhao et piot, 1997
LVV hémorphine 5 (β31-40)		Nyberg *et al.,* 1997
Hémorphine 6 (β34-39)		Nyberg *et al.,* 1997
VV hémorphine 6 (β32-39)		Nyberg *et al.,* 1997
LVV hémorphine 6 (β31-40)		Glämsta *et al.,* 1991
LVV hémorphine 7 (β31-40)		Piot *et al.,* 1992a
VV hémorphine 7 (β32-40)		Piot *et al.,* 1992a
β 129-134 α 110-125	Potentialisation de la bradykinine	Piot *et al.,* 1992b Zhao *et al.,* 1996
β 31-40	Coronaro-constructeur	Barkhundaryan *et al.,* en 1993
β 129-134, β 129-135, β 118-126, β 64-69, β 130-135, β 130-136	Inhibition de l'*ECA*	Mito *et al.,* en 1996
β 34-39 et α 34-46		Yu *et al.,* en 2006
β 1-30	Solubilisation de l'hème	Lebrun *et al.,* en 1998
α 1-8, α 1-13, α 1-16, α 3-10, α 16-28, α 17-29, α 17-28, α 22-29, α 25-31, α 27-30, β 2-12, β 2-11, β 2-10, β 16-31, β 22-31, β 115-122	Hématopoïétiques	Ivanov *et al.,* 1992
β 94-100		Ivanov *et al.,* 1992
α 76-82		Vercaigne-Marko *et al.,* 2000
β 32-35	Hypolipidémiante	Kagawa *et al.,* 1996
β 48-52	Stimulateur de la croissance des bactéries gram -	Zhao *et al.,* 1996
α 1-23	Antimicrobiens	(Froidevaux *et al.,* 2001)
α 107-136,		Douad *et al.,* 2005

α 107-141, α 137-141, α 133-141, β 126-145		Nedjar-Arroume *et al.,* 2006
α 1-32 α 1-29 α 1-28 α 1-27 α 1-23 α 33-98 α33-97 α34-98 α36-97 α37-98 α 33-83 α 34-83 α 33-66 α 34-66 α 33-46 α33-45 α34-46 α36-45 α37-46 α 107-141 α 107-136 α 107-133 α 133-141 α 137-141 β 114-145 β 121-145 β 126-145 β 140-145 β 1-30 β 1-13 β 112-141		Nedjar-Arroume *et al.,* 2008 (Liekpe *et al*., 2003 ; Forssmann *et al.,* 2008.)

IX-Activité biologique: Peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens sont considérés comme les composants clefs des systèmes de défense immunitaire innée, non-adaptative, des organismes multicellulaires. Hormis les récentes découvertes des peptides antimicrobiens issus des hydrolyses protéiques, les statistiques émises par la banque de données des peptides antimicrobiens (http://aps.unmc.edu/AP/main.php) (Wang et Wang, 2004), données actualisées en novembre 2010, montrent au total 1644 peptides inscrits et repartis de la façon suivante :

Tableau 7 : Données statistiques du nombre de peptides à activités variables existant dans la banque de donnés des peptides antimicrobiens

Fonctions biologiques	Nombre de peptides	Pourcentage
Peptide antiviral:	102	6,2%
Peptide antifongique:	487	29,62%
Peptide antibactérien:	1287	78,28 %
Peptide anticancéreux (anti tumoral)	100	6,08 %

Le total du nombre de peptides est supérieur au nombre de peptides inscrits dans la banque de données car parmi les 1644 peptides, certains possèdent plus d'une fonction biologique. Ces données mettent en évidence le potentiel important des peptides en tant que nouveaux agents thérapeutiques.

L'établissement de l'activité antimicrobienne des peptides réside en la nature de la bicouche lipidique des membranes cellulaires. En effet, les membranes cellulaires sont principalement composées de PG (PhosphatidylGlycerol), PS (PhosphatidylSérine), et le CL (CardioLipin). Ces composés contribuent à l'électronégativité des membranes. Toutefois, les membranes cytoplasmiques bactériennes sont généralement beaucoup plus électronégatives, avec des proportions plus élevées de PG anioniques et CL, qui sont généralement présents dans des concentrations extrêmement faibles, ou tout à fait absents au niveau des membranes de mammifères. Ainsi, le fait que les membranes bactériennes soient riches en phospholipides acides, confère à ces membranes une charge globale négative. De plus, la présence de LPS (LipoPolySaccharide) chez les gram- uniquement et des acides téichoïques ou teichuroniques au sein des bactéries à gram - et gram+ (au niveau de l'enveloppe externe des gram+),

induisent plus de charges négatives sur les surfaces respectives de ces organismes. Compte tenu de ces caractéristiques, les peptides doivent remplir certaines caractéristiques leur conférant une activité antimicrobienne.

IX.1- Caractéristiques des peptides antimicrobiens

Les peptides caractérisés révèlent une grande diversité structurale. Yeaman et Yount (2003) énumèrent les caractéristiques important intervenant dans l'attribution de l'activité antimicrobienne. Selon ces auteurs ces caractéristiques sont interdépendantes, l'altération de l'une de ces caractéristiques pouvant modifier fortement l'activité biologique du peptide ce sont :

- La charge :

La plupart des peptides antimicrobiens sont de charge positive allant de +1 à +9 et peuvent contenir d'importants domaines cationiques. Ces domaines cationiques sont importants pour l'établissement des interactions électrostatiques avec les membranes phospholipidiques des bactéries ou autres organismes. De façon générale le potentiel antimicrobien est directement lié à l'intensité de la charge du peptide. Par exemple l'étude d'un analogue de la magaïne a montré que l'augmentation de la charge de +3 à +5 améliore l'activité antimicrobienne contre des pathogènes de gram+ ou de gram- (Dathe *et al.,* 2001). Toutefois selon ces auteurs, une trop forte charge (de +5 à +7) peut entraîner une diminution de l'activité antimicrobienne et une augmentation de l'activité hémolytique. Cette diminution a été attribuée à une trop forte interaction du peptide avec les têtes polaires des membranes bactériennes, empêchant ainsi une translocation du peptide à l'intérieur de la membrane. Toute fois l'existence de peptides anioniques est à considérer. Il s'agit par exemple du Peptide B et de l'enkélytine actifs contre des gram+ et isolés des exsudats infectieux des bovins et de l'homme (Marshall et Arenas, 2003), de peptides riches en acides aspartiques (Fales-Williams, 2002) telle que la dermcidine identifiée dans la sueur humaine, actif contre des germes gram + et possédant 47 AA ou la théromyzine, trouvée sur la sangsue theromyson est un gros peptide de 86 AA, premier peptide anionique trouvé chez les invertébrés (Tasiemski *et al.,* 2004).

- La conformation :

Les groupes structuraux les plus connus de peptides antimicrobiens sont les peptides structurés en hélice alpha, en feuillet béta et ceux enrichis en un ou plusieurs acides aminés tels que les proline- arginine ou riche en tryptophane (Hancock, 1997). Les peptides en hélices non structurés dans le milieu physiologique (Bello *et al.,* 1982; Dathe et Wieprecht, 1999), acquièrent leur structure en hélice au contact des membranes phospholipidiques amphipatiques des bactéries. Les peptides en feuillet béta caractérisés par les ponts disulfures se comportent aussi de façon similaire aux peptides en hélice alpha, par la formation de pores. Toutefois, les peptides en feuillet béta amènent à des conformations très diverses, beaucoup plus stables, qui ont toujours un caractère amphipatique, avec des surfaces hydrophiles et hydrophobes distinctes. Selon Jin *et al.,* (2005), l'étude comparative de peptides à structures variables et le suivi structural effectué au contact des membrane ont montré que la capacité des peptides de former une structure hautement amphipatique (soit une hélice α ou feuillet- β) est essentiel pour la force de ces peptides antimicrobiens avec de faibles activités hémolytiques. Cependant, concernant les peptides riches en un ou plusieurs acides aminés, leur devenu structural au contact des membranes demeure à ce jour encore mal connu.

- Hydrophobie

L'hydrophobie définit le pourcentage des résidus hydrophobes dans une molécule. Elle est en moyenne de 40% dans le cas des peptides antimicrobiens. L'hydrophobie n'a pas d'effet sur les membranes composées de PG mais à des effets sur celles composées de PC et de PG 3:1. La perméabilisation est fortement accrue dans le cas de ces membranes et encore plus dans le cas des membranes entièrement PC.

- Amphipacité et moment hydrophobe

L'amphipacité reflète l'abondance et la polarisation relative des domaines hydrophobes et hydrophiles dans une protéine. Ce paramètre est défini par le Moment Hydrophobe (MH) qui est la résultante vectorielle des forces hydrophiles et hydrophobes présentes dans la structure normalisée à un idéal d'hélicité (Eisenberg, 1984). L'augmentation du moment hydrophobe

(par augmentation de l'hélicité) entraîne une augmentation significative de la perméabilisation (donc de l'activité antimicrobienne) et des activités hémolytiques des peptides sur les membranes cibles, avec un effet moindre pour des membranes chargées négativement et plus important pour des membranes neutres.

- L'angle polaire :

C'est la mesure de la proportion relative des parties polaires vis à vis de celles non polaires d'un peptide conforme à une hélice amphiphile. Par exemple, dans un peptide hypothétique structuré en hélice, au sein duquel la structure est exclusivement composée de résidus hydrophobes d'un coté et de l'autre de résidus chargés, angle polaire serait de 180°. Un petit angle polaire et par conséquent, une plus grande surface hydrophobe est liée à une augmentation de la capacité de perméabilisation des membranes, de la translocation et de la formation de pores (Dathe *et al.,* 1997; Wieprecht *et al.,* 1997; Uematsu et Matsuzaki, 2000).

Ces critères peuvent être évalués et calculés par des logiciels, qui permettent d'avoir une idée sur le comportement d'une molécule, et d'en prédire l'activité, accessibles par internet sur de nombreuses banques de données, telles que http://www.up.univ-mrs.fr/wabim/biologie/seq. html, (Université d'Aix -Marseille) (Répertoire de l'ensemble des bases de données sur les protéines) ou http://aps.unmc.edu/AP/main.php. (University of Nebraska Medical Center).

IX.2- Etapes de l'action des peptides antimicrobiens

1ère étape: L'approche ou l'interaction membranaire

Cette approche se fait soit par des interactions électrostatiques des peptides chargés positivement et de la membrane lipidique chargée négativement, soit par des interactions avec des récepteurs membranaires comme c'est le cas de la nisine (Breukink et Kruijff, 1999) ou la mésacidine (Brotz *et al.,* 1998).

2ème étape : Le seuil de concentration et la phase de transition conformationelle

Dans cette étape le peptide commence à traverser la membrane lipidique par un certain nombre de mécanismes possibles incluant la dépolarisation transmembranaire.

Les peptides antimicrobiens peuvent s'auto-assembler ou se multimériser selon les interactions initiales avec les membranes cibles. Ces interactions peptide-peptide et peptide-membrane sont susceptibles de créer des structures complexes influençant la spécificité du mécanisme d'action du peptide. Donc, après la fixation, les peptides s'accumulent à la surface jusqu'à un seuil de concentration qui permet l'assemblage et la multimérisation (complexe de monomères). Les paramètres susceptibles d'influencer ce seuil de concentration incluent donc, la propension à s'auto-assembler ou à se multimériser, la composition des membranes, la fluidité et la taille des têtes hydrophobes (Yang *et al.,* 2000). Les peptides se structurent en conformations secondaires (c'est la transition de phase structurale) en orientant les charges positives et les faces hydrophiles et hydrophobes en fonction de leurs affinités. Ils peuvent ainsi s'assembler aux constituants de la membrane pour arriver à la création de pores. Quand les attractions avec la membrane sont faibles, ces phénomènes finissent par se produire mais seulement à partir d'un seuil de concentration très supérieur.

3ème étape : Intéraction avec la membrane cytoplasmique et expression de l'activité antimicrobienne

Une fois passée la membrane lipidique, les peptides vont ensuite interagir avec la membrane cytoplasmique pour exercer leur effet antimicrobien par :

- Translocation du peptide et action sur des cibles intracellulaires telles que l'ADN, l'ARN et les protéines cytoplasmiques, entraînant l'inhibition des activités enzymatiques et de la biosynthèse. Ce phénomène est fréquent chez les peptides riches en un seul acide aminé.

Ou par :

- Lyse de cette membrane aboutissant à une fuite du contenu cytoplasmique. Différents modèles de lyses cytoplasmiques sont proposés :

❖ **Le modèle des pores toroïdaux ou « wormhole model »**

Ce modèle a été déduit principalement à partir d'expériences utilisant des peptides en hélices. Dans ce modèle, les peptides non structurés dans le milieu extracellulaire, adoptent une structure hélicoïdale à mesure qu'ils interagissent avec les têtes polaires hydrophobes de la bicouche lipidique, de la membrane bactérienne. Les hélices sont d'abord orientées parallèlement à la surface de la membrane. Leur accumulation à la surface de la membrane cause une tension entre les deux feuillets de la bicouche, qui au dessus d'un certain seuil, conduit à la désintégration ou à la rupture de la membrane. En effet, pour soulager la tension causée par la courbure des liaisons peptidiques, les hélices peptidiques pénètrent la membrane en s'orientant de façon perpendiculaire à celle-ci ; formant ainsi un pore où les lipides sont intercalés au peptide dans le canal transmembranaire.

❖ **Mécanisme en tapis ou « Carpet model »**

Dans le mécanisme en tapis, l'interaction et l'accumulation du peptide sont similaires à celles observées dans le modèle des pores toroïdaux. Toutefois, la différence observée se trouve au niveau de schéma de perméabilisation où les chaînes peptidiques qui vont s'orienter parallèlement à la surface de la membrane, sont piégées dans la région des têtes polaires de la bicouche lipidique entrainant une micellisation de celle-ci (Figure 7).

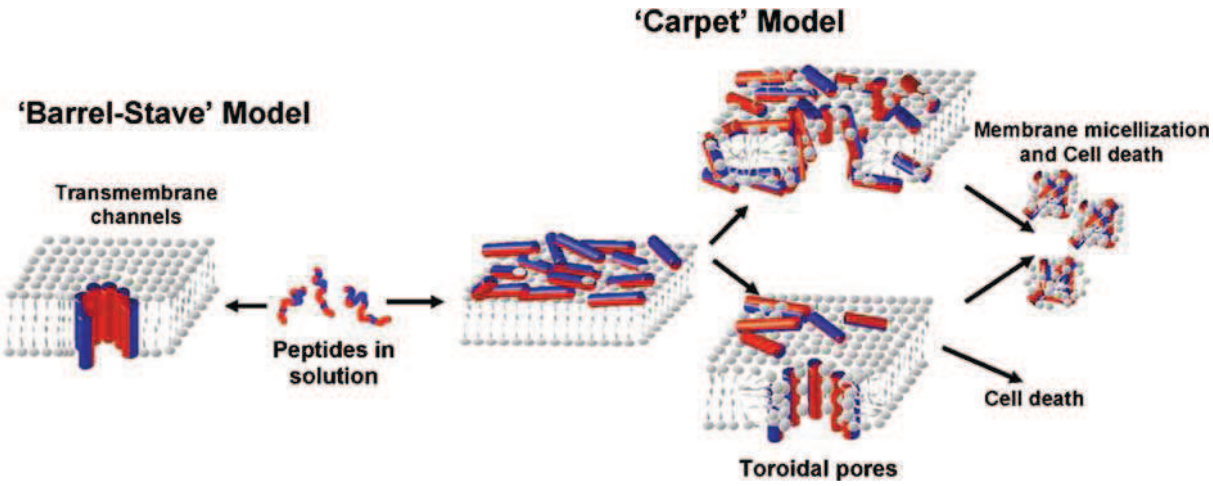


Figure 7 : Descriptif du modèle « barrel stave » et du model « carpet » (Duclohier H., 2006).

❖ **Le modèle des pores en douve de tonneaux ou « Barrel-Stave model » :**

Ce modèle est proposé pour un groupe restreint de peptides. Les peptides réunis à la surface de la membrane vont être orienté en fonction de leur amphipacité. Les peptides s'insèrent perpendiculairement dans la bicouche lipidique soit sous forme de monomères, soit sous forme d'agrégats, organisés comme les douves d'un tonneau à l'intérieur de la membrane. Leur domaine hydrophobe en interaction avec la partie non polaires des chaînes acyles des lipides, et leur domaine hydrophile formant l'intérieur du pore.

❖ **Le modèle de Shai-Matsuzaki-Yang :**

Proposé par Shai-Matsuzaki-Yang (Shai 1999; Matsuzaki 1999; Yang *et al.* 2000), ce modèle reprend les différents modèles ci-dessus en les associant chronologiquement (Figure 8). Comme précédemment décrit, les peptides s'accumulent à la surface de la membrane formant ainsi un tapis peptidique selon le « carpet modèle », entraînant ainsi la lyse bactérienne ou une déstabilisation générale de la membrane bactérienne. Si cette étape n'entraine pas la mort bactérienne, il s'en suit une phase caractérisée par la formation des pores, qui peut être transitoire (dans le cas où le peptide est à cibles intracellulaires) ou non transitoire (modèles en douve de tonneau ou Barrel Stave aboutissant à une fuite du contenu cytoplasmique).

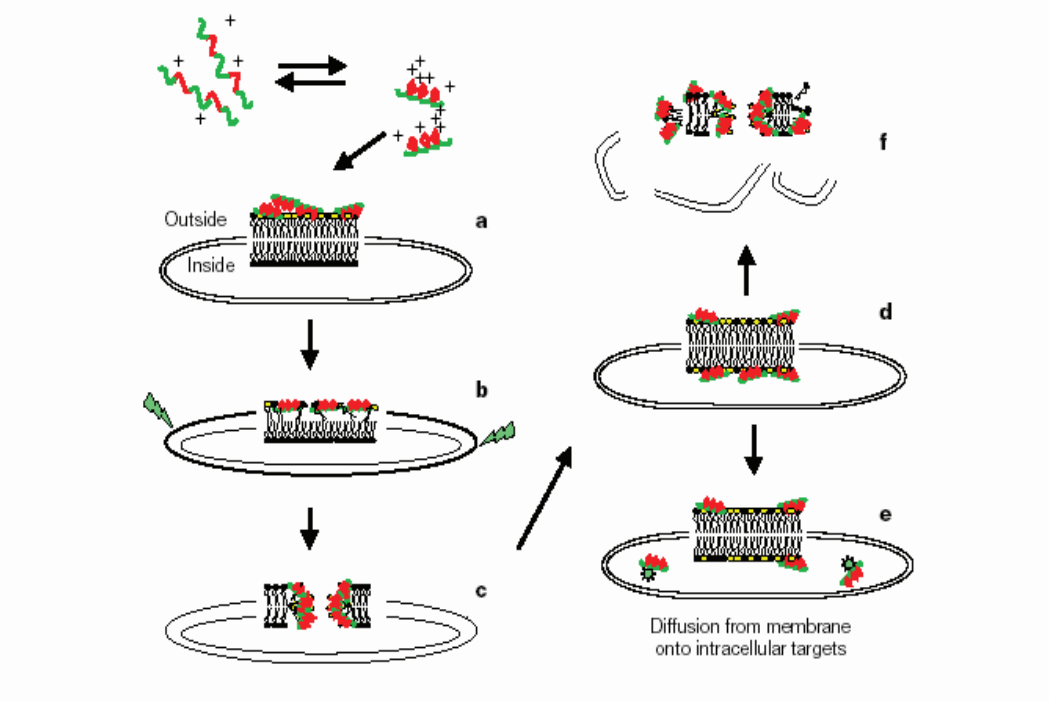


Figure 8 : Modèle de Shai-Matsuzaki-Yang. (Zasloff. 2002)

❖ **Un nouveau modèle (Coarse grain molecular dynamics)**

Ce modèle est proposé à partir de courts polymères synthétiques et de simulation informatique (Lopez *et al.,* 2006). Ce mécanisme d'insertion du peptide synthétique caractérisé par l'accommodation (Figure 9 à gauche) et la pénétration (Figure 9 à droite) rend la membrane perméable, sans destruction de sa structure. Les peptides amphipatiques, une fois entrés dans l'épaisseur de la membrane, se positionnent en restant liés aux têtes chargées des phospholipides. Quand ils sont assez nombreux, les molécules d'eau ou d'éléments hydratés traversent la membrane en passant d'un domaine hydrophile peptidique à un autre, comme on saute sur les pierres d'un gué. Ce mécanisme modélisé pour l'instant sur de petites molécules amphipatiques synthétiques pourrait s'appliquer à des peptides naturels de petite taille, trop petits pour traverser la membrane (Thèse Baret Rouvière, 2007).

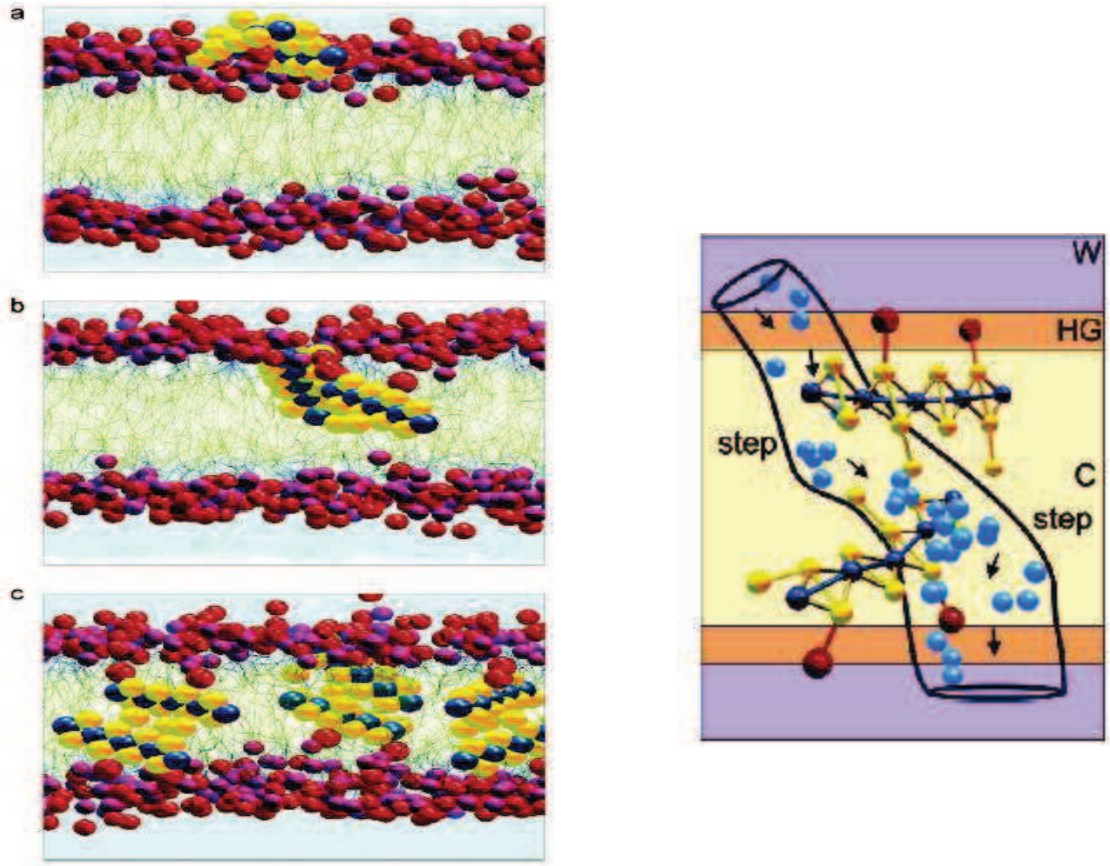


Figure 9 : Mécanisme en Coarse grain molecular dynamics. (Lopez *et al.,* 2006)

4ème étape : La mort cellulaire

Les pores formés ou l'internalisation du peptide dans le cytoplasme entraîneront respectivement une fuite d'ions et de métabolites ou l'inhibition de la synthèse des constituants par action directe sur les acides nucléiques, les mécanismes de transcription ou faciliter l'action d'autres protéines impliquées dans les phénomènes d'opsonisation ou de cytolyse. Ces mécanismes ne sont pas encore bien élucidés, et un même peptide semble pouvoir agir à plusieurs niveaux.

MATERIELS ET METHODES

I- Hydrolyse de l'hémoglobine bovine

I.1- Préparation et dosage de la solution d'hémoglobine native

a- Préparation de la solution mère d'hémoglobine bovine

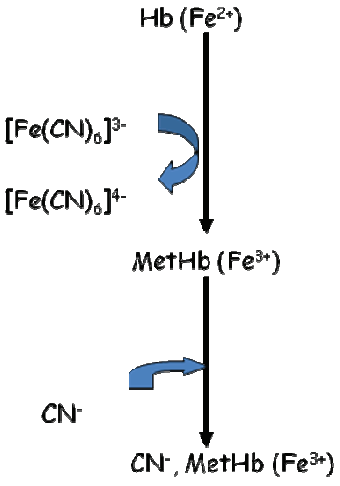
La solution mère (Y) d'hémoglobine bovine a été préparée à partir d'hémoglobine pure lyophilisée commerciale (Sigma chemical, réf H2625). Cette hémoglobine commerciale obtenue après lavage, lyse et dialyse des érythrocytes, est un mélange constitué de méthémoglobine, d'hémoglobine, et d'oxyhémoglobine. 25 mg d'hémoglobine ont été dissouts dans 100ml d'eau distillée à température ambiante. La solution obtenue est ensuite centrifugée à 4000 trs/min pendant 15min afin d'éliminer la partie insoluble. Le surnageant issu de cette centrifugation est ensuite utilisé afin de doser avec exactitude la concentration réelle de l'hémoglobine par la méthode de Drabkin, décrite par Crosby *et al.* (1954).

b- Dosage de l'hémoglobine par le réactif de Drabkin

- Principe du dosage :

La méthode Drabkin est une méthode colorimétrique reconnue par le comité international de standardisation en hématologie (Van Kampen, 1965), comme une méthode de référence pour le dosage de l'hémoglobine. Son principe (Drabkin, 1948), est basé sur la mesure de l'absorbance de la cyanméthémoglobine à 540 nm (520-560 nm).

En effet, le Fer Fe^{2+} de l'hémoglobine est oxydé en Fe^{3+} de la méthémoglobine par le ferricyanure ; la méthémoglobine réagit alors avec le cyanure de potassium (KCN) pour former la cyanméthémoglobine, un composé très stable.



Oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine (Fe^{3+}) par les ions ferricyanures

Formation d'un complexe : la cyanméthémoglobine grâce aux ions cyanures.

L'absorbance de la cyanméthémoglobine est directement proportionnelle à la concentration en hémoglobine. La méthode de Drabkin a été décrite comme étant très sensible, permettant ainsi de détecter de faibles variations de concentration.

- Méthode de dosage

Aux 50 µL de la solution d'hémoglobine sont ajoutés 12,5 ml de réactif de Drabkin (phosphate monopotassique 1 mM, cyanure de potassium 0,75 mM, ferricyanure de potassium 0,6 mM en solution aqueuse). Après 10 min de réaction à température ambiante, l'absorbance de l'échantillon est lue à 540 nm contre le réactif de Drabkin.

Sachant qu'une solution standard d'hémoglobine à 14,7% (p/v) donne une absorbance de 0,4 par cette méthode, la concentration Y de la solution en % (p/v), peut être déterminée par :

Y = 14,7x (A/0,4) g/100 mL A : absorbance de la solution à doser

I.2- Préparation des solutions d'hémoglobine dénaturée 1% et 2%

- Hémoglobine dénaturée 1% pH 5,5 :

Un volume V correspondant à 1 g d'hémoglobine bovine, est prélevé de la solution mère Y d'hémoglobine précédente, puis ajouté dans une solution contenant 32 g d'urée dissout dans (32 – V) ml d'eau distillée. Le tout est porté sous agitation, à incubation à 37°C pendant 1h. Après incubation, 20 ml de tampon acide acétique/ acétate de sodium 0,5 M pH 5,5 sont ajoutés. A l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 2 M, le pH est ajusté à 5,5.

- Hémoglobine dénaturée 2% pH 2:

Un volume V correspondant à 5 g d'hémoglobine bovine, est prélevé de la solution mère Y d'hémoglobine précédente, puis ajouté dans une solution contenant 80 g d'urée dissout dans (80 – V) ml d'eau distillée. Le tout est porté sous agitation, à incubation à 37°C pendant 1h. Après incubation, 50 ml de tampon HCl / KCl 0,25 M pH 2 sont ajoutés. Le volume total est complété à 250 ml avec de l'eau distillée. A l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 2 M, le pH est ajusté à 2. Cette préparation servira à la quantification de l'activité enzymatique de la pepsine. Ces conditions permettent d'optimiser l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine dont le pH optimal est compris entre pH 2-3.

II- Préparation de la solution de pepsine porcine et dosage de l'activité enzymatique

Une solution mère de pepsine est préparée en mélangeant 56 mg de pepsine de porc (EC 3.4.23.1 ; 32000 Unité Anson (UA); Sigma Chemicals) et 20 ml de tampon acide acétique / acétate de sodium 0,1M à pH 5,5 soit une concentration finale de 2,8 g/l de pepsine.

Le dosage de l'activité enzymatique de la pepsine s'effectue par un dosage spectrophotométrique à 280 nm. Pour ce dosage, une dilution de la solution mère de pepsine est effectuée à 1/200 dans de l'eau distillée. Une pré incubation de l'enzyme (pepsine diluée) et du substrat (hémoglobine dénaturée 2% pH 2) est effectuée pendant 5min à 37°C. Les essais sont réalisés en ajoutant à 5mL d'hémoglobine, 1 mL de pepsine diluée, après agitation, ce mélange est mis à incuber 10 minutes exactement à 37°C.

La réaction est arrêtée par ajout de 10ml d'acide trichloracétique (TCA) 5%. Un blanc est réalisé en mélangeant dans l'ordre, 10mL de TCA 5% à 1mL de pepsine diluée, puis en ajoutant les 5mL d'hémoglobine.

L'ensemble est ensuite laissé 30 minutes à température ambiante. Les solutions sont centrifugées à 4000 tours/min pendant 15 minutes, puis le surnageant est filtré sur un filtre en acétate de cellulose de 0,22 µm. L'absorbance des solutions est lue à 280nm contre le blanc.

Une unité d'activité enzymatique (U.A.) est aussi définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour provoquer une augmentation ΔA d'absorbance à 280 nm de 0,001/ min avec un trajet optique de 1 cm. La solution de pepsine contient donc :

$$(\Delta 280\ nm / 10) \times 1000 \times 200\ U.A./mL,$$

Soit : U.A. /ml. (Volume de la solution/ Masse pesée) = U.A. / mg de pepsine

III- Hydrolyse de l'hémoglobine bovine en conditions natives et dénaturantes

III.1- Hydrolyse de l'hémoglobine sans solvant : conditions natives

Dans un réacteur à température fixe de 23°C, un volume V correspondant à 1 g d'hémoglobine bovine, est prélevé de la solution mère Y d'hémoglobine précédente, à ce volume sont ajoutés 20 ml de tampon acide acétique/acétate de sodium 0,5 M pH 5,5. La solution est complétée à 100ml avec de l'eau distillée et à l'aide d'une solution HCl 2M, le

pH est rajusté à 5,5 si nécessaire. Aux 100 ml de cette solution sont ajoutées 2.10^5 U.A de pepsine (2,8 g/l) qui correspond à un rapport E/S = 1/11 (mol/mol). L'arrêt de la réaction est effectué par ajout de 400 µl de tampon borax 0,32 M (pH 12) pour 1 ml d'hydrolysat. Le pH de la solution atteint alors un pH de 10, permettant ainsi d'inactiver la pepsine. Un volume T_0 est prélevé avant ajout de l'enzyme. Différents hydrolysats sont ensuite prélevés puis conservés et destinés à l'analyse par CLHP, au calcul du degré d'hydrolyse et pour certains (2,5 min et 24h) à l'identification des peptides par spectrométrie de masse. Il s'agit des hydrolysats de 1, 2,5, 5, 10, 15, 20, 30 min et 1, 2, 3, 4 et 24h.

III.2- Hydrolyse de l'hémoglobine en présence de solvants

Dans un réacteur de 23°C, un volume V correspondant à 1 g d'hémoglobine bovine, est prélevé de la solution mère Y d'hémoglobine précédente, à ce volume sont ajoutés 20 ml de tampon acide acétique/acétate de sodium 0,5 M pH 5,5 et un volume (calculé en tenant compte de la densité du solvant) correspondant à 10, ou 20, ou 30, ou 40 ou 50% (v/v) de méthanol, ou éthanol, ou propan-1-ol, ou butan-1-ol ou enfin de TriFluoroÉthanol (TFE). La solution est complétée à 100 ml avec de l'eau distillée et à l'aide d'une solution HCl 2M, le pH est rajusté à 5,5. Aux 100 ml de cette solution sont ajoutées 2.10^5 U.A de pepsine à 2,8 g/l (préincubée à 23°C pendant 5min) qui correspond à un rapport E/S = 1/11 (mol/mol). L'arrêt de la réaction est effectué par ajout de tampon Borax 0,32 M (pH 12) afin d'atteindre un pH de 10. Un volume T_0 est aussi prélevé avant ajout de l'enzyme, puis différents échantillonnages sont effectués après différents temps d'hydrolyse. Il s'agit des hydrolysats de 1, 2,5, 5, 10, 15, 20, 30 min et 1, 2, 3, 4 et 24h. Ces hydrolysats, ainsi que le T_0 sont aussi destinés à l'analyse par CLHP, au calcul du degré d'hydrolyse et pour certains (2,5 min et 24h) à l'identification des peptides par spectrométrie de masse.

III.3- Hydrolyse de l'hémoglobine bovine en conditions dénaturantes

La solution d'hémoglobine dénaturée (1%) et la solution de pepsique (2,8 g/l) précédentes sont préincubées à 23°C pendant 5min. Puis, dans un réacteur de 23°C, aux 100 ml de la solution d'hémoglobine dénaturée, sont ajoutés 2.10^5 U.A de pepsine qui correspond à un rapport E/S = 1/11 (mol/mol). L'arrêt de l'hydrolyse ainsi que les prélèvements se font de la même manière que dans le cas de l'hydrolyse de l'hémoglobine en conditions natives.

IV-Détermination du degré d'hydrolyse par la méthode de l'OPA

Le degré d'hydrolyse a été déterminé par la méthode basée sur le dosage des groupes amines par le O-PhthaldiAldehyde (OPA) décrite pour la première fois par Church *et al.,* en 1983.

Le dosage se fait classiquement en préparant une gamme étalon de leucine dans un premier temps (Tableau 8).

Tableau 8 : Gamme Etalon de leucine

	Concentrations finales de leucine						
	0 mM	0,5 mM	1mM	1,5mM	2mM	2,5mM	3mM
Solution mère de leucine (mL)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3
Tampon borate (mL)	3	2,5	2	1,5	1	0,5	0

Une fois que la gamme est prête, le réactif OPA est préparé extemporanément en mélangeant 25 mL de tétraborate disodique 0,1M, 5 mL de sodium dodécyl sulfate (10%), et 10µL de β-mercapto éthanol. Les 80 mg d'OPA sont pesés à part, dissous dans 1mL de méthanol, puis mélangés au réactif. Le dosage se fait en mélangeant 50 µL de solution de leucine ou d'échantillon à 1 mL d'OPA. Une fois mélangé, après 2 min d'incubation, les absorbances sont lues à une longueur d'onde de 340 nm. Trois essaies ont été effectués.

V- Analyses structurales

Les analyses structurales de l'hémoglobine sont effectuées à partir des échantillons T_0 précédemment prélevés. Les échantillons sont centrifugés à 4000 trs/min pendant 15 min puis filtrés sur des filtres de 0,22 µm de diamètre. Selon le type d'analyse, des concentrations de 3µM ou de 18µM d'hémoglobine sont utilisées. Compte tenu de la précipitation observée lors de l'ajout des solvants la concentration d'hémoglobine, initialement à 1% (155 µM) est dosée par spectrophotométrie, à 540 nm en utilisant comme coefficient à cette longueur d'onde d'absorption spécifique ε_{sp}= 0,85 ml/mg.cm (Melki, 1972).

V.1- La spectrofluorimétrie

Pour ces analyses 3µM d'échantillons sont utilisés.

- Principe :

Par rapport à la fluorimétrie, qui permet de doser une substance fluorescente pour une longueur d'onde donnée, la spectrofluorimétrie fournit les moyens d'identifier l'ensemble des substances en solution. L'analyse de l'échantillon s'effectue en balayant simultanément une large plage de longueurs d'onde d'excitation et d'émission, ce qui permet la quantification de chaque composé. Le principe de cette méthode repose sur le fait que de nombreux composés organiques et inorganiques, en solution ou solide, émettent de la lumière lorsqu'ils sont excités par des photons du domaine du visible ou du proche ultraviolet. Ce phénomène appelé fluorescence permet de caractériser la substance analysée, puisque l'intensité maximale de fluorescence correspond à un couple particulier de longueurs d'onde d'excitation et d'émission.

- Description

L'appareil utilisé est le spectrofluorimétrie Perkin Elmer LS50B.

Une source lumineuse composée d'une lampe en deutéronome, émet une lumière qui est rendue rectiligne par la présence d'une lentille, la lumière ainsi émise est sélectionnée à une longueur d'onde précise grâce à un monochromateur, ce rayon $\lambda_1$incident va ensuite exciter la molécule fluorescente (généralement un composé possédant un cycle aromatique) présente au sein de l'échantillon. Afin de revenir à son état normal, la molécule ainsi excitée va émettre l'énergie reçue sous forme d'une intensité lumineuse ($I_{\lambda 2}$). L'intensité lumineuse est schématisée sur l'enregistreur en fonction de la longueur d'onde, lue par le détecteur et sélectionnée par le monochromateur 2.

V.2- La spectrophotométrie

Un spectrophotomètre comprend :

- une source lumineuse polychromatique (lumière blanche émise par une lampe à filament de tungstène).
- un monochromateur permettant de sélectionner une longueur d'onde l à partir de la lumière blanche. Il est formé d'un réseau qui disperse la lumière blanche. La sélection se fait à l'aide d'une fente.

- une cuve contenant un échantillon de solution de l'espèce colorée que l'on étudie.

- une cellule photoélectrique qui fournit un courant électrique proportionnel au nombre de photons qu'elle reçoit.

- un détecteur électronique dont la réponse est proportionnelle à ce courant électrique et permet une mesure relative de l'intensité lumineuse. L'affichage la donne soit en transmittance $T_l = I / I_o$, soit en absorbance A_l avec $A_l = \log (I_o / I)$.

Un réglage préalable du blanc permet de mesurer l'absorbance de l'espèce colorée en solution pour la longueur d'onde (l) : AB (l) = log ($I_{solvant}$ / $I_{solution}$).

V.3- Le dichroïsme circulaire

- Principe :

Toute molécule chirale en présence d'une lumière polarisée rectiligne obéit à la loi de Beer Lambert ; la spectroscopie d'absorption normale des transitions électroniques est la mesure de l'absorbance A qui dépend de la concentration C de la solution et de la longueur du chemin optique à l'intérieur de celle-ci. La constante de proportionnalité entre la mesure et les variables est une caractéristique de la molécule appelée coefficient d'extinction molaire ε, qui varie en fonction de la longueur d'onde λ :

$$A = \varepsilon l C$$

Cependant, les valeurs de ε sont différentes pour la lumière polarisée circulairement vers la gauche ou vers la droite. Le dichroïsme circulaire est défini comme la différence entre les coefficients d'extinction molaire à droite et à gauche d'une lumière polarisée circulairement.
Les spectres de DC peuvent être donc positifs ou négatifs. La prédiction des hélices alpha par cette méthode est excellente, l'erreur absolue pour la prédiction de β-turn est généralement faible, bien que la petite gamme des prévisions montre un coefficient de corrélation irrégulièrement bas (Curtis, 1988). Les spectres DC des différentes structures secondaires diffèrent au niveau de la forme et de l'amplitude.
La structure secondaire peut être déterminée par la spectroscopie DC dans le domaine de l'UV lointain (190-250 nm). A ces longueurs d'onde, le chromophore est la liaison peptidique et le signal apparaît lorsqu'elle se trouve dans un environnement replié et régulier.
Les structures en hélices-alpha, feuillets-béta et random coil donnent chacune un spectre DC de forme et de magnitude différence. Ceci est illustré par la figure 10 (Greenfield, 1996).

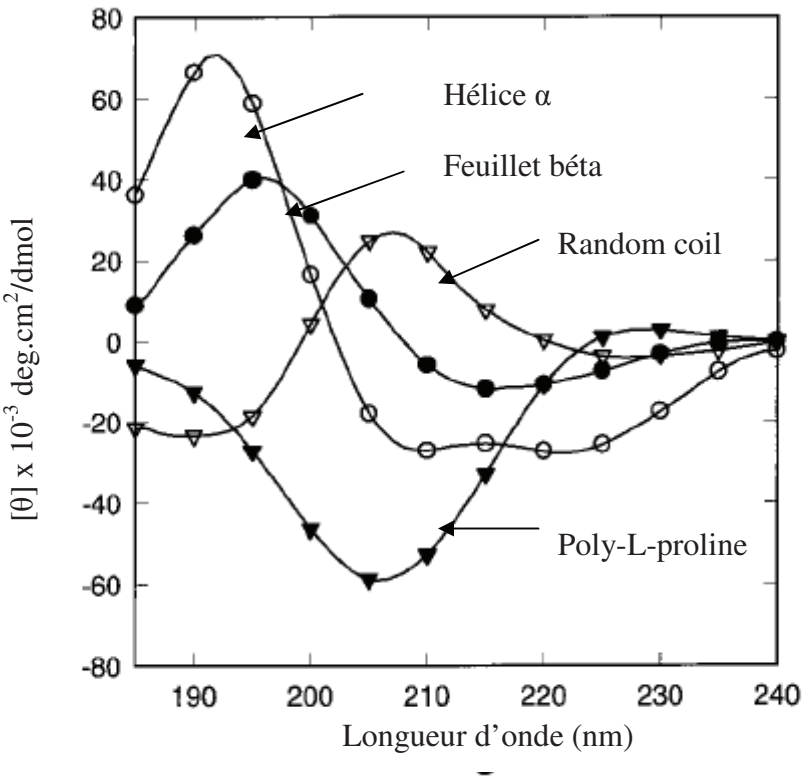


Figure 10: Spectres de dichroïsme de polypeptides en hélices alpha, en feuillet béta, en random coil ou riche en un seul acide aminé tel que la proline (Brahms et Brahms, 1980).

Une structure irrégulière donne une intensité de DC de zéro, alors que lorsque la structure est ordrée, on obtient un spectre qui contient des signaux aussi bien positifs que négatifs. A une certaine longueur d'onde.

$$\Delta A(\lambda) = A_G(\lambda) - A_R(\lambda)$$

Où ΔA est la différence entre l'absorbance de lumière polarisée circulairement à gauche et à droite (c'est ce qui est normalement mesuré). Les deux lumières obéissent à la loi de Beer-Lambert:

$$\Delta A(\lambda) = \left[\varepsilon_G(\lambda) - \varepsilon_D(\lambda)\right] \cdot l \cdot c = \Delta\varepsilon \cdot l \cdot c$$

Cette éllipcité est reliée à la variation de l'absorbance par une simple relation numérique:

$$\Delta A = \theta/3298 \quad \text{où } \theta \text{ est en deg,}$$

Cependant plusieurs auteurs expriment leurs spectres par la mesure de l'éllipcité molaire [θ] qui est reliée à la variation du coefficient d'extinction molaire ε par la relation :

$$\Delta \varepsilon = [\theta]/3298 \text{ où } [\theta] \text{est en deg,mol}^{-1}\text{dm}^{-1}$$

Le calcul de [θ] (Stephen et Schilstra, 2008) se fait par la mesure de la variation de l'absorbance à différentes longueurs d'ondes.

$$\Delta A = [\theta]/ 3298 \times l \times C \quad \text{ou } [\theta] \text{ est exprimé en deg,mol}^{-1}\text{dm}^{-1}$$

L'éllipcité molaire nous renseigne sur le contenu en structures secondaires de l'hémoglobine (hélices α, feuillets β, ramdon coil). Tenant compte du spectre caractéristique d'une molécule structurée en hélice alpha (Figure 1), le pourcentage en hélices est calculé à partir des valeurs d'éllipcité obtenues à 222 nm ou 208 nm:

$$\alpha\text{-Hélice } (\%) = ((-[\theta]_{208} - 4000)/(33000 - 4000)) \times 100 \text{ (Lu } \textit{et al.,} \text{ 2007) où}$$

4000 représente l'éllipcité molaire de l'ensemble des autres structures différentes de l'hélice alpha.

33000 représente l'éllipcité pour une protéine hypothétique comportant 100% d'hélice alpha.

- Description :

Le spectromètre DC, à l'image d'un spectromètre normale, qui dispose d'une source lumineuse, d'un monochromateur qui sélectionne une gamme étroite de longueur d'onde à partir du faisceau lumineux (de gamme de longueur d'onde plus large), d'un compartiment pour l'échantillon et d'un détecteur, possède en plus un polariseur linéaire et un « quarter wave retarder » pour convertir la lumière polarisée linéaire en lumière polarisée circulaire. Pour des raisons commerciales historiques, l'expression de la mesure du DC correspond à la mesure de l'éllipcité θ.

Le spectre de dichroïsme circulaire a été mesuré avec un spectropolarimètre JASCO J-725. Les spectres ont été scannés à température ambiante, à l'aide d'une cellule optique avec une trajectoire de 1 mm de longueur, pour l'UV-lointain et de 10 mm pour l'UV-proche et le visible. Les spectres ont été obtenus à une longueur d'onde de 250-180 nm, puis de 250-400 nm et enfin de 400-550nm. 60 balayages optiques ont été accumulés pour chaque échantillon à une vitesse de 50nm/min. Les peptides étaient mesurés à une concentration de 3µM pour l'UV-lointain, et de 18 µM de 250-550 nm. Les données ont été analysées avec un logiciel « CD Déconvolution » pour obtenir la configuration de la protéine.

VI-Analyse des hydrolysats pepsique d'hémoglobine bovine

VI.1- Analyse des peptides par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

La CLHP en phase inverse est une technique qui permet la séparation de molécules en fonction de leur différence d'affinité pour une phase stationnaire apolaire et une phase mobile plus ou moins polaire. La figure 11 représente un descriptif des composantes d'un appareil de CLHP. La photo 1 représente les différentes composantes d'une CLHP.

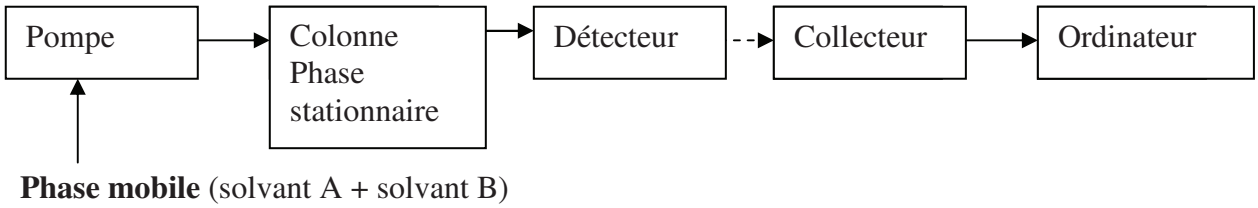


Figure 11 : Descriptif d'un appareil de CLHP

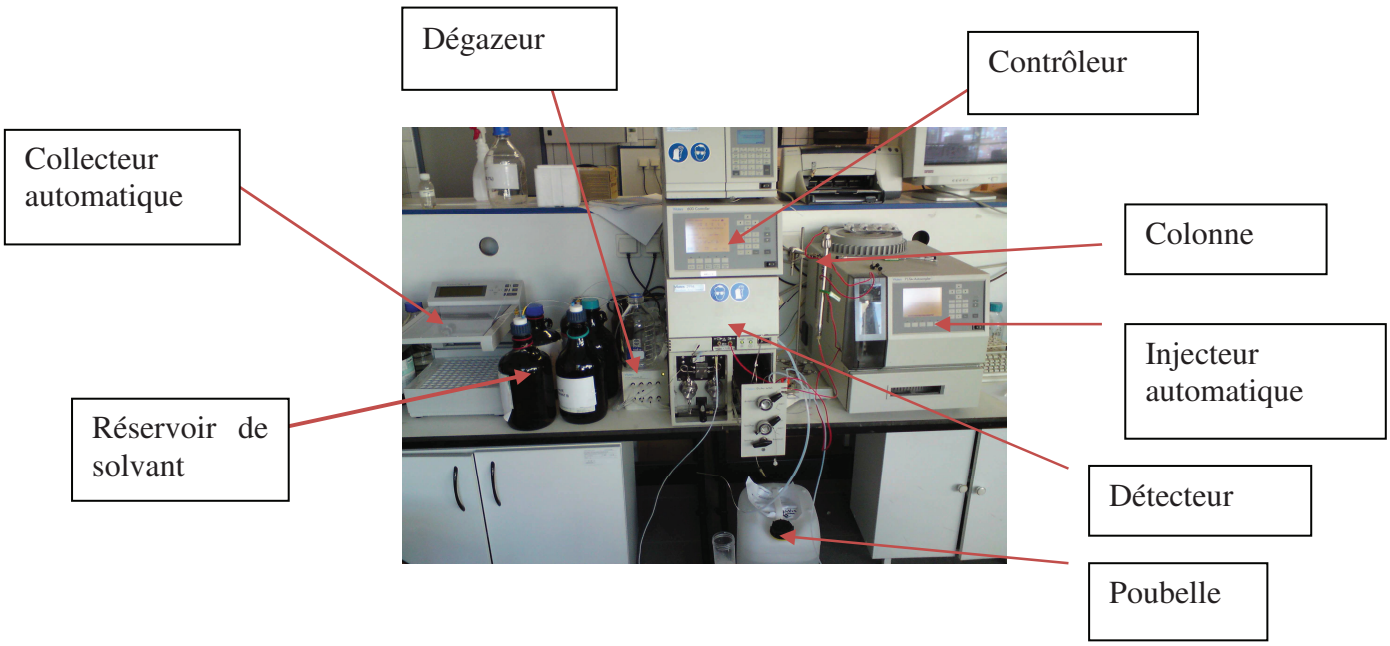


Photo 1 : Chaîne Chromatographie Liquide Haute Performance

La phase stationnaire comprend un support de particules de silice de 5 à 10 µm de diamètre très poreux et un revêtement greffé de chaînes aliphatiques de 4 (C4), 8 (C8) ou 18 (C18) atomes de carbone qui déterminent l'hydrophobie de la phase. Pour l'analyse de peptides de plus de 20 à 30 acides aminés, il est recommandé d'utiliser une colonne de type C4. Le choix de la phase mobile, quant à lui, est fonction des molécules à analyser.

En ce qui concerne cette étude, les conditions d'analyse ont été, l'utilisation d'une colonne C4 de 0,32x 25 cm réglée à un débit de 0,6 ml .min^{-1} comme phase stationnaire. La phase mobile est décrite selon un gradient d'élution de 0-67% de B pendant 30 min puis de 67-87% de B pendant 35min. Le solvant A est une solution de H_2O milli Q et de l'acide trifluoroacétique (TFA) en proportion 100 : 0,1 et le solvant B, une solution d'acétonitrile (ACN), d'eau milliQ et de l'acide trifluoroacétique dans les proportions (60 :40 :0,1).

Le détecteur est réglé à une longueur d'onde de 215 nm (longueur d'onde permettant la visualisation des liaisons peptidiques au sein d'une protéine ou d'un peptide).

Les échantillons sont préalablement filtrés sur des filtres d'acétate de cellulose de 0,22 µm de diamètre et sont injectés par l'intermédiaire d'un injecteur automatique.

VI.2- Identification des peptides par la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet la détermination des masses des espèces atomiques ou moléculaires individuelles de l'échantillon analysé, et permet ainsi de recueillir des informations sur sa nature, sa composition, et même sur sa structure ou sa quantité sous certaines conditions.

Le principe est de transformer tout composé à l'état naturel sous forme d'ions gazeux. Ainsi une très petite quantité du composé à analyser est ionisée afin de soumettre les espèces chargées qui en résultent à l'action d'un champ électrique et l'étude des trajectoires suivies, dans une enceinte où règne un vide poussé, permet de déterminer le rapport masse/charge des ions. En règle générale, un spectromètre de masse est toujours composé de cinq parties constituant une série d'opérations successives (Figure 12).

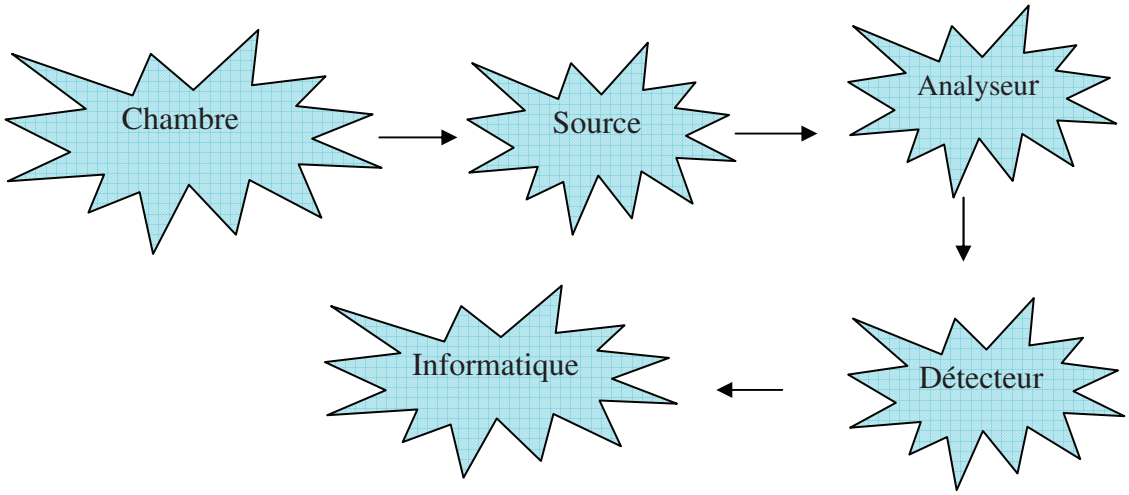


Figure 12 : Descriptif d'un spectromètre de masse

Chambre d'introduction (introduction de la solution) : L'introduction de l'échantillon a été appliquée soit manuellement directement avec une seringue et un pousse-seringue, soit de façon automatique par couplage à la chromatographie liquide haute-performance (CLHP).

Source (ionisation et volatilisation) : Appelée aussi chambre d'ionisation et de volatilisation, elle permet l'ionisation des molécules. Il existe plusieurs méthodes d'ionisation, le choix de celle-ci étant directement lié à la nature de l'échantillon et au type d'analyses souhaitées. Dans le cas d'une introduction directe, la source ESI (ElectroSpray Ionisation) a été utilisée (Figure 13). En effet, un spray est produit en appliquant un fort champ électrique, à pression atmosphérique, à la phase mobile liquide passant à travers un tube capillaire avec un débit pouvant aller de 1 à 10 µl/mn. La phase mobile est ainsi transformée en un fin brouillard contenant l'espèce à analyser, elle peut apporter des ions H+ selon le pH de la solution et contenir des cations $NH_4^{+,}$ K^+, Na^+.

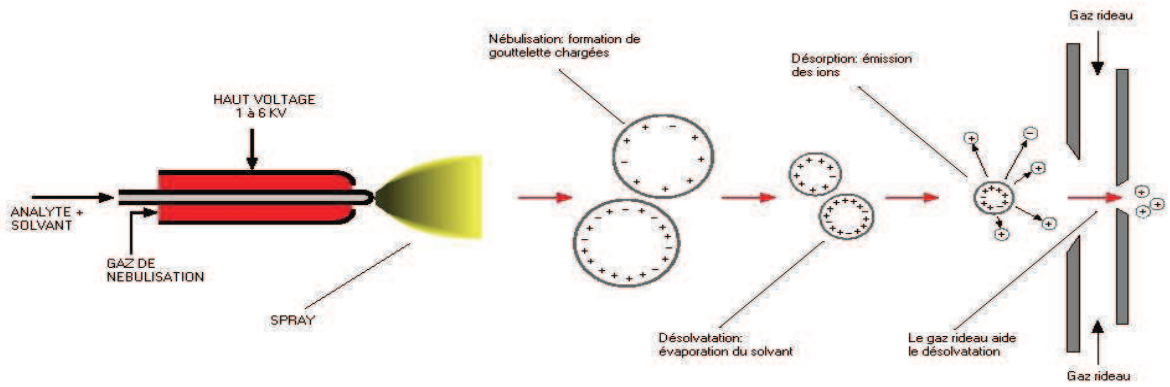


Figure 13 : Source Electrospray/Ionspray

Lors du couplage LC/MS, un courant d'air chaud est ajouté à la méthode ionspray (Turbo Ionspray). La température au niveau de la source peut atteindre 500 °C, et l'on peut travailler à des débits très élevés (>200 µl/mn).

Analyseur (séparation des ions selon le rapport masse/charge) : Analyseur utilisé a été un analyseur triple quadripôle, permettant d'effectuer une spectrométrie de masse en tandem MS/MS. Un analyseur quadripolaire est constitué de quatre barres métalliques parallèles ayant idéalement une section cylindrique ou hyperbolique, disposées symétriquement autour d'un axe. Ces quatre barres sont associées électriquement deux par deux.

Détecteur (détection des ions)

Informatique (acquisition, stockage et traitement des données)

Les spectres de masse ont été réalisés en mode électrospray-ionspray (ESI/MS/MS) avec une ionisation positive, à pression atmosphérique sur un spectromètre de masse triple quadripolaire de type Applied Biosystems modèle API 3000 LC/MS/MS (PE Sciex, Toronto, Canada).

La solution est injectée (nébulisée) en continu, grâce à une pompe (Model 22, Harward Apparatus, South Natick, USA) avec un débit de 5µL.min^{-1}. Les molécules à analyser sont vaporisées puis ionisées dans la source de l'appareil obtenant un mélange d'ions de fragmentation. Ces ions sont filtrés selon leur rapport masse/charge par un analyseur et terminent leur course en frappant le détecteur. Le spectre était obtenu en ionisation positive et selon un rapport masse/charge de 500 à 3000. Le spectre de masse est obtenu par le traitement du signal émis par le détecteur.

VI.3- Couplage LC/MS

Les spectres de masse ont été réalisés en mode LC-MS avec une chaîne CLHP Applied Biosystem (140B solvent delivery system), comprenant un détecteur UV Perkin-Elmer LC 290 et reliée au triple quadripôle précédemment décrit. Le gradient appliqué est identique à celui utilisé lors des analyses en CLHP. Le PolyPropylèneGlycol ou PPG est utilisé pour la

calibration et l'optimisation de l'appareil. Le logiciel Mac Spec 3.3 a été utilisé pour le traitement des données.

VII- Tests antimicrobiens

VII.1- Mise en évidence de l'activité antimicrobienne : Technique modifiée de l'antibiogramme

L'activité antimicrobienne a été mise en évidence par la présence d'une zone d'inhibition sur milieu gélosé préalablement ensemencé de la souche à tester par la méthode d'inondation. Toutes les souches testées sont issues des collections du laboratoire isolées à partir d'aliments. Une goutte d'agent antimicrobien est mise à la surface de ce milieu gélosé préalablement ensemencé et séché.

Les souches à tester sont mises en culture dans 5 ml de milieu Mueller-Hinton (MH), puis incubés à 37°C pendant 18-24h. Après une bonne homogénéisation, la turbidité de ces cultures est mesurée par lecture spectrophotométrique à 600 nm contre le Mueller-Hinton seul. Des dilutions nécessaires afin d'obtenir une DO de 0,25 à 600 nm sont ensuite effectuées dans de la Tryptone Sel (TS).

Facteur de dilution = DO corrigée/DO lue = 0,25/DO lue

Lorsque la DO lue est inférieure à 0,25, augmenter le temps d'incubation de la culture bactérienne concernée.

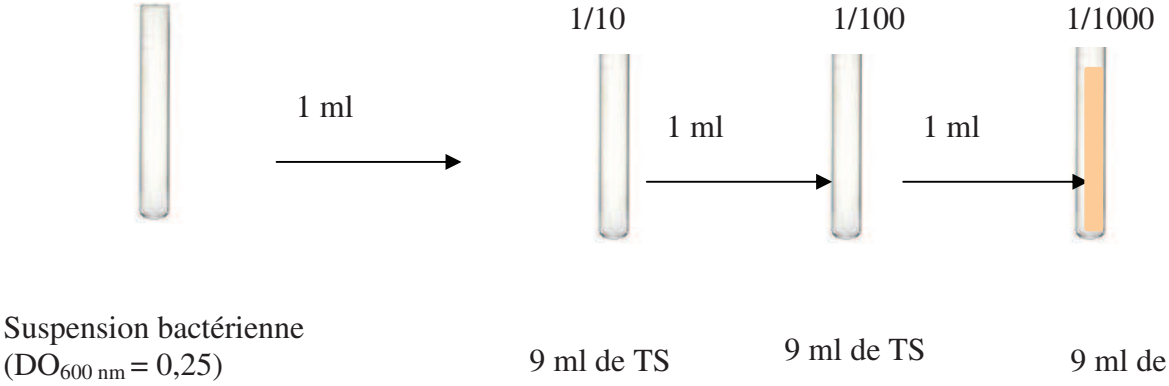
Tableau 9 : Intensité d'absorption des cultures bactériennes après incubation.

Souches testées	$DO_{moyenne}$ à 600 nm après 20h d'incubation à 37°C
Staphilococcus aureus	0,99
Escherichia coli	1,80
Listeria innocua	1,64
Micrococcus luteus	0,195

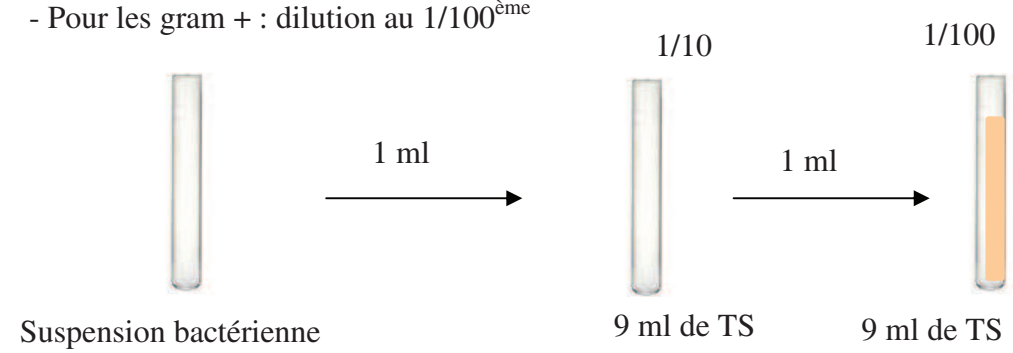
La température optimale de croissance de *Micrococcus luteus* étant de 30°C, elle atteint une $DO_{600\ nm}$ de 0,29 après 26h d'incubation à 37°C.

Selon le type de bactéries une dilution supplémentaire est ensuite effectuée :

- Pour les gram - : dilution au 1/1000ème



- Pour les gram + : dilution au 1/100ème



Procéder ensuite à l'inondation par les inocula complets des dernières dilutions (1/100 ou 1/1000) d'un milieu gélosé MH préalablement coulé et séché dans une boîte de Pétri. Laisser en contact pendant 20 min puis se débarrasser du surplus d'inoculum en l'aspirant à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Entrouvrir ces boîtes et laisser sécher plus de 30 minutes sous une hôte à flux laminaire ou les mettre à l'étuve de 37°C en les gardant fermées. Effectuer sur ces boîtes un dépôt de 10 µl d'échantillon à tester.

Un témoin négatif est réalisé en utilisant du tampon phosphate stérile pH 7. Le témoin positif est réalisé en utilisant la cécropine A, un peptide antimicrobien préparé à 1mg/ml dans de l'eau distillée. Les dépôts doivent être distants du bord de la boîte d'au moins 1cm. Une fois ces dépôts effectués, laisser les boîtes à température ambiante jusqu'à disparition totale des gouttes formées. Les incuber ensuite pendant 24 h à 37°C.

VII.2- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Le principe général de cette méthode est de mettre en évidence l'activité antibactérienne d'un peptide vis-à-vis d'une souche cible en milieu liquide.

La CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) est la plus petite concentration en agent antibactérien permettant d'inhiber la croissance d'une souche bactérienne après un temps d'incubation de 24 heures. Ce test est réalisé sur une microplaque stérile (avec couvercle).

Le milieu de culture choisi pour le test est le Müller-Hinton une fois concentré, il servira également pour la préparation des échantillons à tester et des bactéries. En effet, les échantillons, sous forme solide, sont dissous dans le milieu de culture, et les inocula bactériens sont diluées au 1/500ème dans ce même milieu.

Tous les puits contiennent 50 µL du milieu de culture et pour chaque peptide à tester on met 50 µL dans les premiers puits seulement et on fait une dilution au ½ pour ainsi avoir 100 µL dans les deuxièmes puits et ainsi de suite pour enfin rajouter 50µL de suspension bactérienne dans chaque puits. Les peptides mis dans les premiers puits seront alors dilués au ¼ par rapport aux concentrations des solutions de départ. Enfin, deux puits serviront de témoin; l'un témoin négatif, contenant 100µL de milieu; l'autre, témoin positif, correspondant à 50µL de milieu de culture et 50 µL de suspension bactérienne qui représente 10^6 UFC.mL^{-1}. La microplaque est incubée à 37°C pendant 24 h.

La CMI sera alors la concentration en peptide du dernier puits dans lequel on observe une absence de croissance bactérienne. Les puits représentants des CMI sont ainsi déterminés. Il convient, pour compléter cette analyse de procéder au dénombrement des souches du puits représentant la CMI de façon à mettre en évidence l'effet exercé par le peptide actif (figure 14).

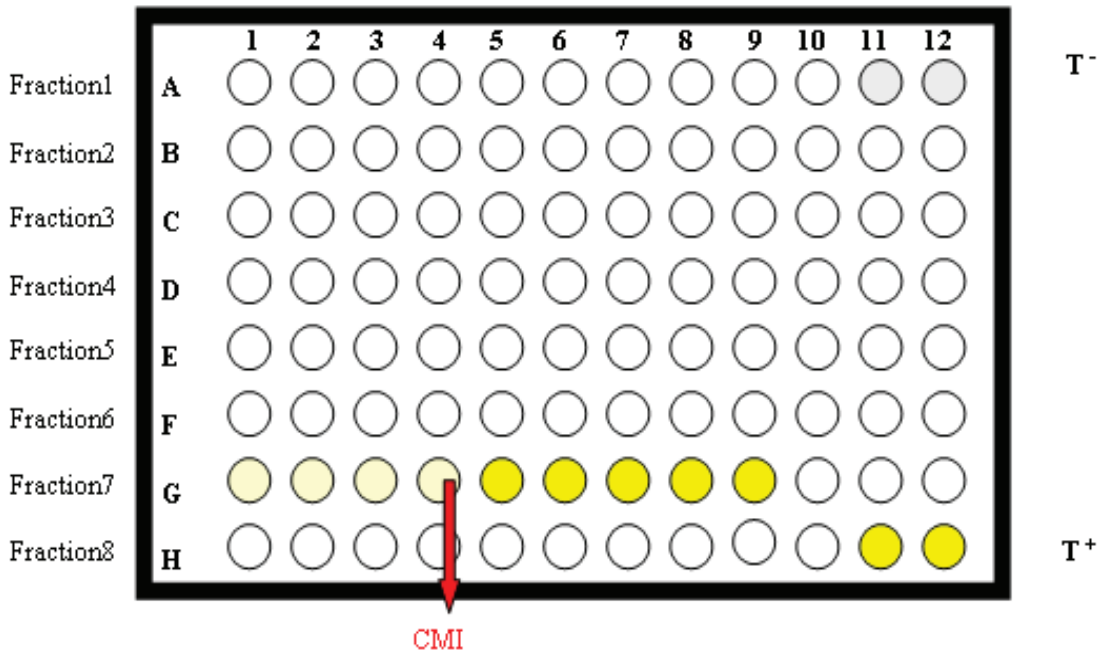


Figure 14 : Principe de la détermination de la CMI à T_{24h} : Croissance bactérienne : Inhibition de croissance

A T_0, 50µl du témoin positif sont prélevés et ajoutés à un tube contenant 9,95 ml de Tryptone Sel ; ce qui représente une dilution au 1/200ème. Ensuite on fait une dilution de 1/2000ème et enfin on fait une dilution finale de 1/20000ème ou plus si nécessaire. 100 µl des trois dernières dilutions sont ensuite prélevés puis étaler sur une boîte de Pétri contenant du MH gélosé afin de dénombrer avec exactitude le nombre d'UFC.ml^{-1}, trois essais étant réalisées pour chaque dilution. Ces boîtes de Pétri sont alors mises à incuber pendant 24h à 37°C.

Ce dénombrement servira aussi à déterminer l'effet bactéricide ou bactériostatique du peptide par comparaison du nombre d'UFC/ml du témoin T_0 et de celui des puits correspondants à la CMI. En effet, un dénombrement des cellules restantes suivant un protocole identique à celui du témoin T_0 est aussi effectué après 24h d'incubation de la microplaque en prélevant 50µl de culture des puits correspondant à la CMI. Le taux de mortalité est ensuite calculé selon la formule :

$$\% \text{ Mortalité} = \frac{P_{\text{Témoin de culture}} - P_{\text{Tube CMI}}}{P_{\text{Témoin de culture}}} \times 100$$

$P_{\text{Témoin de culture}}$ = Population du témoin de culture

$P_{\text{Tube CMI}}$ = Population du tube correspondant à la CMI

} après 24H d'incubation à 37°C

Un agent antimicrobien est dit « bactéricide » lorsque le taux de mortalité est supérieur ou égale à 99,99% et « bactériostatique » pour un taux inferieur à cette valeur et supérieur à 0%. La figure 15 est un descriptif de l'effet antimicrobien sur une population bactérienne :

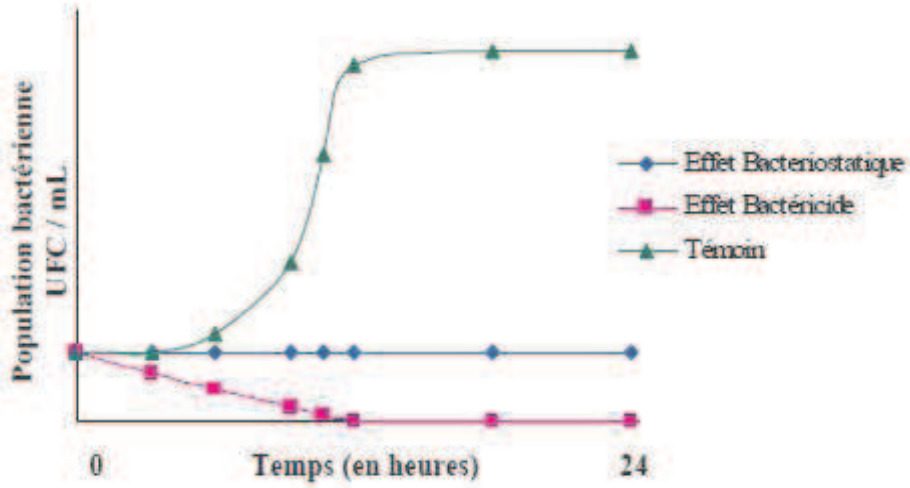


Figure 15 : Descriptif des effets d'un agent antimicrobien sur une population bactérienne.

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1

Obtention de peptides potentiellement actifs et amélioration de l'obtention de ces peptides

I- Hydrolyse pepsique de l'hémoglobine en milieu aqueux

I.1- Effet du pH sur la conformation de l'hémoglobine

L'étude des populations peptidiques et des cinétiques d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine précédemment réalisée à différents pH au sein du laboratoire (Lignot, 1998, Dubois, 2006), a montré que selon le spectre d'activité de la pepsine, les populations peptidiques obtenues varient en fonction de la structure de l'hémoglobine.

En effet, sans agent dénaturant, à pH 2, l'hydrolyse de l'hémoglobine suivant un mécanisme Zipper, aboutit à la production d'un mélange très complexe de peptides de tailles variables chargés positivement, il en est de même pour l'hydrolyse à pH 3 (Dubois 2006). Tandis qu'à pH 4,5 (Dubois 2006 ; Su *et al.,* 2007) ; toujours sans agents dénaturants, cette hydrolyse permet d'obtenir une population peptidique moins dispersée, mais à très faible concentration ; la taille des peptides obtenus à ce pH étant beaucoup moins importante que celle des peptides libérés lors de l'hydrolyse à pH plus faible. Différentes explications pourraient être avancées pour expliquer ce phénomène : Premièrement l'état de la protéine substrat est supposée différente à pH inferieur ou égal à 3 et à pH 4,5. A pH 4,5 l'hémoglobine supposée native, se déplie partiellement à pH plus faible, révélant ainsi certains sites inaccessibles.

Deuxièmement, l'ionisation des produits d'hydrolyse est différente. En effet, à pH 2, les peptides sont chargés positivement et les répulsions électrostatiques empêcheraient les associations. A pH 4,5 par contre, les peptides sont beaucoup moins chargés ce qui favorise les interactions. Ces interactions limiteraient l'accessibilité de certains sites de coupure.

Notre objectif étant d'effectuer une hydrolyse contrôlée de l'hémoglobine aboutissant à un hydrolysat riche en peptides intermédiaires avec une population plus faible de peptides, l'hydrolyse devra donc suivre un mécanisme différent de celui « one by one » ou du « zipper » mécanisme (Linderstrom-Lang, 1953). Ces études précédentes montrent que l'effet du pH seul ne pourrait permettre l'obtention de cette hydrolyse contrôlée. L'introduction d'un paramètre supplémentaire au cours de l'hydrolyse s'avère primordiale.

Afin de mieux suivre l'effet de ce paramètre sur la structure de l'hémoglobine, donc sur la spécificité de la réaction enzymatique, il est nécessaire d'utiliser un pH d'hydrolyse n'entraînant pas une inhibition de l'enzyme et n'ayant pas d'effet structural sur l'hémoglobine ; il faudrait donc que la protéine reste à l'état natif. Une hydrolyse au pHi (environ pH 6,8) de la protéine étant impossible compte tenu de l'inactivité de la pepsine, il

convient donc de choisir un pH d'étude pendant lequel l'hémoglobine garde la structure la plus proche possible de sa structure native (toutes les structures secondaires tertiaires et quaternaires sont intactes). Le dichroïsme circulaire, la spectrofluorimétrie et la spectrophotométrie UV-visible ont permis de vérifier et décrire l'état structural de l'hémoglobine bovine à différents pH (3, 4,5, 5,5) en comparaison de l'hémoglobine en présence d'urée 6M (état dénaturé de l'hémoglobine) et de l'hémoglobine à son pH isoélectrique (état natif de l'hémoglobine). Les pH d'études ont été choisis en considérant le spectre d'activité de la pepsine.

a- Etude structurale de l'hémoglobine par spectrofluorimétrie

L'étude des variations structurales de l'hémoglobine bovine a été réalisée par spectrofluorimétrie en milieu tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1 M, à différents pH : 3 ; 4,5 ; 5,5 et 6,8. Une concentration de 3 µM a été choisie afin de pouvoir observer la fluorescence du tryptophane (Hirsch, 1994 et 2003), généralement difficile à observer compte tenu de la forte absorbance de l'hème qui est capable de quencher complètement cette émission de fluorescence. La longueur d'onde d'excitation est de 290 nm et l'émission de la fluorescence est enregistrée entre 300 et 400 nm. La figure 16 montre l'intensité de la fluorescence de l'hémoglobine en fonction de la longueur d'onde.

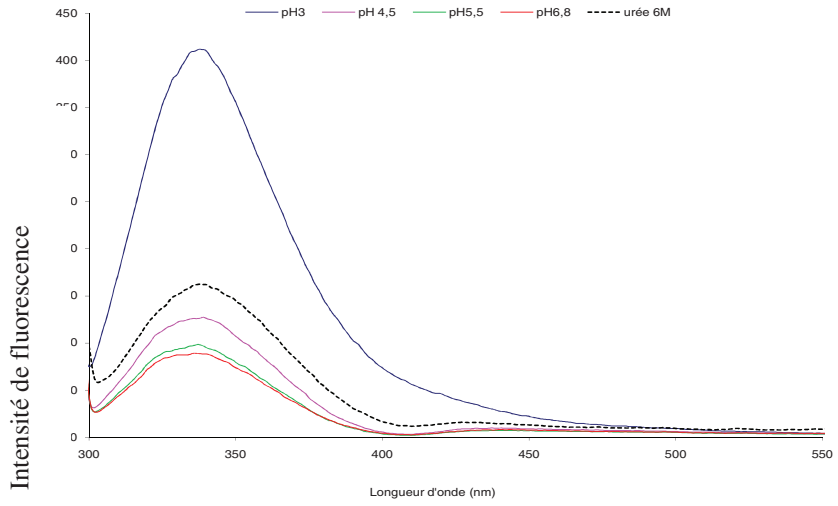


Figure 16 : Spectres de fluorescence de l'hémoglobine bovine (3µM) en milieu tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1M à différents pH (3 ; 4,5 ; 5,5 ; 6,8) et à l'état dénaturé par l'urée 6 M.

Pour une excitation de 290 nm, une émission de fluorescence maximale est observée à 345 nm quelque soit le pH (pH 3- 6,8).

L'hémoglobine bovine comprend des acides aminés aromatiques capables d'émettre une fluorescence en présence d'excitation. Cependant, parmi ces acides aminés, la fluorescence du tryptophane étant la plus forte, elle va prédominer par rapport à celle des autres acides aminés et sera donc la seule fluorescence détectable. Chaque dimère αβ de l'hémoglobine bovine contient trois tryptophanes : α14-Trp, β13-Trp et β35-Trp. Alper et Lopez-Delgado., en 1976 ont démontré par des études de spectrofluorimétrie par radiation synchrotron sur hémoglobine humaine, qu'entre 310-360 nm, la principale source d'émission est le Trp β-37, équivalent au Trp β35 dans le cas de l'hémoglobine bovine (Alper et Lopez-Delgado, 1976). Cette observation a été aussi confirmée par Hirsch *et al.,* (1980) après étude de la fluorescence de différentes hémoglobines (A, F, et H) par « fluorimetrie Front FACE » dans du tampon phosphate pH 6,8 et 7,4. La figure 1 montre que lorsque le pH diminue, l'intensité de fluorescence augmente, sans décalage de la longueur d'onde d'émission. Cette variation témoigne d'un changement conformationnel de la protéine, changement localisé au niveau de l'environnement de la molécule responsable de cette émission. En effet, cette augmentation d'intensité montre que le tryptophane est de plus en plus exposé à l'excitation. Le pH isoélectrique de l'hémoglobine étant de 6,8, lorsque le pH du milieu est encore plus en dessous du point isoélectrique, l'intensité de fluorescence augmente encore plus. Les mêmes résultats ont également été obtenus par De Swati et Girigoswani (2006) pour des pH de 1,9 à 11,5 avec une longueur d'onde d'excitation de 290 nm.

Hirsh *et al.,* en 1980 ont démontré que la position du Trp β 37 (dans le cas de l'hémoglobine humaine) est sur un site principal des changements de la structure quaternaire. D'après les travaux de Crespin *et al.,* en 2005, travaux portant sur l'étude du repliement de la myoglobine par « spectroscopie par flux arrêté » et par étude cinétique de la fluorescence de la myoglobine sous différentes formes , ces variations peuvent aussi s'expliquer par le faite que la dénaturation de la protéine et la perturbation des interactions hème/protéines entraînent une augmentation de la distance entre Trp β37-hème, réduisant ainsi l'énergie de transfert du Trp à la molécule porphyrine et augmentant l'intensité d'émission du Trp [Crespin *et al.,* 2005]. A pH 3, l'exposition du tryptophane est très importante. Ce phénomène confirme la dénaturation de la protéine à ce pH. La spectrofluorimétrie montre que la conformation de la protéine varie

très faiblement entre le pH 5,5 et 6,8. Ce qui n'est pas le cas du pH 4,5 où l'intensité de fluorescence est beaucoup plus grande.

b- Etude structurale de l'hémoglobine par spectrophotométrie UV-visible

Les études spectrophotométriques ont été réalisées dans le domaine de l'UV-visible (200-700 nm) à différents pH (3, 4,5, 5,5 et 6,8). La concentration d'hémoglobine est de 3µM. La figure 17 montre l'absorbance en fonction de la longueur d'onde de 200-700 nm.

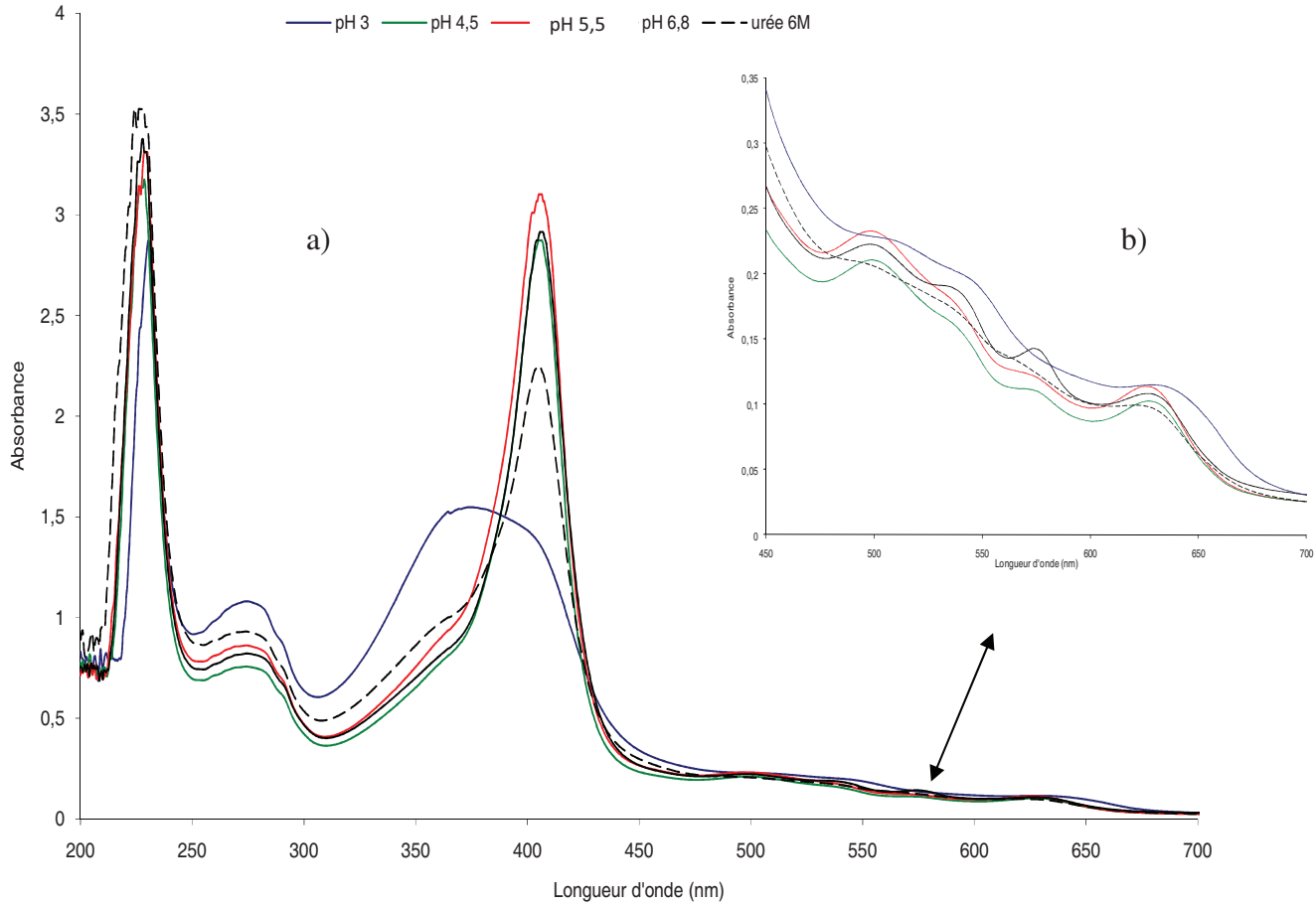


Figure 17: Spectres d'absorption de l'hémoglobine bovine (3µM) en milieu tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1M à différents pH (3 ; 4,5 ; 5,5 et 6,8). a) spectre de 200-700 ; b) de 450-700 nm

Ce balayage de spectre entre 200-700 nm, présente quatre domaines d'absorptions spécifiques. Le premier domaine est celui de longueur d'onde comprise entre 200-250 nm ; il présente un pic d'absorbance maximale situé à 215 nm. Ce pic correspond l'intensité d'absorption des liaisons peptidiques. Le second domaine est celui de longueur d'onde

comprise entre 250-300 nm, l'absorbance observée est représentative des acides aminés aromatiques tels que le tryptophane (280 nm), la tyrosine (275 nm) et la phénylalanine (257 nm). Le troisième domaine compris entre 350-450 nm (Bande de Soret), correspond à l'absorption de l'hème situé à 405 nm, l'absorbance du pic à 405 nm est aussi indicatif d'une variation au niveau de la structure quaternaire de l'hémoglobine (Zhu *et al.,* 2002 ; Brian *et al.,* 2007). Enfin, le dernier domaine situé entre 450-700 nm, contient des pics caractéristiques de l'état d'oxydation de la molécule protéique et de la forme d'hémoglobine en présence.

Dans le cas de l'hémoglobine à pH 3, une diminution de l'absorbance des liaisons peptiques ainsi qu'une augmentation de celle des composés aromatiques sont observées. Les deux premiers domaines ne présentent pas de différences significatives dans les cas de l'hémoglobine dénaturée et de l'hémoglobine native à pH 6,8, 5,5 et 4,5. Par contre, dans le quatrième domaine, c'est-à-dire de 350-450 nm, une forte diminution de l'absorbance de l'hème est observée à pH 3 avec un décalage de la longueur d'onde d'absorbance (compris entre 356-386 nm), tandis que cette valeur varie très faiblement pour des pH supérieurs ou égaux à 4,5. Cette diminution est due à la précipitation de l'hème à ce pH suite à la formation d'agrégats induite par les interactions hème-hème. Cet effet est faiblement observé dans le cas de la dénaturation de l'hémoglobine par l'urée. Comparativement au cas de l'hémoglobine dénaturée, les variations observées dans le cas de l'hémoglobine à pH 3, sont plus importantes. A faible pH, la structure originale de la protéine disparaît.

L'hémoglobine utilisée au cours de ces expériences est un produit commercial, composée de méthémoglobine et d'une part d'oxyhémoglobine. Les analyses spectrophotométriques au sein du domaine 450-700 nm permettent de confirmer et de définir l'état d'oxydation de la protéine en fonction de la variation de pH. L'hémoglobine sous forme oxydée présente deux pics caractéristiques, l'un situé à 540 nm, l'autre à 575 nm. Par contre, dans le cas de la méthémoglobine (Brian *et al.,* 2007), une diminution progressive du pic à 575 nm et une augmentation de celui à 630 sont observées (Antonini et Brunori, 1971), additionné à une présence d'absorption à 500 nm. Des variations à ces longueurs d'onde sont la preuve d'une variation de la structure tertiaire ou quaternaire de l'hémoglobine. Dans cette région, l'hémoglobine à pH 6,8 présente tous les pics caractéristiques des deux formes (oxy et méthémoglobine) d'oxydation de l'hémoglobine. Toutefois, lorsque le pH diminue, les spectres résultants de cette diminution favorisent l'apparition plus marquée d'un profil caractéristique de la méthémoglobine.

c- Etude structurale de l'hémoglobine par le dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire de l'hémoglobine a été effectué de 187-250 nm pour l'analyse des structures secondaires (Kelly *et al.,* 2005 ; Greenfield, 1996), de 250-340 nm (De Laureto *et al.,* 2002 ; Greenfield, 1996) pour les structures tertiaires, et de 340-640 nm (Boffi *et al.,* 1997), pour l'analyse des états d'oxydation de l'hémoglobine en absence de solvants, ou en présence d'urée (6 M) ou avec des concentrations variables en TFE (10, 20, 30 et 50 % (v/v)). Des concentrations de 3µM et de 18,20 µM on été utilisées respectivement pour des détections de 187-250 nm et de 250-640 nm. L'étude des structures secondaires de l'hémoglobine bovine a été réalisée par dichroïsme circulaire, avec 3 µM de protéine native, en milieu tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1 M, à différents pH (3 ; 4,5 ; 5,5 et 6,8). Deux témoins sont utilisés pour interpréter nos résultats : l'hémoglobine native à son pHi (pH 6,8) et l'hémoglobine dénaturée par l'urée 6M. La figure 18 représente les spectres de l'éllipcité molaire en fonction de la longueur d'onde ainsi que le pourcentage d'hélices en fonction du pH.

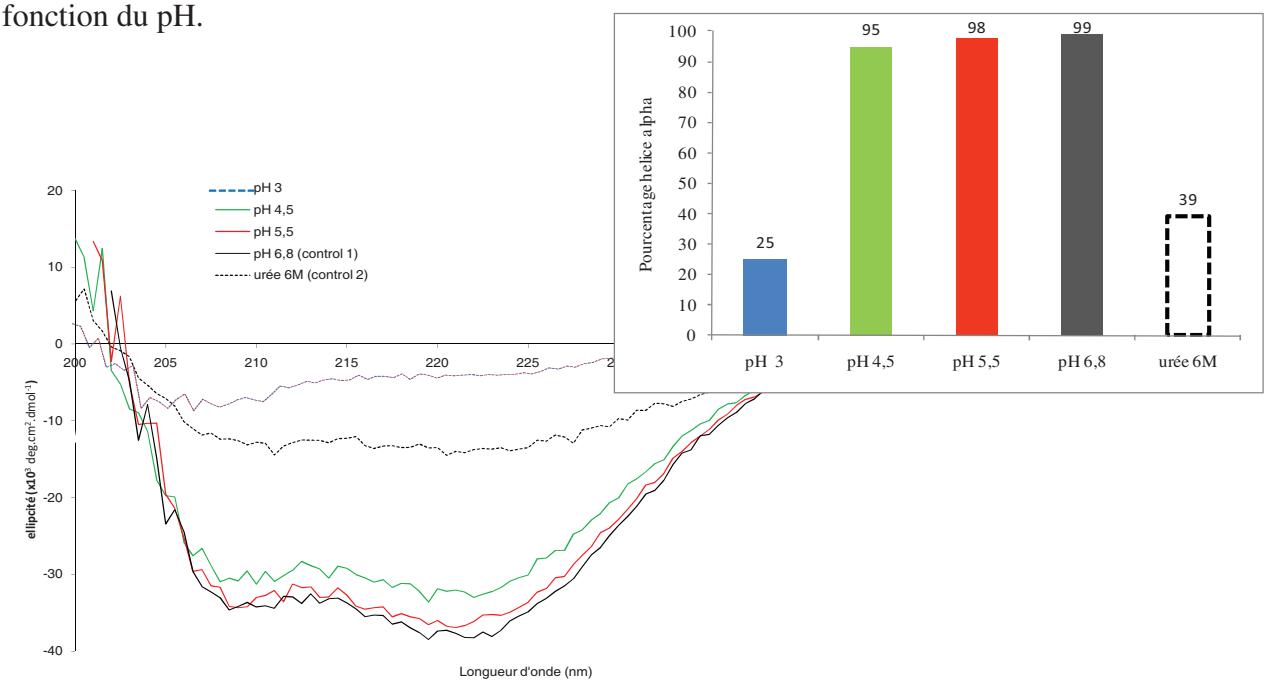


Figure 18 : Spectres de dichroïsme circulaire de l'hémoglobine bovine de 200-250 nm en milieu tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1M à différents pH (3 ; 4,5 ; 5,5 et 6,8) et à l'état dénaturée (urée 6M).

D'après la figure 18, l'éllipcité molaire [θ] augmente avec la diminution du pH. Cette augmentation est très faible de pH 4,5 à pH 6,8. Par contre, à pH 3, le spectre obtenu diffère fortement de ceux obtenus dans les autres pH. Ce qui montre qu'une grande variation structurale se produit lorsque l'hémoglobine est à ce pH. La structure secondaire de l'hémoglobine bovine ne varie que très peu de pH 6,8 à pH 4,5. Ce changement est très significatif seulement à pH 3 et en présence d'urée 6M.

En effet, l'hémoglobine bovine perd une grande partie de ses structures secondaires à pH 3 (il ne reste que 25 % d'hélices α) comme en présence d'urée 6M (39% d'hélices restants). Ces résultats confirment ceux obtenus par De Swati et Girigoswani en 2006, qui, après étude de l'effet du pH (de pH 1,9-11,5) sur la structure de l'hémoglobine, avaient démontré que pour des pH inférieures à 3,5, une forte diminution du pourcentage d'hélice a été observée (jusqu'à 14% à pH 1,9). A pH 3, l'hémoglobine est sous forme dénaturée car la protéine est à un pH très éloignée de son pHi (pH 6,8), le tétramère d'hémoglobine est complètement dénaturé. Cette dénaturation expliquerait la perte d'une grande partie des structures secondaires. Pour les autres pH analysés (4,5 ; 5,5 et 6,8) une perte négligeable est observée car l'hémoglobine est à l'état natif comme l'ont montré les profils chromatographiques de l'hémoglobine dénaturée à l'urée en comparaison avec ceux de l'hémoglobine native (Dubois *et al.,* 2005, Nedjar-Arroume *et al.,* 2008). On obtient en pourcentage d'hélices alpha 95 % à pH 4,5 ; 98 % à pH 5,5 et 99 % à pH 6,8. L'ajout d'urée entraîne une dénaturation de la protéine à la concentration de 6M. Les structures secondaires de l'hémoglobine restent conservées à pH 5,5 et 4,5. Cependant une forte baisse du contenu en hélice est observée lors de la dénaturation induite par l'ajout d'urée 6M et la baisse du pH à 3.

La figure 19 représente le spectre de l'éllipcité molaire en fonction de la longueur d'onde dans l'UV-proche et le visible.

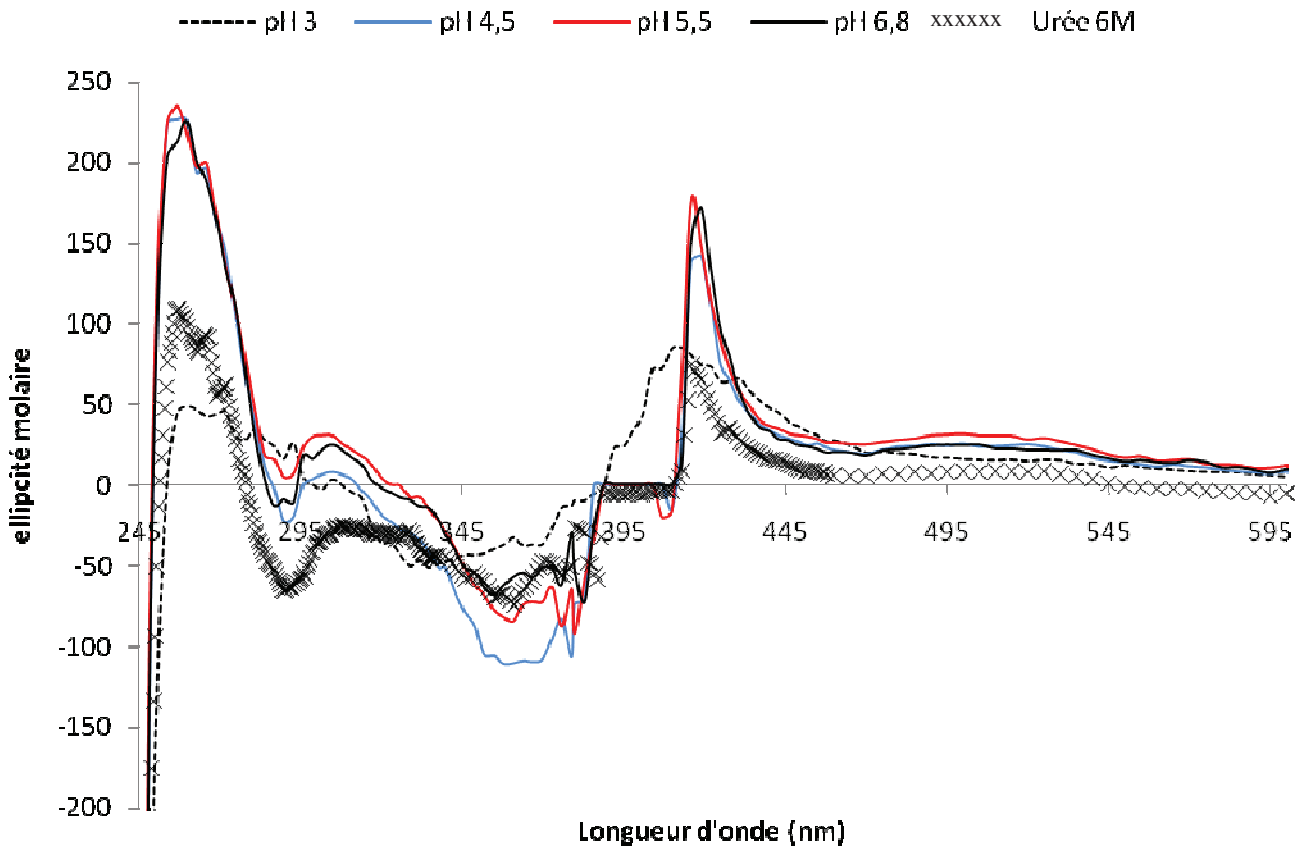


Figure 19 : Spectres de dichroïsme circulaire de l'hémoglobine bovine de 245-595 nm en milieu tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1M à différents pH (3 ; 4,5 ; 5,5 et 6,8) et à l'état dénaturée (urée 6M).

Les analyses de dichroïsme circulaire effectuées de 245-295 nm, montrent qu'il y a différentes variations de l'éllipcité quelque soit le pH étudié :

- Une éllipcité molaire d'intensité positive élevée à environs 260 nm.

- Une éllipcité d'intensité variable située autour de 295 nm, considérée comme étant indicatrice des transitions R-T (Perutz *et al.*, 1974).

- Une éllipcité négative située autour de 367 nm, identifiée par Melki, 1972 au niveau de la chaîne béta, après analyse séparée des chaînes alpha et béta de l'hémoglobine.

- Une éllipcité molaire d'intensité positive élevée située au niveau de la bande Soret (surtout à environs 417 nm). Cette bande Soret donnerait des informations sur l'interaction du groupement prosthétique de l'hème avec les résidus aromatiques environnant (Hsu et Woody,

1972). Aussi, d'après les études réalisées par Melki en 1972, la chaîne α présente un maximum d'éllipcité à 415 nm, et la chaîne β à 420 nm. Cependant l'éllipcité de la chaîne alpha est plus importante que celle de la chaîne béta ; n'ayant pas dissocié les deux chaînes lors de notre étude, nous pouvons dire que le maximum de 417 résulte de la contribution des deux types de chaînes.

Comparativement aux témoins, le spectre de dichroïsme circulaire de l'hémoglobine à pH 6,8 coïncide avec celui de l'hémoglobine bovine à pH 5,5, tandis que celui de l'hémoglobine dénaturée reste largement inférieur. Dans le cas de l'hémoglobine à pH 3, une très forte différence de spectre est observée par rapport au deux témoins. Une très faible intensité de l'éllipcité molaire à 260 nm est à noter, ainsi qu'un très grand décalage et une plus faible intensité de l'éllipcité molaire dans la région de Soret.

Différents auteurs (Griffith et Kaltashov, 2003 ; Nagai *et al.,* 2008 ; Hu *et al.,* 2009) expliquent ces variations structurales, par des changements au niveau du site de liaison de l'oxygène qui conduisent à des modifications au niveau de la structure quaternaire. Cette variation structurale peut aussi s'expliquer par la dissociation du tétramère dans le tampon utilisé. En effet, lorsque le pH diminue, il ya répulsion électrostatique entre les acides aminés cationiques qui prédominent à faible pH. Ce phénomène contribue à la dénaturation de la protéine, à la dissociation du tétramère, et à la perte des structures secondaires présentes. Griffith et Kaltashov (2003) ont démontré par des études de spectrométrie de masse en ionisation électrospray (ESI) que cette dissociation conduit à la formation de sous-unités monomériques fortement non repliées (Griffith et Kaltashov, 2003).

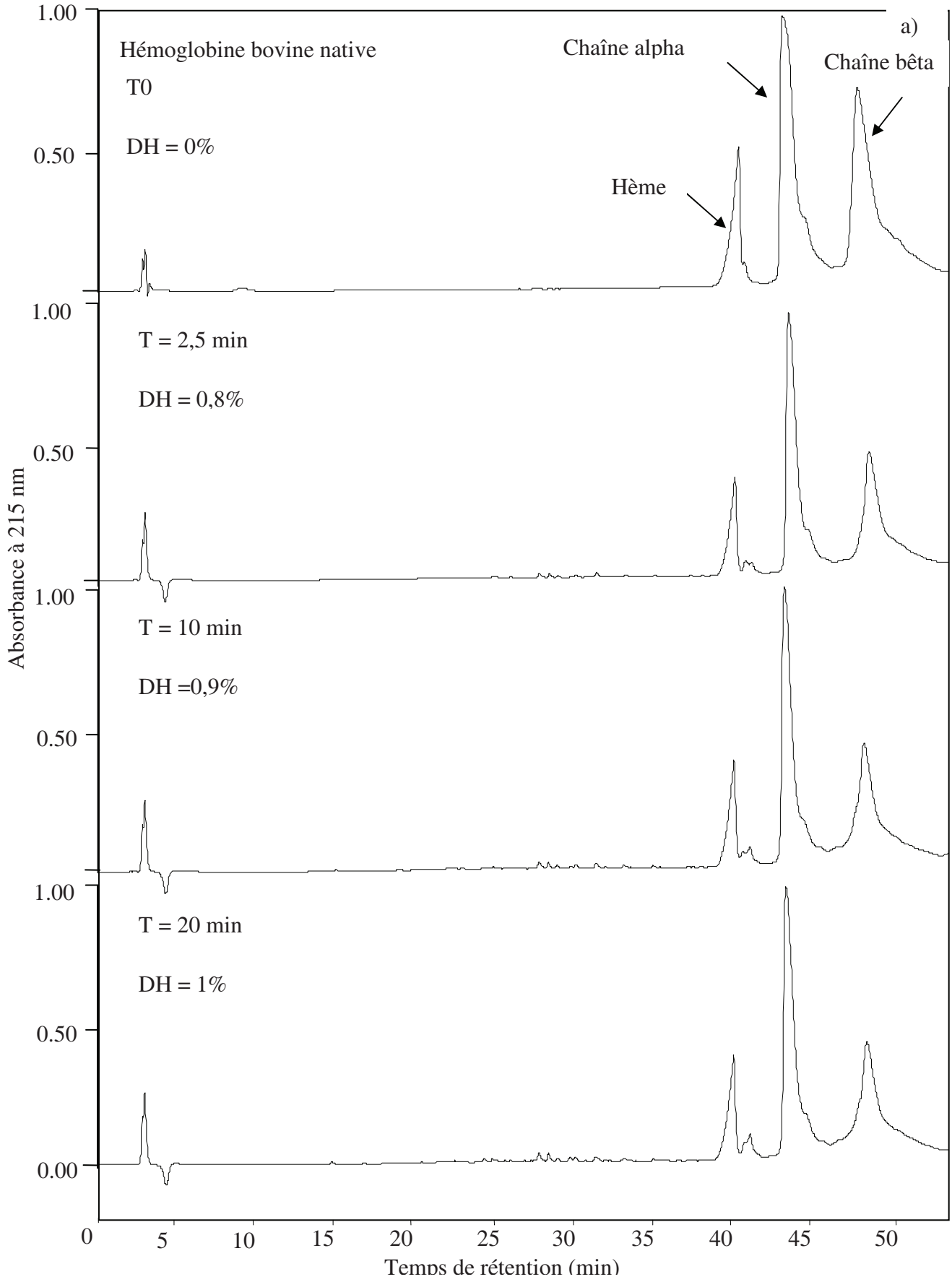
De même Brian et Konerman (2007) ont confirmé cette dissociation par des études spectrométriques de l'hémoglobine à pH 2 et à pH 8. Cette dénaturation se traduit par la perte de la quasi-totalité du pourcentage d'hélice comme le montre le diagramme comparatif (figure 3). La stabilité du tétramère de l'hémoglobine dépend des interactions polaires (par exemple, liaisons hydrogènes) et des interactions hydrophobes (Giangiacomo *et al.,* 2001). La dissociation en fonction du pH de l'hémoglobine, est attribuée à la rupture ou à la formation des liaisons hydrogènes suite à la protonation ou à la déprotonation d'un des résidus impliqués dans la formation des liaisons ou des interactions (Giangiacomo *et al.,* 2001). A pH acide (pH 3), on assiste donc à une très forte rupture des interactions donc, à une forte déstabilisation du

tétramère. Cette déstabilisation est plus importante que celle observée lors de l'utilisation de l'urée.

Les études structurales réalisées par le dichroïsme circulaire, la spectrofluorimétrie et par la spectrophotométrie montrent que la conformation de l'hémoglobine varie en fonction du pH. Cette variation est plus significative à pH 3 qu'à pH 4,5 et 5,5 comparativement au pHi (pH 6,8). Cependant, à pH 5,5, l'hémoglobine présente une conformation plus proche que celle à pH 6,8. Afin d'hydrolyser la protéine à l'état natif, il faudrait choisir le pH auquel l'hémoglobine garde la conformation la plus proche de celle à son pHi et qui n'entraîne pas une inhibition de l'activité de la pepsine. Le pH 5,5 s'avère être un pH d'étude idéal.

I.2- Hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine à pH 5,5

L'hydrolyse de l'hémoglobine bovine (1%) par la pepsine a été réalisée en condition native et en condition dénaturante (en présence d'urée 6 M) en milieu tampon acide acétique /acétate de sodium 0,1 M et à pH 5,5 et à 23°C. La réaction d'hydrolyse est arrêtée à différents temps d'hydrolyse par ajout de tampon borax 0,32 M, pH 12,5. Les hydrolysats sont ensuite analysés par CLHP après différents temps d'hydrolyse. Les figures 20 et 21 représentent respectivement les profils chromatographiques d'hydrolysats pepsique de l'hémoglobine à l'état natif et l'état dénaturé à pH 5,5.


a)
Hémoglobine bovine native
T0
DH = 0%
Chaîne alpha
Chaîne bêta
Hème
T = 2,5 min
DH = 0,8%
T = 10 min
DH =0,9%
T = 20 min
DH = 1%
Absorbance à 215 nm
1.00
0.50
0.00
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Temps de rétention (min)

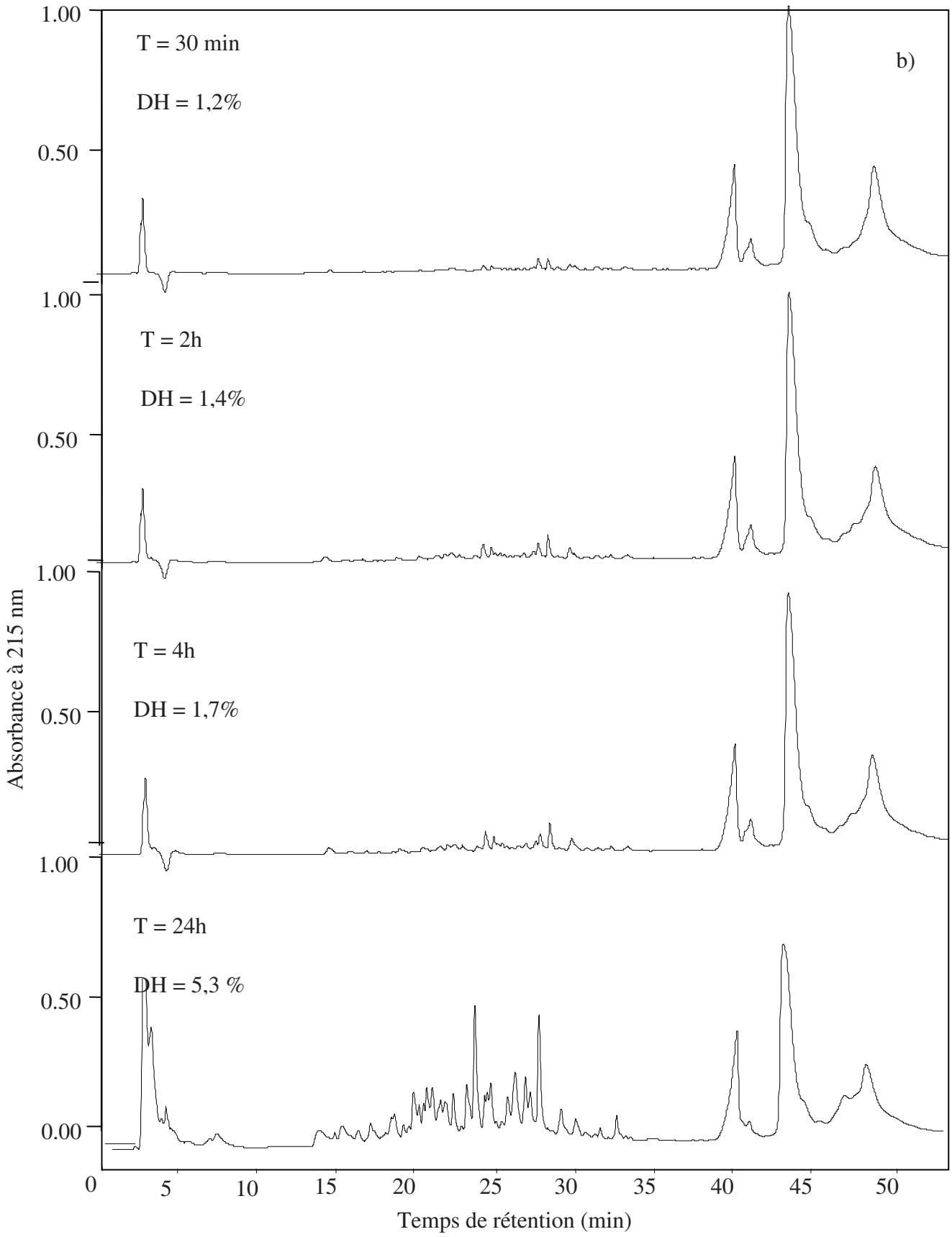
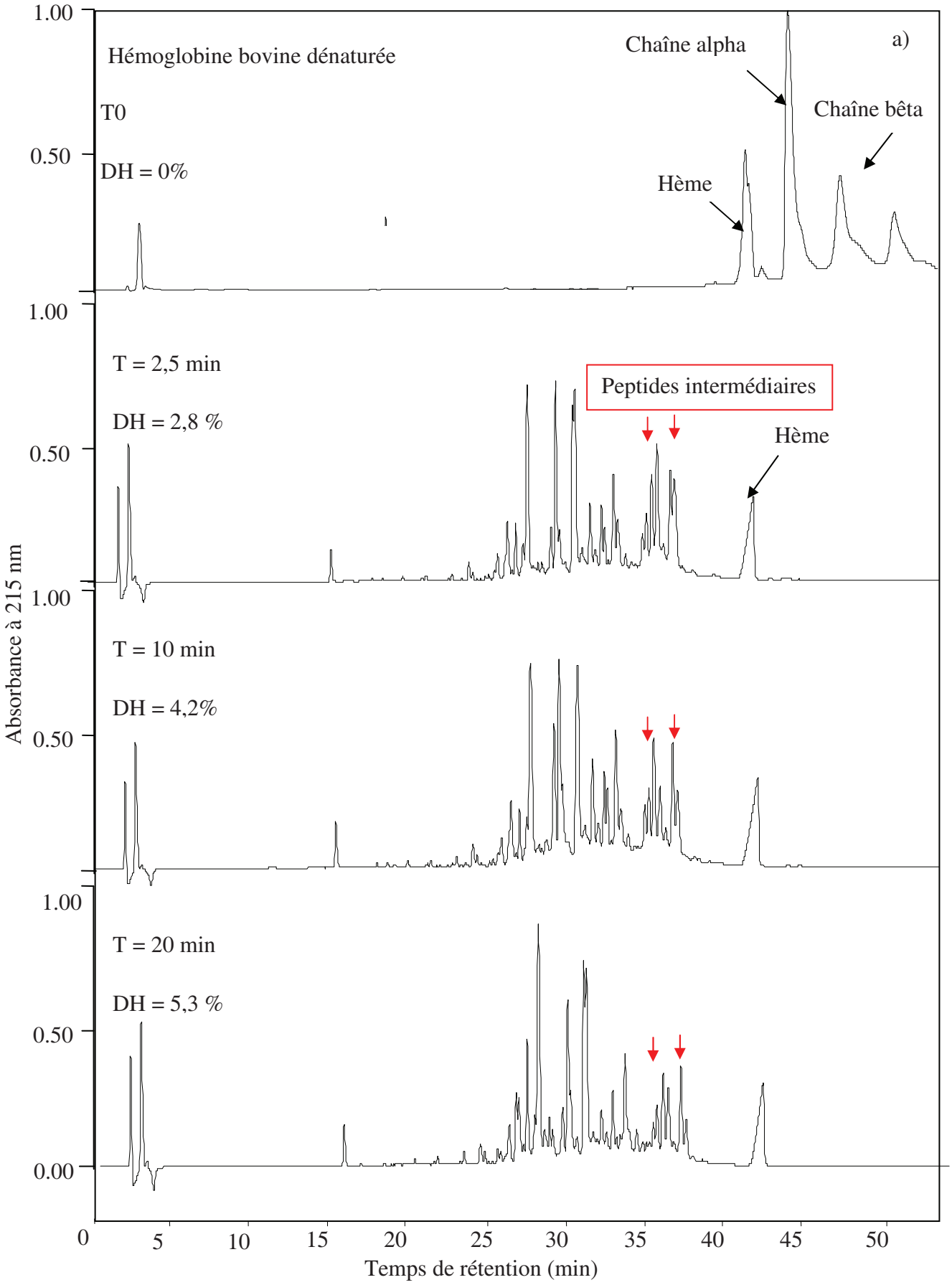


Figure 20 : Profils chromatographiques (a) et (b) de la cinétique d'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine native 1% (p/v) à pH 5,5 et à 23°C


Hémoglobine bovine dénaturée
T0
DH = 0%
Chaîne alpha
Chaîne bêta
Hème
a)
T = 2,5 min
DH = 2,8 %
Peptides intermédiaires
Hème
T = 10 min
DH = 4,2%
T = 20 min
DH = 5,3 %
Absorbance à 215 nm
1.00
0.50
0.00
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Temps de rétention (min)

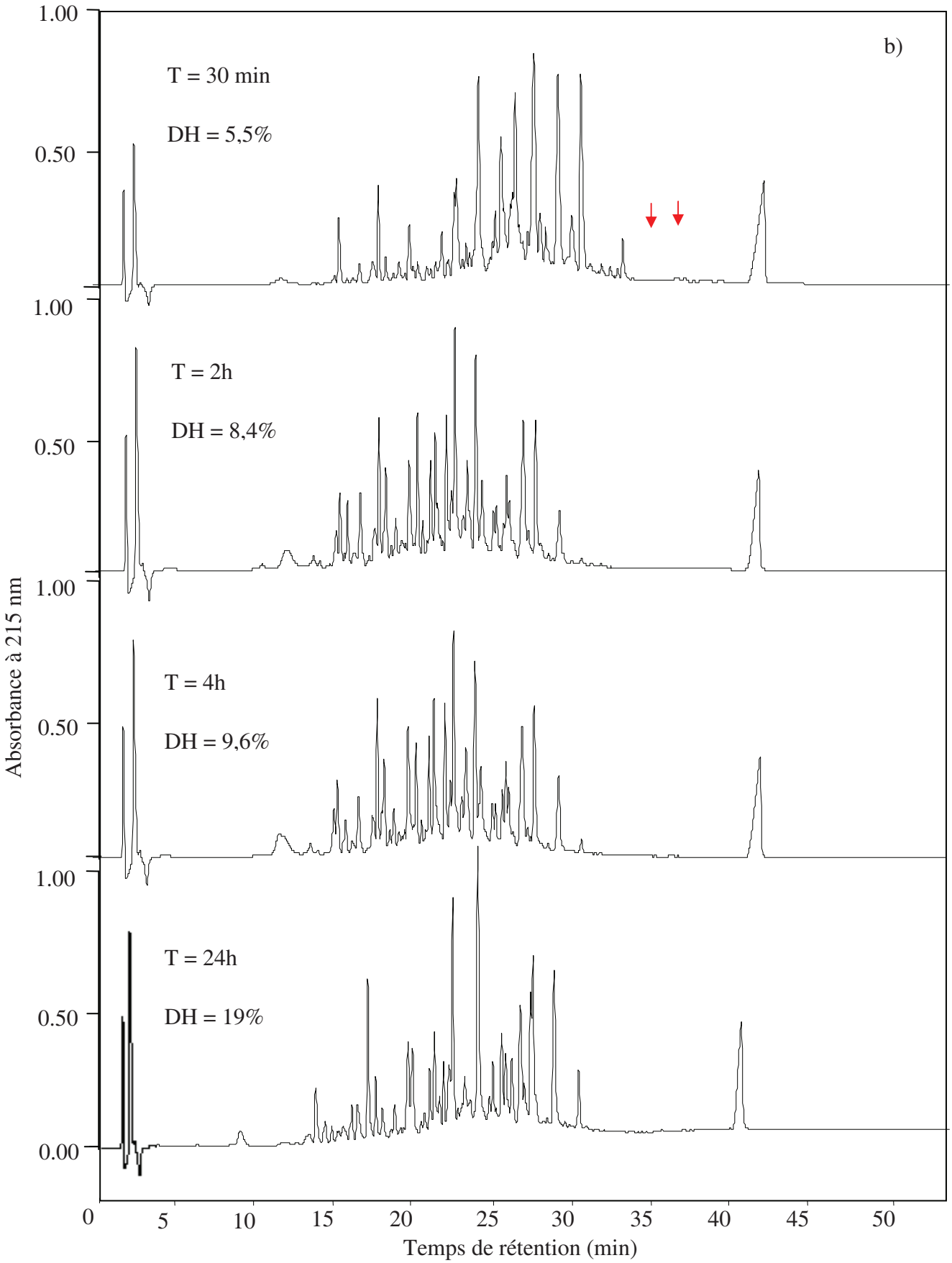


Figure 21 : Profils chromatographiques (a) et (b) de la cinétique d'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine dénaturée 1% (p/v) par l'urée 6M à pH 5,5 et à 23°C.

Comme le montre la figure 20, au cours de l'hydrolyse en condition native, les premiers peptides apparaissent dès le début de l'hydrolyse (1min). Ces mêmes peptides demeurent durant toute l'hydrolyse mais seule la concentration de ces peptides augmente il s'agit d'un mécanisme d'hydrolyse de type « one by one », de plus les chaînes (α et β) du tétramère demeurent durant l'hydrolyse. Comme décrit par Linderstrom-Lang en 1953, l'hydrolyse des protéines à l'état natif se fait suivant un mécanisme de type « one by one » (Linderstrom-Lang , 1953). L'hydrolyse de l'hémoglobine bovine réalisée par plusieurs auteurs à pH 4,5, en condition native suit ce même mécanisme (Froidevaux *et al.,* 2001 ; Dubois *et al.,* 2005 ; Nedjar-Arroume *et al.,* 2006). En effet en condition native à pH 5,5 la molécule protéique a une conformation très proche de celle à pH 6,8. Dans cette conformation structurale de l'hémoglobine, l'accessibilité de l'enzyme demeure faible. L'enzyme hydrolyse donc une mole d'hémoglobine à la fois ce qui conduit à la production de peptides finaux de petites tailles.

Par contre en présence d'urée (figure 21), en condition dénaturante, dès le début de l'hydrolyse, apparaissent des peptides intermédiaires de taille plus grande, qui sont ensuite hydrolysés en peptides finaux de plus petites tailles de manière progressive au cours du temps. Il s'agit d'un mécanisme « zipper » (Linderstrom-Lang, 1953). De plus les chaînes α et β du tétramère sont tout de suite entièrement hydrolysées par la pepsine ; la dissociation du tétramère d'hémoglobine en deux hétérodimères, favorisant l'accessibilité de l'enzyme pour son substrat (hémoglobine). Les mêmes résultats ont précédemment été obtenus par plusieurs auteurs mais à un pH d'étude de 4,5, permettant ainsi l'obtention de peptides actifs (Froidevaux *et al.,* 2001 ; Choisnard *et al.,* 2002 ; Dubois *et al.,* 2005 ; Nedjar-Arroume *et al.,* 2008). Le mécanisme « zipper » est aussi confirmé à pH 5,5 en présence d'urée 6M.

II- Hydrolyse de pepsique de l'hémoglobine en milieu hydroalcoolique

Les résultats de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine montrent qu'en milieu purement aqueux, avec ou sans agent dénaturant, les mécanismes mis en jeu sont soit de type « one by one », soit de type « zipper ». L'obtention de tels mécanismes étant aussi en relation avec la structure protéique, c'est surtout l'action des solvants organiques structurants qui a été retenue. L'utilisation de solvants structurants pourrait permettre d'une part, de modifier la conformation de l'hémoglobine (modification des structures tertiaires et quaternaires) sans entraîner une modification des structures secondaires. D'autre part, l'ajout de solvants organiques pourrait favoriser la conservation des structures en hélices alpha des peptides formés (compte tenu de la forte proportion en hélices de l'hémoglobine), l'obtention de peptides hydrophobes, mais aussi la stabilisation des peptides formés. Afin d'obtenir toutes ses caractéristiques dans un seul hydrolysat avec une faible population peptidique, le choix de l'hydrolysat intéressant tiendra compte de l'analyse chromatographique effectuée.

II.1- Hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine en présence de TFE

De nombreux d'auteurs (Buck *et al.,* 1993 et 1995 ; Buck, 1998 ; Roccatano *et al.,* 2002 ; Povey *et al.,* 2007) ont largement décrit le TFE comme un solvant possédant la capacité de conserver et même d'induire la formation de structures secondaires tout en perturbant les structures tertiaires et quaternaires. Compte tenu de ces propriétés, le TFE a été utilisé pas seulement comme cosolvant permettant d'induire les variations structurales précitées comme ce fût le cas jusqu'aujourd'hui, mais en plus, ce solvant va être introduit dans un procédé d'hydrolyse afin de favoriser la production des peptides actifs, hydrophobes et structurés. L'analyse de l'effet de ce solvant sur la stabilité de l'activité de la pepsine constitue la première étape.

Etude de la stabilité de l'activité de la pepsine en présence de TFE :

Afin d'évaluer la stabilité de l'activité pepsique en présence de TFE, l'enzyme (0,1 g/l) a préalablement été incubée durant 20min, 1h et 24h à 23°C, en milieu tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1 M, pH 5,5 contenant 0%, 10%, 20% 30% ou 50% de TFE. Après incubation, 200 µl de chaque solution ont ensuite été retirées puis introduites dans un milieu réactionnel (qsp 1,2 ml) contenant 3,3g/l d'hémoglobine en milieu tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1 M, pH 2. La réaction est stoppée après 5min par ajout de 2ml

de TCA 5%. Le pourcentage d'activité est déterminé par lecture spectrophotométrique à 280 nm, en considérant que cette activité est de 100% en absence de solvant.

La figure 22, met en évidence le pourcentage d'activité résiduelle de l'enzyme en fonction du milieu d'incubation à des temps variables.

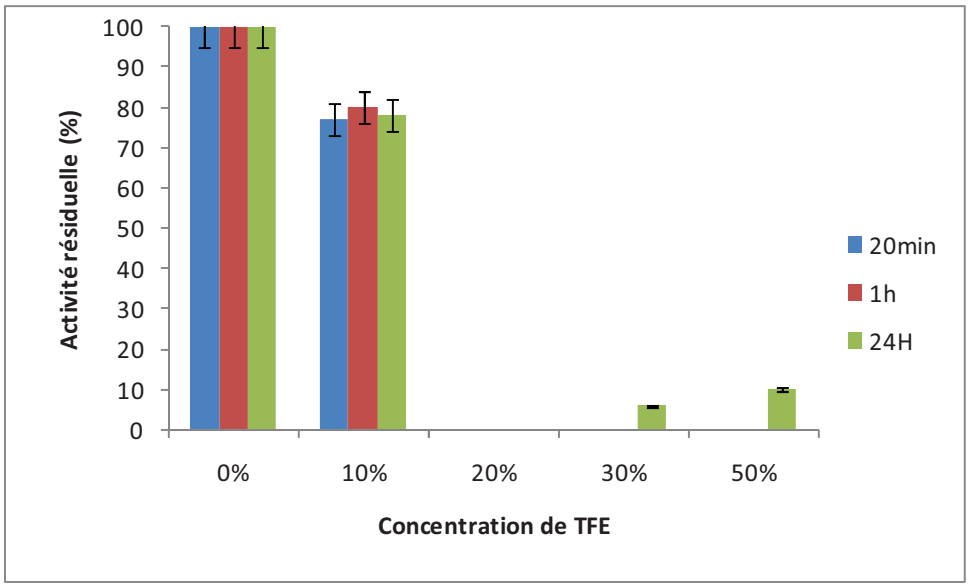


Figure 22 : Etude de la stabilité de l'activité enzymatique de la pepsine en absence et en présence de concentrations variables de TFE (10, 20, 30 et 50%).

Les résultats de l'analyse de l'activité résiduelle montre que la pepsine reste fortement active seulement en présence de 10% de TFE, cela peut importe le temps d'incubation, ce qui n'est pas le cas en présence de concentrations supérieures à 10%. A partir de 24h d'incubation, une très faible activité résiduelle a cependant été décelée. L'activité catalytique d'une enzyme en milieu aqueux est influencée par un grand nombre de facteurs : l'intégrité structurale et dynamique de l'enzyme, la diminution de la mobilité conformationnelle de la structure protéique, le changement de la polarité du microenvironnement de l'enzyme et la perte des résidus d'eau à la surface de la protéine (Simon *et al.,* 2007). Au niveau des protéines aspartiques comme la pepsine, 17 molécules d'eau ont été identifiées comme étant impliquées dans le maintient de la géométrie du site actif responsable de la fonction catalytique et dans la stabilité de l'enzyme. Ces résultats pourraient suggérer que de fortes concentrations de TFE sont à l'origine de la déstabilisation des interactions entre les molécules d'eau et l'enzyme, entraînant ainsi des modifications structurales et donc la perte de l'activité.

En effet, la fonction d'une protéine est liée à sa structure tertiaire, et à sa conformation (Voet 2007b, Simon *et al.,* 2007). Afin de suivre l'activité pepsique, une étude de structure de la pepsine a été effectuée par la spectrofluorimétrie et par la spectrophotométrie en présence de concentrations variables de TFE (10, 20, 30 et 50% (v/v)) en milieu tampon acide acétique/ acétate de sodium pH 5,5.

Les études spectrofluorimétriques sont effectuées à une longueur d'onde d'excitation de 290 nm et l'intensité d'émission est enregistrée de (300-450 nm). La figure 23 montre l'intensité de la fluorescence de la pepsine en fonction de la longueur d'onde.

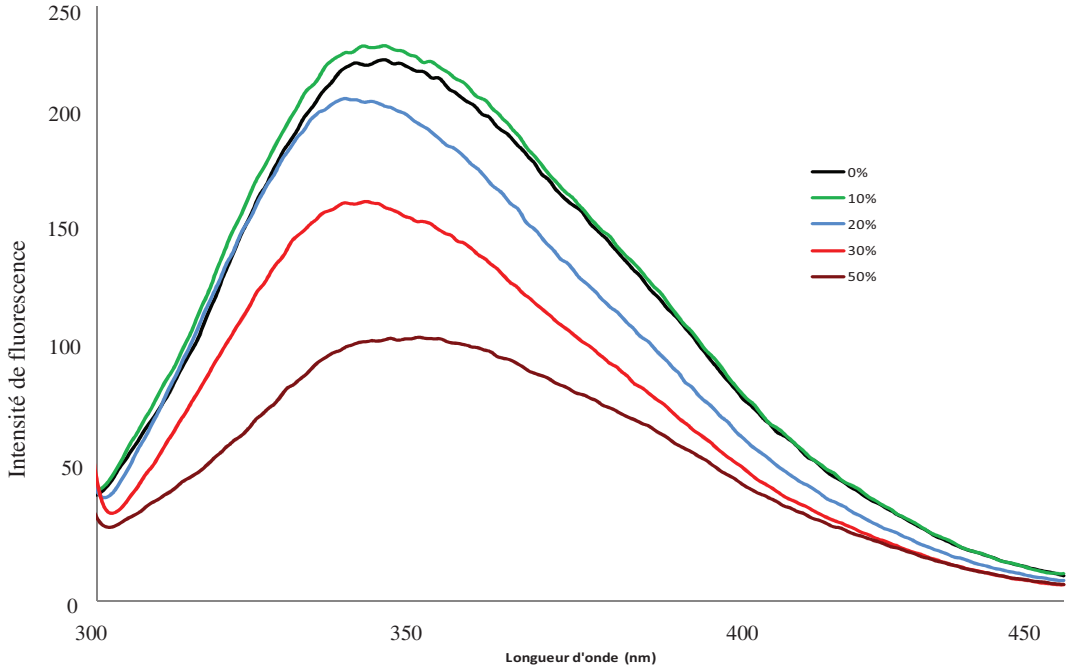


Figure 23 : Spectre de fluorescence de la pepsine en présence de TFE à concentrations variables

Les spectres de fluorescence en absence et en présence de 10% de TFE sont quasi identiques avec une intensité maximale d'émission (λm) située à 348,5 nm. Cependant, de 20-50% l'intensité de fluorescence varie fortement en fonction de la concentration en TFE. Cette intensité diminue avec l'augmentation de la concentration en TFE, avec un léger décalage du maximum d'émission vers des longueurs d'onde plus faibles comprises entre 335-340 nm. La valeur de λm est caractéristique des tryptophanes situés en surface de la protéine dans un environnement fortement polaire. La diminution linéaire de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration de TFE ne fait que refléter l'influence directe de la polarité du

milieu environnant sur les chromophores exposés à la surface de la protéine. Les résultats obtenus permettent de dire que la conformation de la pepsine varie de manière peu significative en présence de 10% de TFE. Elle conserverait donc sa structure d'origine à cette concentration en TFE. Lorsque la concentration dépasse 10%, une variation plus significative est à noter. Ces résultats confirment les observations faîtes dans le cas de l'hémoglobine bovine.

L'étude spectrophotométrique de la pepsine a été effectuée en milieu tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1M pH 5,5 avec une concentration de 3 µM. L'intensité d'absorption est suivie de 200-500 nm. La figure 24 montre l'intensité d'absorption de la pepsine en fonction de la longueur d'onde.

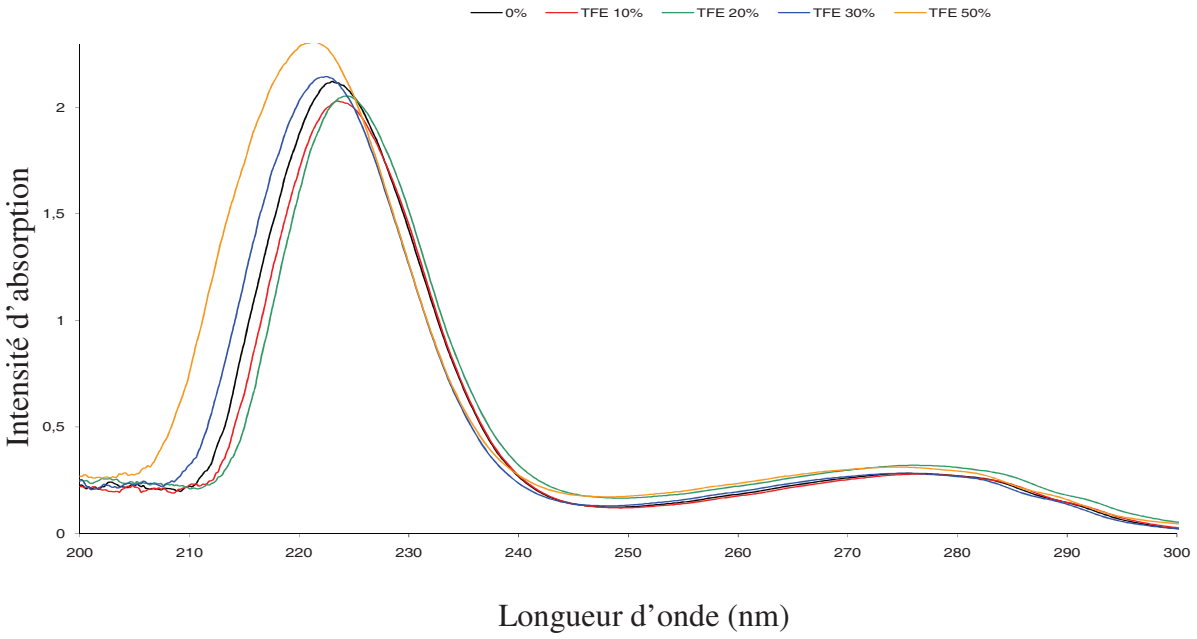


Figure 24: Spectre d'absorbance de la pepsine en présence de TFE à concentrations variables (10, 20, 30 et 50 % v/v)

Une faible variation de l'intensité d'absorbance de la pepsine est observée. Cependant, la longueur d'onde maximale (environ à 222 nm) subit un très faible léger décalage (de 222,2-222,6 nm) en présence de solvant. Cette longueur d'onde est caractéristique des liaisons peptidiques. Pour des concentrations de TFE plus faibles (10 et 20%) l'intensité d'absorption est légèrement inférieure à celle de la pepsine sans solvant pH 5,5 (témoin). Par contre pour des concentrations plus fortes, cette intensité demeure supérieure à celle du témoin. Une deuxième intensité d'absorption plus faible, située entre 270-280 nm est aussi présente sur le spectre. Elle représente l'intensité d'absorption des acides aminés aromatiques. A ce niveau

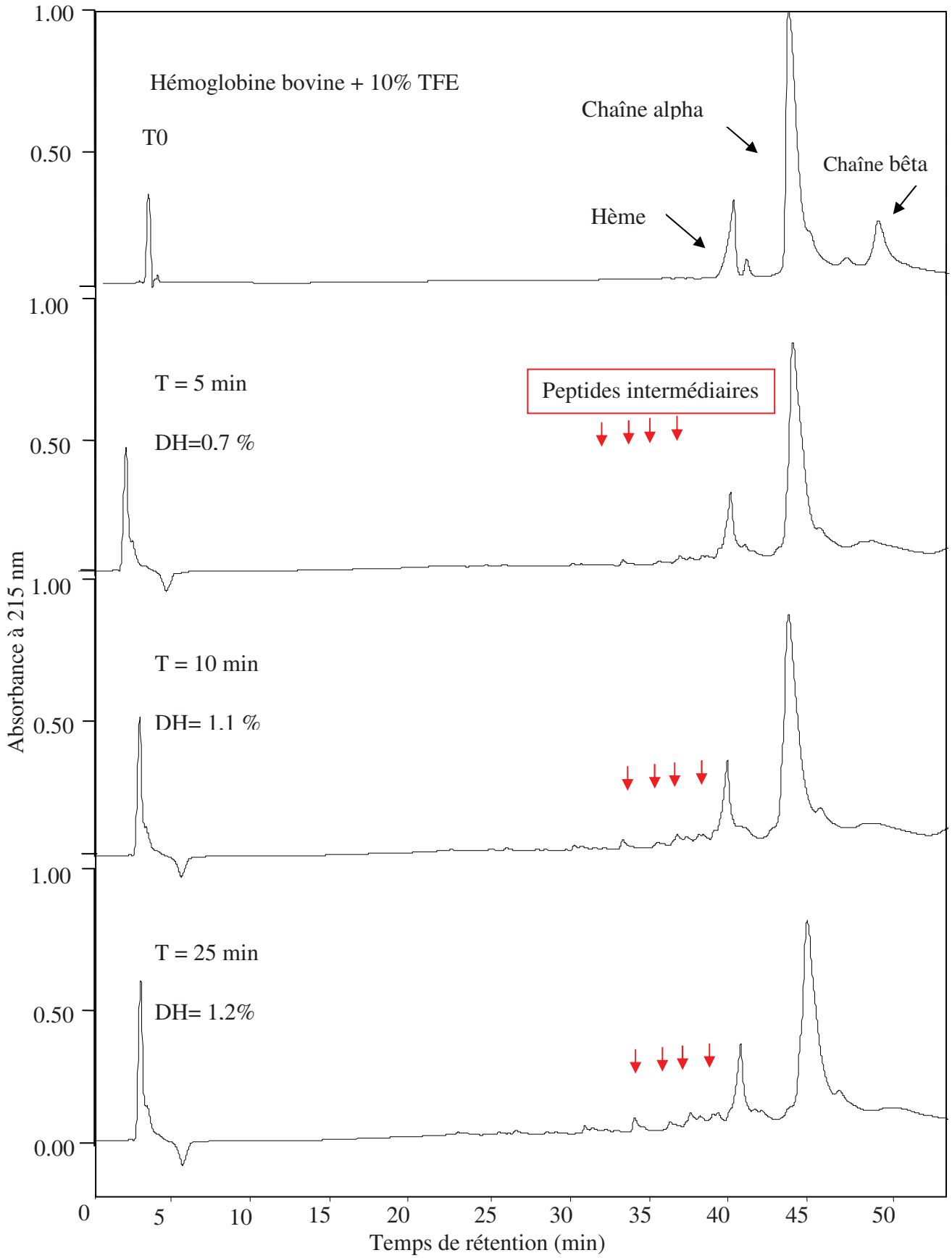
aucune différence significative n'existe entre la pepsine témoin et la pepsine en présence de concentrations différentes en solvant.

Les analyses spectroscopiques effectuées (spectrofluorimétrie et spectrophotométrie) montrent que l'effet du TFE est décelable au niveau de la spectrofluorimétrie où seule la concentration de 10%, n'entraîne pas de différence spectrale par rapport au témoin (sans solvant : 0%).

Ces analyses permettent de prédire l'activité de la pepsine aux différentes concentrations de TFE. En effet l'activité de l'enzyme étant directement liée à sa structure tertiaire, ces résultats prédisent que la pepsine restera stable en présence de 10% de TFE tandis qu'en présence de 20%, 30% et 50% de TFE l'enzyme pourrait perdre son activité.

II.2- Etude comparative des hydrolysats en absence et en présence de TFE

Une étude cinétique de l'hémoglobine bovine a été réalisée en présence de TFE 10% (v/v) en milieu tampon acide acétique /acétate de sodium 0,1M pH 5,5 pendant 24h. Les hydrolysats issus ont été centrifugés à 4000 trs/min pendant 15 min, puis une analyse chromatographique a ensuite été effectuée. La figure 25 représente les résultats chromatographiques des hydrolysats obtenus après 5 min, 10 min, 25 min, 1h, 2h, 3h et 24h des hydrolysats obtenus en présence de 10% (v/v) de TFE .


Hémoglobine bovine + 10% TFE
T0
Chaîne alpha
Chaîne bêta
Hème
Peptides intermédiaires
T = 5 min
DH=0.7 %
T = 10 min
DH= 1.1 %
T = 25 min
DH= 1.2%
Absorbance à 215 nm
Temps de rétention (min)
1.00
0.50
0.00
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50

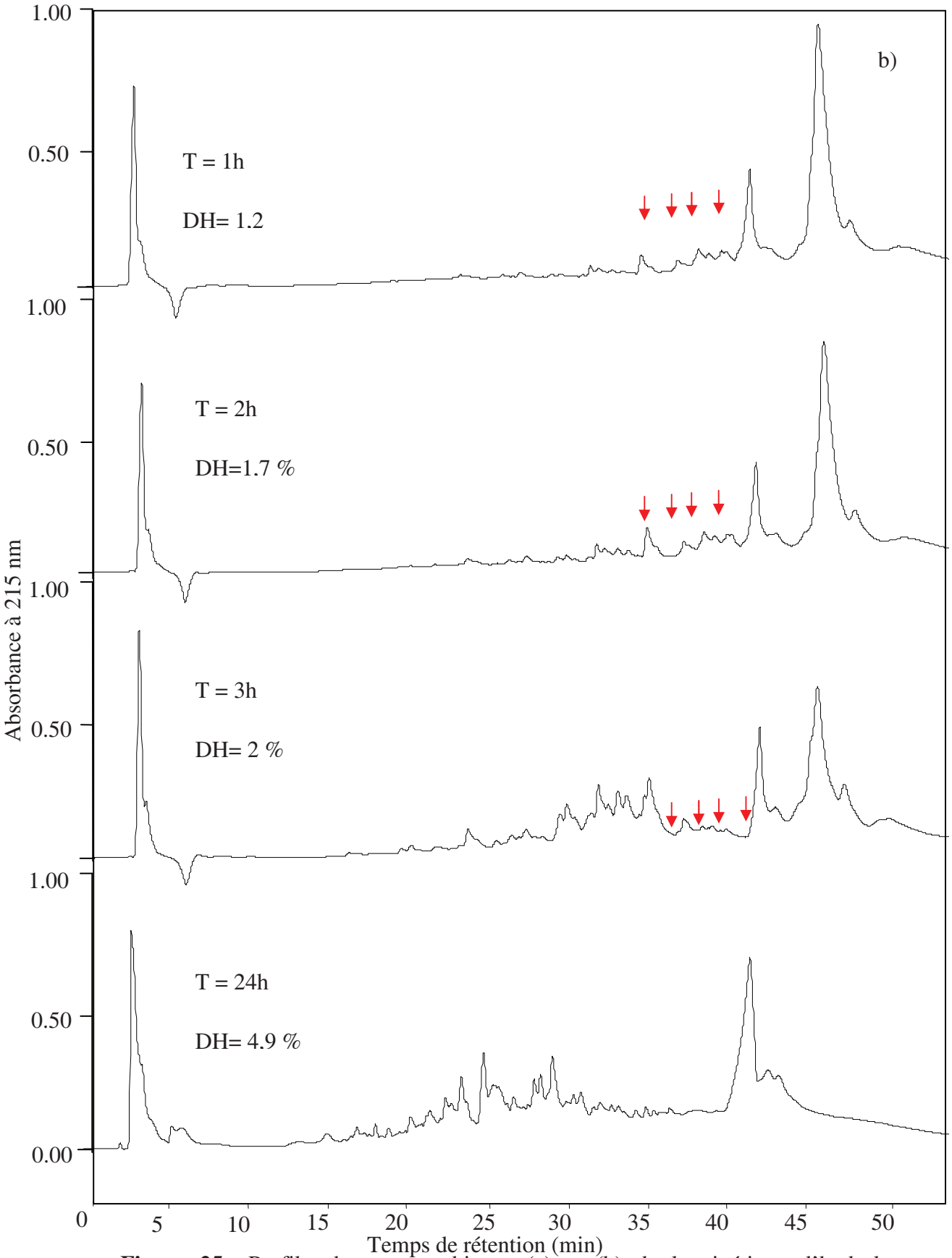


Figure 25 : Profils chromatographiques (a) et (b) de la cinétique d'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine en présence de 10% de TFE (v/v) à pH 5,5 et à 23°C.

L'étude comparative de l'hydrolyse de l'hémoglobine native à pH 5,5 (figure 20) et de l'hémoglobine en présence de 10 % de TFE, montre que dans le cas de 10 % de TFE les pics représentatifs de l'hème et de la chaîne béta ont une intensité faible comparativement à celle des pics de l'hémoglobine en absence de solvant. Cette faible intensité est due à la précipitation observée lors de l'ajout de TFE. Plus le temps d'hydrolyse est long plus la précipitation (la formation d'agrégats) s'accentue. Alors qu'en présence de 50 % de TFE, seulement une très faible précipitation est observée. Ce phénomène est semblable à celui préalablement observé par différent auteurs. En effet, comme il a précédemment été observé dans le cas d'autres protéines telles que la protéine L, une protéine de grande taille localisée à la surface du virus de l'hépatite B et qui interagit avec les récepteurs cellulaires hôtes, le TFE entraînait la formation d'agrégats dont la concentration augmentait avec le temps (Cellmer *et al.*, 2006). Dans le cas de α-chymotrypsine par exemple, l'ajout de faibles concentrations de TFE (12,5–40 % (v/v)) entraîne la formation d'un grand nombre d'agrégats; cependant, pour des concentrations supérieures à 40%, il n'ya aucune formation d'agrégat (Rezhaei-Ghaleh *et al.,* 2008).

L'hémoglobine bovine est hydrolysée seulement en présence de TFE 10%. Cependant l'intensité, donc la concentration de ces pics demeure très faible. L'hydrolyse en présence de 10% de TFE commence dès 1min et se poursuit jusqu'à 24h.

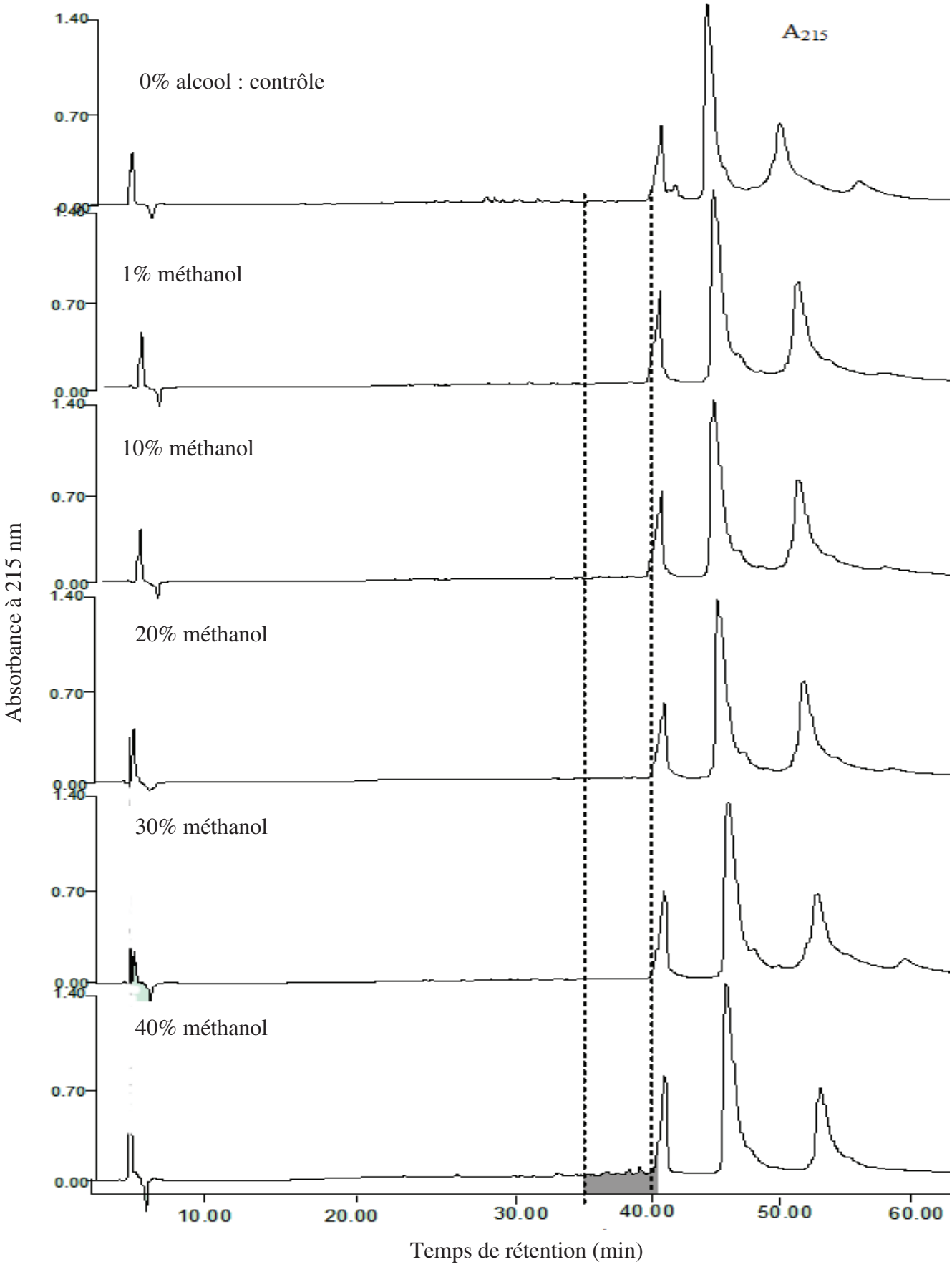
L'une des causes principales de l'effet du TFE sur l'hydrolyse serait l'effet du solvant sur l'enzyme. Comme il a été démontré (Zhang *et al.,* 2000), le TFE en présence de concentrations supérieures à 10% est responsable de la perte d'activité de certaines enzymes même si les structures secondaires sont conservées. Ces résultats observés confirment les prédictions faîtes après analyse par fluorescence de la pepsine (paragraphe II-2), qui montraient une forte variation de structure en présence de 20, 30 et 50% de TFE. En présence de 10% de TFE, le spectre de fluorescence de la pepsine coïncidait avec celui de la pepsine en absence de solvant.

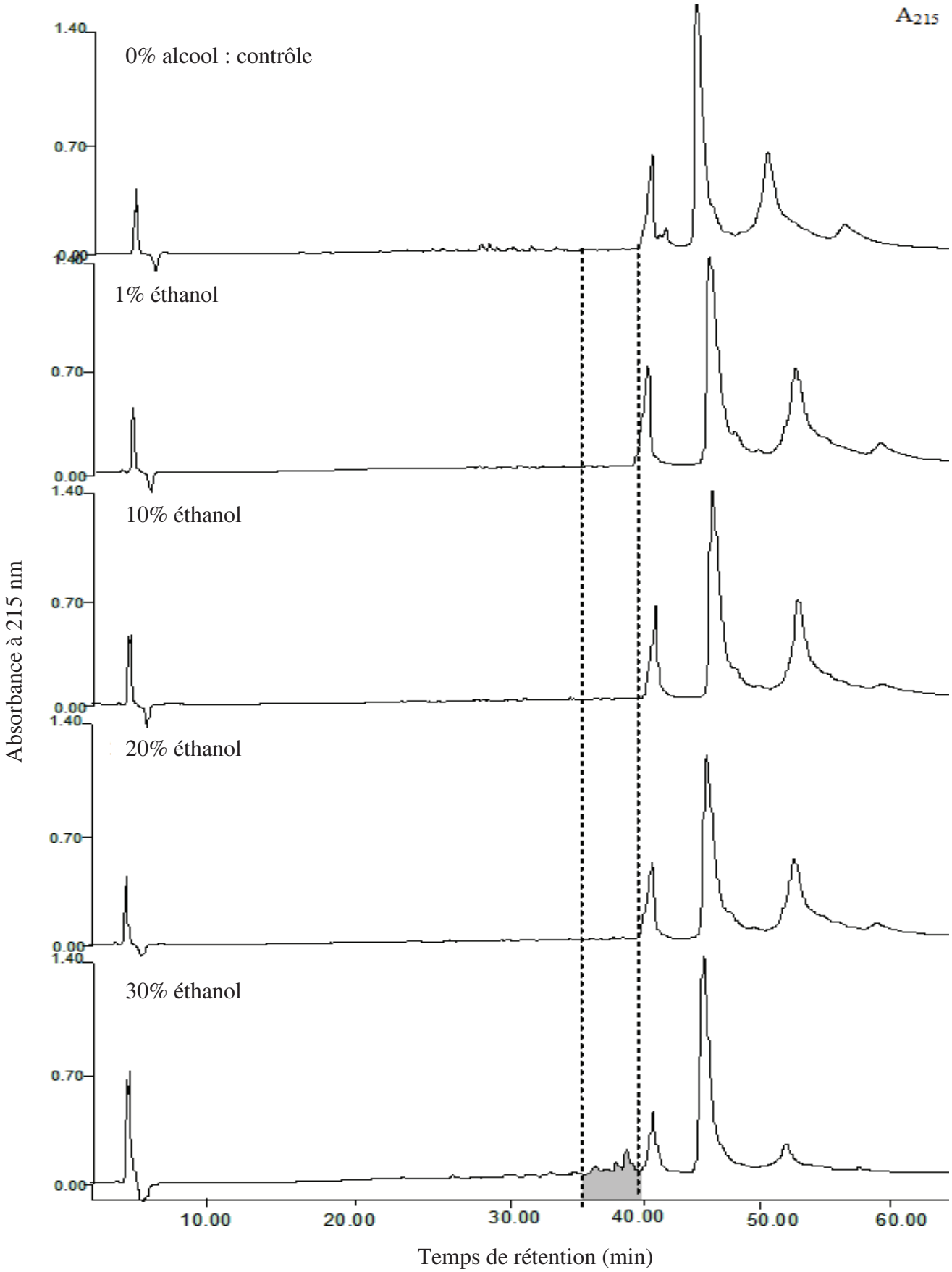
La présence de peptides intermédiaires et de la faible population peptidique confirme que l'utilisation de solvants structurants pourrait permettre d'obtenir des peptides aux caractéristiques intéressantes. Cependant l'utilisation d'autres solvants structurants pourrait permettre d'améliorer l'obtention de ces peptides compte tenu de leur très faible concentration.

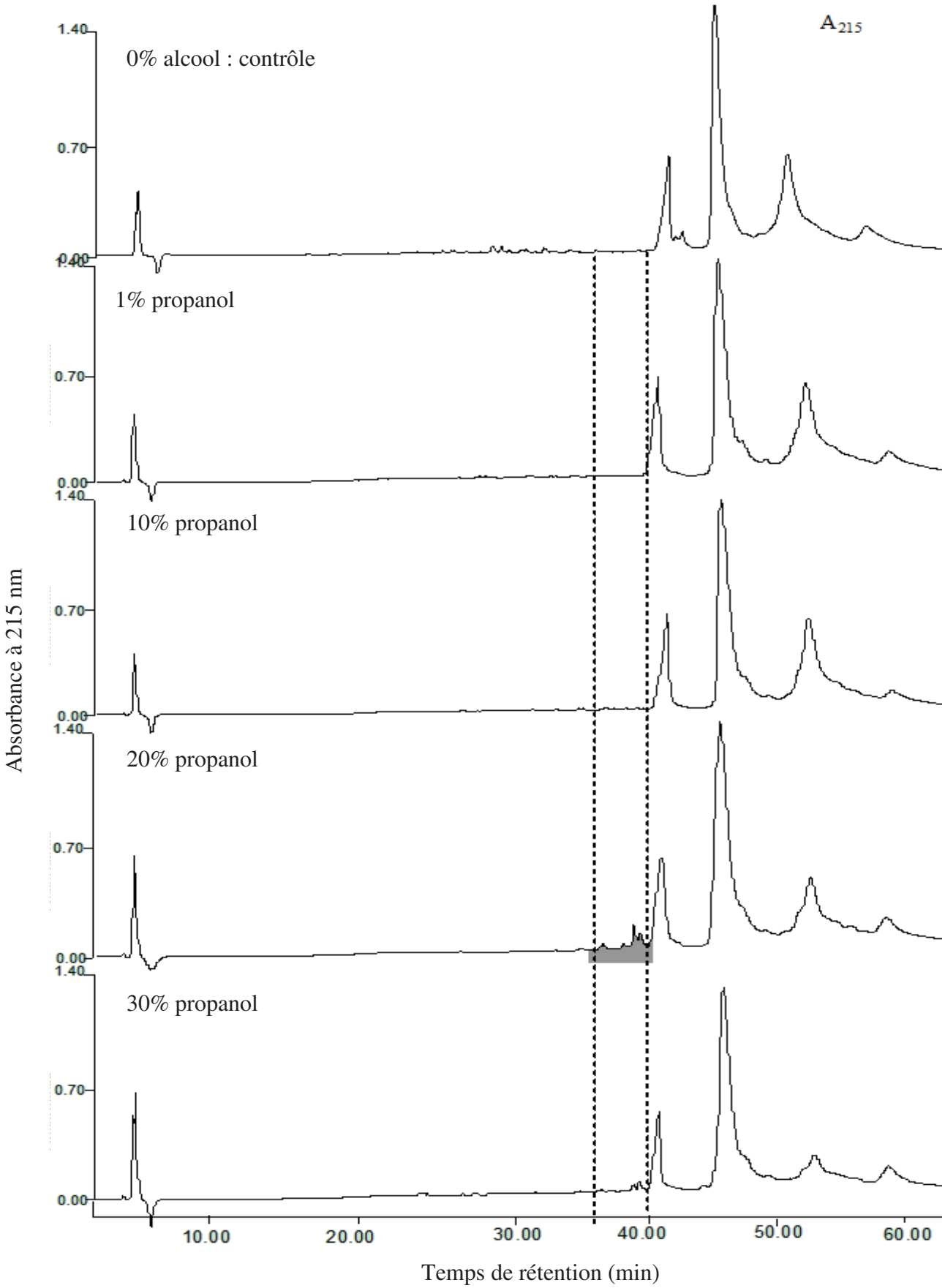
III- Amélioration de l'obtention des peptides intermédiaires et hydrophobes

III.1- Hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine en présence de méthanol, d'éthanol, de propanol ou de butanol

L'amélioration de la concentration des peptides précédemment obtenus lors de l'emploi du TFE, se fait par l'utilisation d'autres alcools tels que le méthanol, l'éthanol, le propanol ou le butanol. Afin de définir les concentrations idéales d'alcools qui favorisent l'obtention de peptides intermédiaires, le méthanol, l'éthanol, le propanol à 1, 10, 20, 30% (v/v) dont 40% seulement dans le cas du méthanol ou le butanol à 1, 2,5, 5 et 10% (v / v) ont été utilisés au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine, à pH 5,5 et à 23°C. Ces concentrations ont été choisies d'une part, afin de réaliser l'hydrolyse en solution homogène (cas de l'emploi de butanol à des concentrations inférieures à 10%). Et d'autre part, afin d'éviter un effet inhibiteur de l'alcool vis à vis de la pepsine. En effet, en présence de certains alcools comme l'éthanol, la pepsine est inhibée par des concentrations atteignant 40% (v/v). Une étude cinétique (de 1min- 24h) de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine a donc été réalisée en présence des alcools et aux concentrations précitées. Les hydrolysats obtenus sont ensuite séparés par CLHP. Quelques résultats chromatographiques sont aussi présentés dans la figure 26. Cette figure 26 représente les profils chromatographiques des hydrolysats obtenus après un temps d'hydrolyse de 2,5 min en présence de ces alcools, l'hydrolysat de l'hémoglobine bovine en absence d'alcool servant d'échantillon témoin (control). Le récapitulatif des résultats de l'analyse chromatographique peut être illustrés par le tableau 10. Ce tableau met en évidence la présence ou l'absence des peptides intermediaires pour tous les hydrolysats réalisés en présence de concentrations variables des différents alcools.


A215
0% alcool : contrôle
1% méthanol
10% méthanol
20% méthanol
30% méthanol
40% méthanol
1.40
0.70
0.00
Absorbance à 215 nm
10.00
20.00
30.00
40.00
50.00
60.00
Temps de rétention (min)


A215
0% alcool : contrôle
1% éthanol
10% éthanol
20% éthanol
30% éthanol
1.40
0.70
0.00
Absorbance à 215 nm
10.00
20.00
30.00
40.00
50.00
60.00
Temps de rétention (min)


A215
0% alcool : contrôle
1% propanol
10% propanol
20% propanol
30% propanol
1.40
0.70
0.00
Absorbance à 215 nm
10.00
20.00
30.00
40.00
50.00
60.00
Temps de rétention (min)

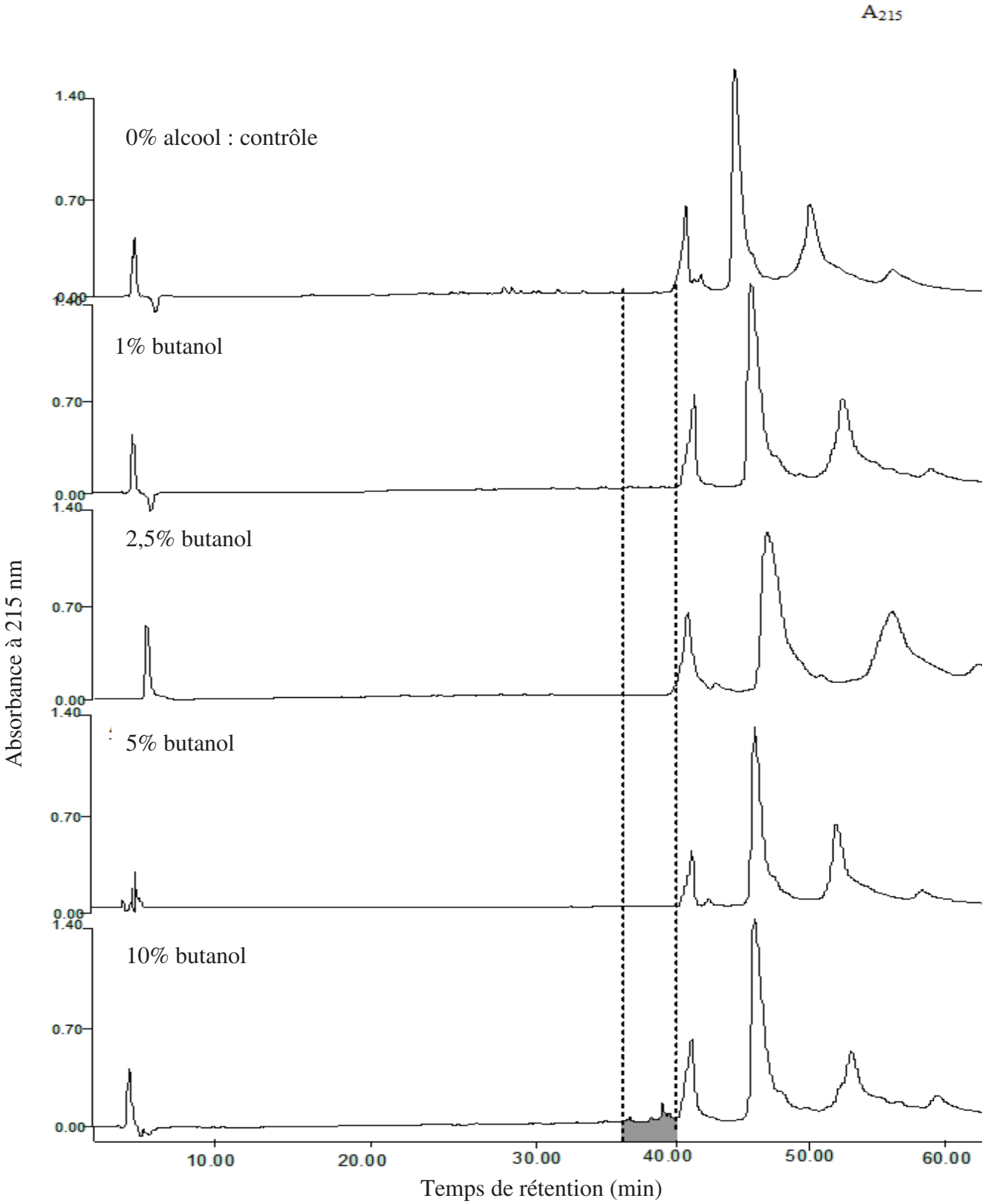


Figure 26 : Etude comparative des hydrolysats de 2,5 min en présence des alcools à concentrations variables. La zone de présence des peptides intermédiaires est délimitée par des traits discontinus.

Tableau 10 : Localisation des peptides intermédiaires dans les hydrolysats pepsiques de l'hémoglobine bovine en présence d'alcools. - : absence de peptide ; + présence d'une faible concentration peptidique ; et ++ : présence d'une plus forte concentration peptidique dans le temps d'hydrolyse considéré et selon la nature du solvant.

		Peptides intermédiaires						
Alcools	Pourcentage utilisé (% v/v)	2,5	20	30	60	120	180	1444
	1	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-	-
Méthanol	40	++	++	++	++	++	++	-
	1	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	30	++	++	++	++	++	++	-
	1	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-
	20	++	++	++	++	++	++	-
Propanol	30	+	+	+	+	+	+	-
	1	-	-	-	-	-	-	-
	2,5	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-
Butanol	10	++	++	++	++	++	++	-

L'illustration des résultats ainsi présentée montre que quelque soit le temps d'hydrolyse, des peptides d'intérêts dont le temps de rétention est compris entre 35 et 40 min apparaissent en concentration plus importante, selon chaque alcool, lors de l'utilisation de 40% de méthanol, 30% d'éthanol, 20% de propanol et de 10% de butanol, même si de très faible concentration sont observées dans le cas de 30 % de propanol. Cette remarque est faîte dès le début de l'hydrolyse. L'hydrolyse n'étant pas trop avancée, la probabilité d'obtenir un hydrolysat moins complexe enrichi en peptides intermédiaires, avec une hydrophobie conséquente y est plus importante. La figure 27 représente le récapitulatif des résultats d'analyse RP-CLHP de l'hydrolyse de 2,5 min réalisée en présence de 40% de méthanol, 30% d'éthanol, 20% de propanol ou de 10% de butanol. Ces concentrations ayant permis d'obtenir en concentration intéressante les peptides d'intérêts (peptides avec un temps de rétention supérieur à 40 minutes précédemment obtenus à très faible concentration en présence de 10% de TFE).

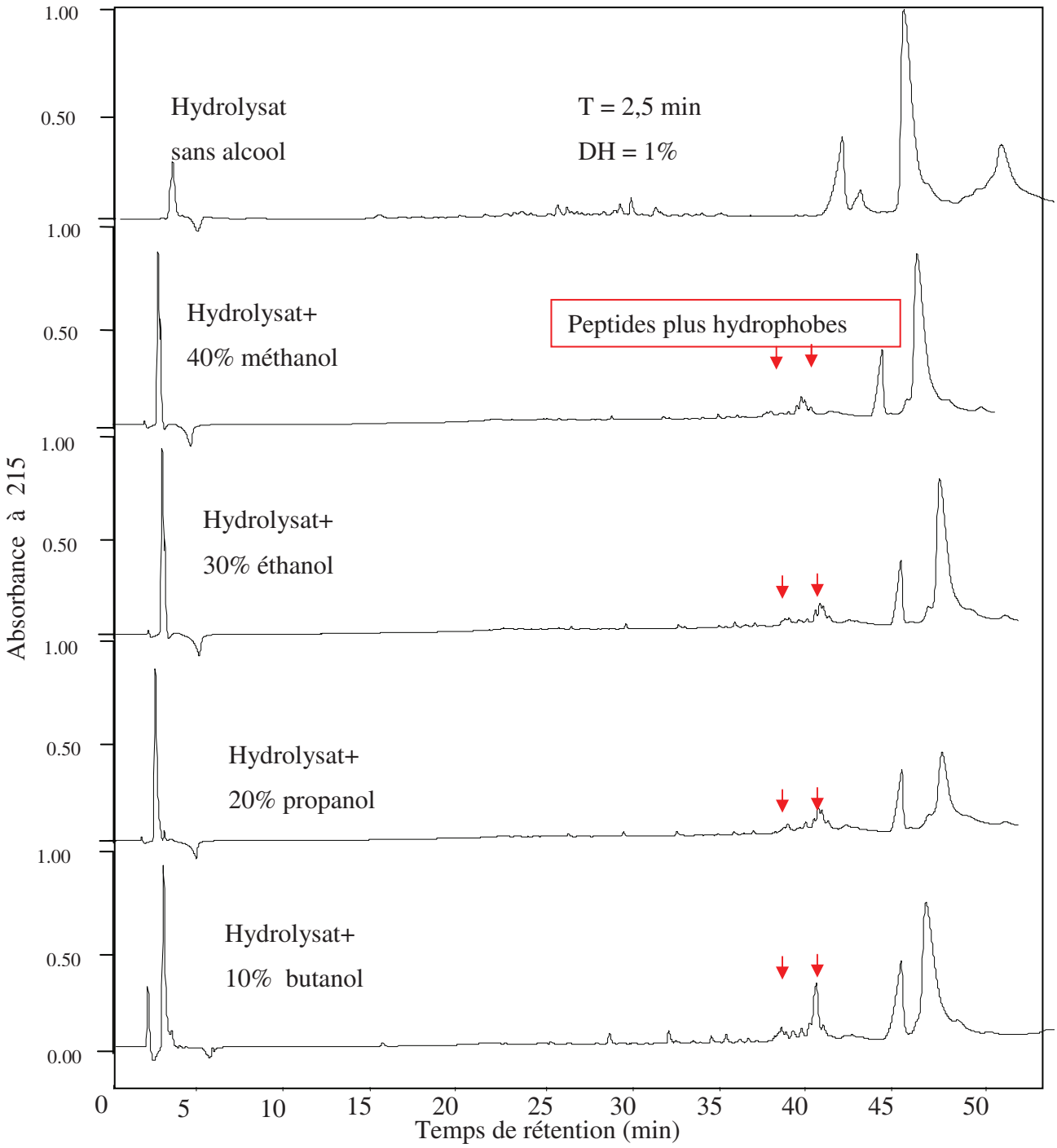
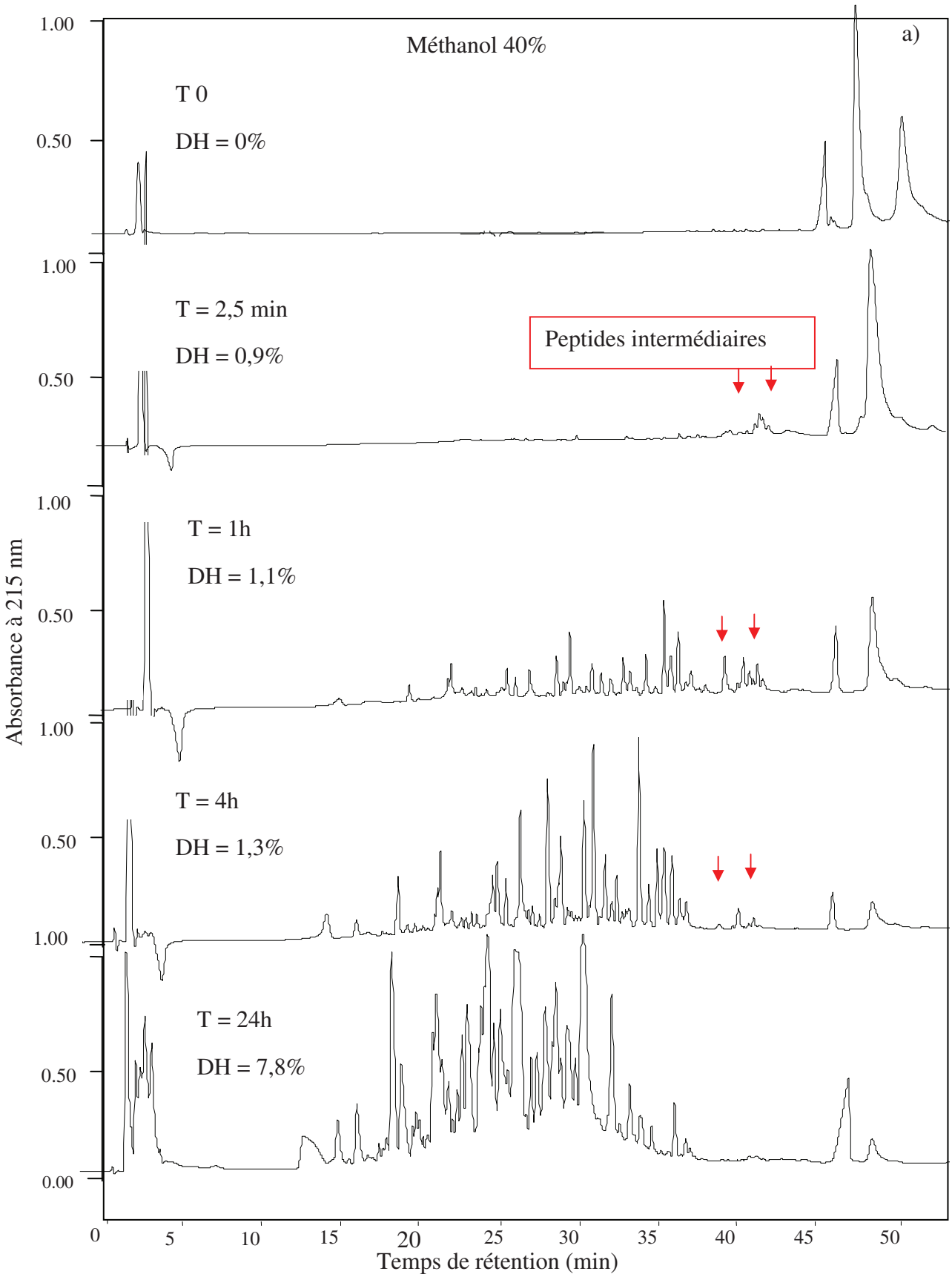
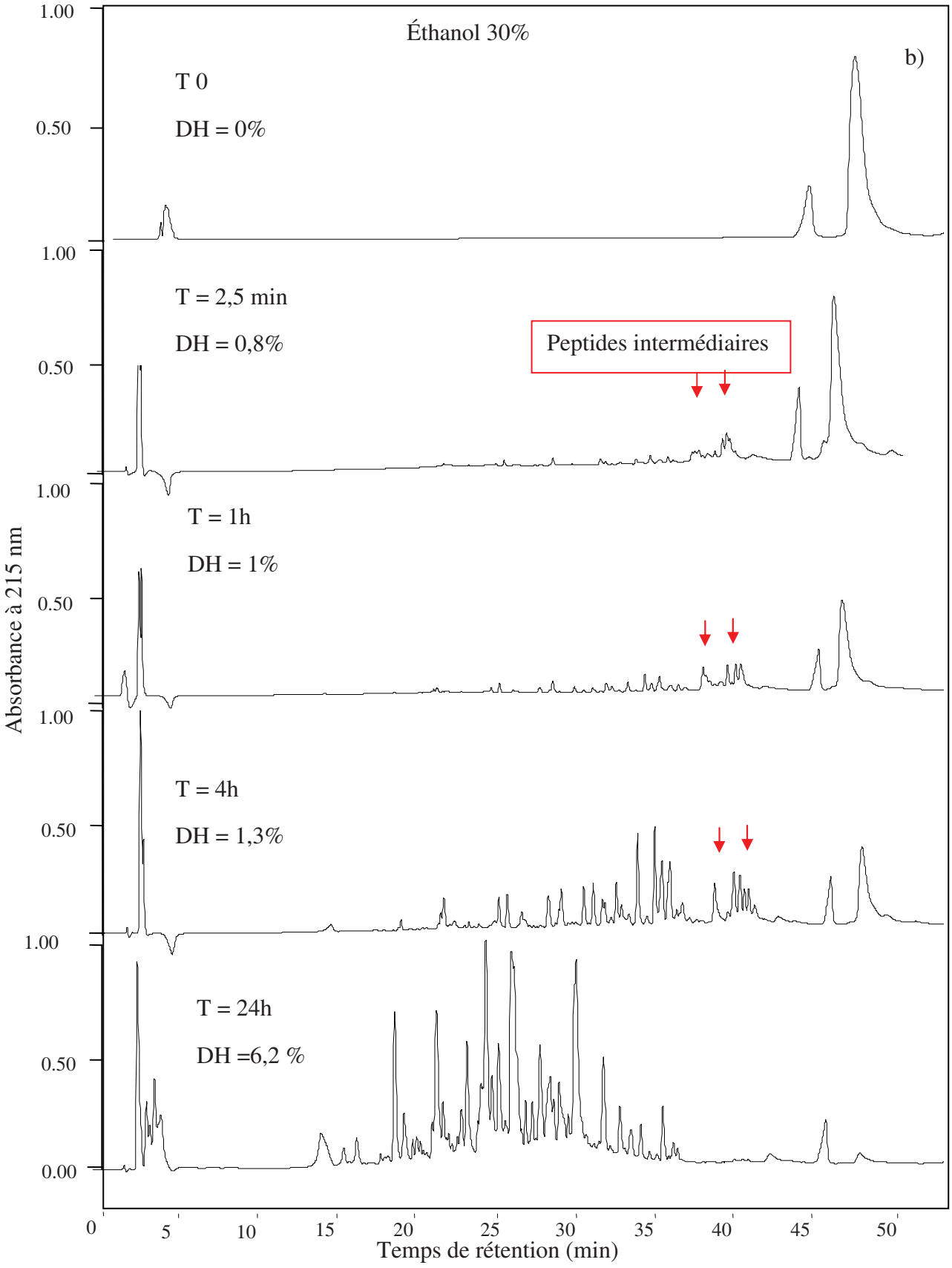


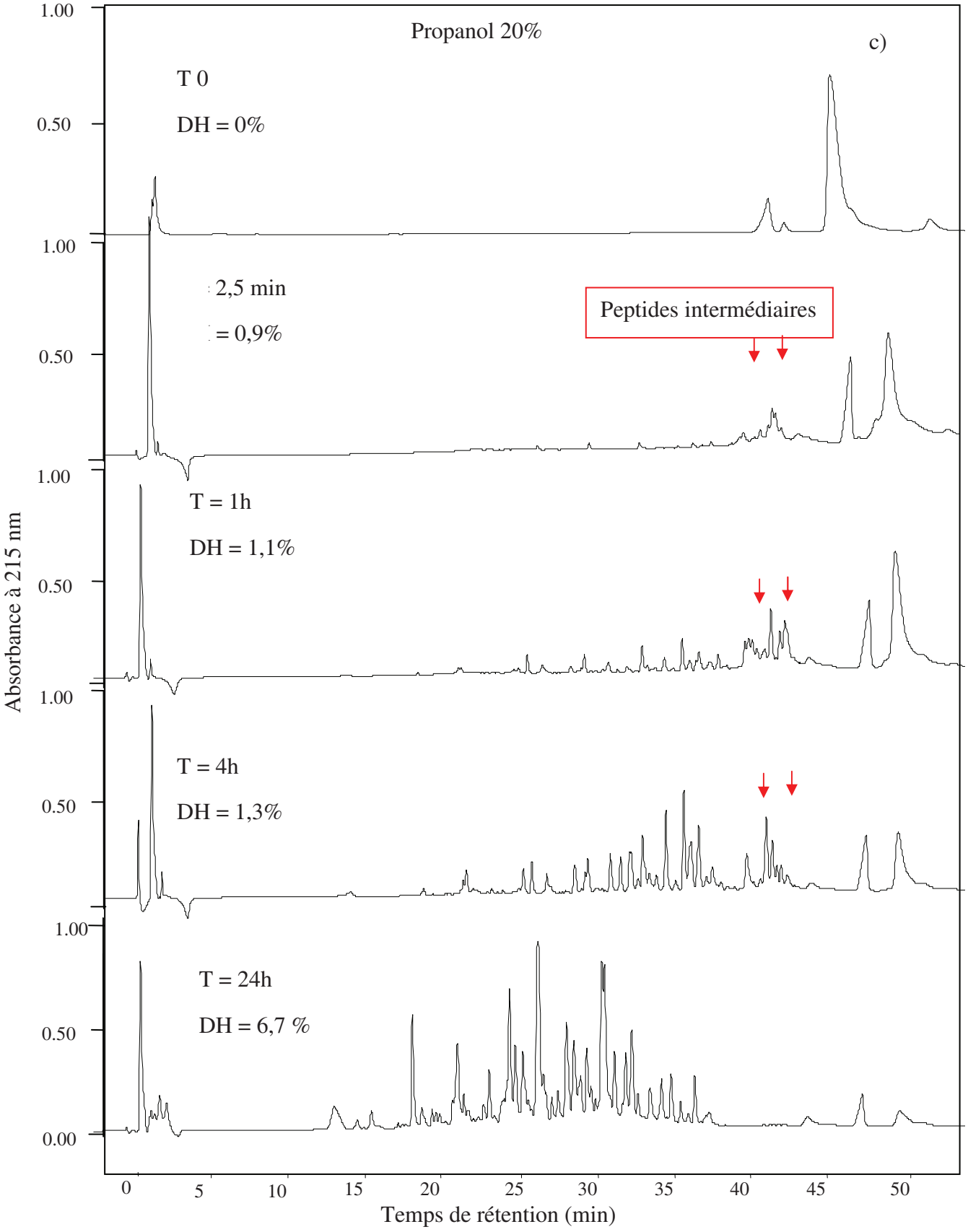
Figure 27 : Récapitulatif des hydrolysats effectuée à un dégrée d'hydrolyse identique et faible (DH= 1% correspondant à un temps d'hydrolyse de 2,5 min) en présence d'alcools.

Les analyses chromatographiques montrent que quelque soit l'alcool utilisé une hydrolyse de la protéine en présence des alcools est observée. Cette hydrolyse se traduit par l'apparition de peptides dont la concentration dépend du pourcentage et du type d'alcool présent. L'allure des chromatogrammes obtenus dans les hydrolysats en présence de solvants, est différente de celle des graphes obtenus dans le cas du témoin (hydrolysat sans alcool). Dès les premiers temps d'hydrolyse (2,5min), les premiers pics de peptides apparaîssent à de 10% de butanol ; ces mêmes pics sont présents aussi à 20% de propanol puis à 30% d'éthanol et aussi à 40% de méthanol, avec des concentrations variables. Il ya donc un effet complémentaire entre la longueur de la chaîne aliphatique et la concentration de l'alcool sur le schéma d'hydrolyse protéique. Plus la chaîne hydrocarbonée est grande moins la concentration d'alcool nécessaire pour l'obtention de ces profils chromatographiques est importante et vice-versa. Cependant l'effet de très faibles concentrations d'alcools sur la structure protéique ne peut être exclue effet dans le cas des concentrations très faibles en butanol (2,5 et 5 %), pour ce même degré d'hydrolyse l'absence de ces peptides est aussi à noter. Cela pourrait être dû au fait qu'à ces faibles concentrations de butanol, l'hémoglobine garderait une conformation proche de l'état natif, impliquant ainsi un mécanisme d'hydrolyse ne permettant pas l'obtention des peptides identiques à ceux présents dans le cas de l'utilisation de 10% de butanol.

Pour un même degré d'hydrolyse, la concentration de ces peptides est beaucoup plus importante dans le cas de l'utilisation de 10% de butanol et plus faible lors de l'utilisation de 40% de méthanol. Seul le suivi cinétique permettant de mettre en évidence le caractère intermédiaire de ces peptides, la figure 28 représente, les profils chromatographiques des hydrolysats pepsiques (2,5 min, 30 min, 4h et 24h) de l'hémoglobine bovine en milieu contenant 40% de Méthanol, 30% d'éthanol, 20% de propanol ou de 10% de butanol.


a)
Méthanol 40%
T 0
DH = 0%
T = 2,5 min
DH = 0,9%
Peptides intermédiaires
T = 1h
DH = 1,1%
T = 4h
DH = 1,3%
T = 24h
DH = 7,8%
Absorbance à 215 nm
1.00
0.50
0.00
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Temps de rétention (min)


Éthanol 30%
b)
T 0
DH = 0%
T = 2,5 min
DH = 0,8%
Peptides intermédiaires
T = 1h
DH = 1%
T = 4h
DH = 1,3%
T = 24h
DH =6,2 %
Absorbance à 215 nm
Temps de rétention (min)
1.00
0.50
0.00
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50


Propanol 20%
c)
T 0
DH = 0%
2,5 min
= 0,9%
Peptides intermédiaires
T = 1h
DH = 1,1%
T = 4h
DH = 1,3%
T = 24h
DH = 6,7 %
Absorbance à 215 nm
1.00
0.50
0.00
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Temps de rétention (min)

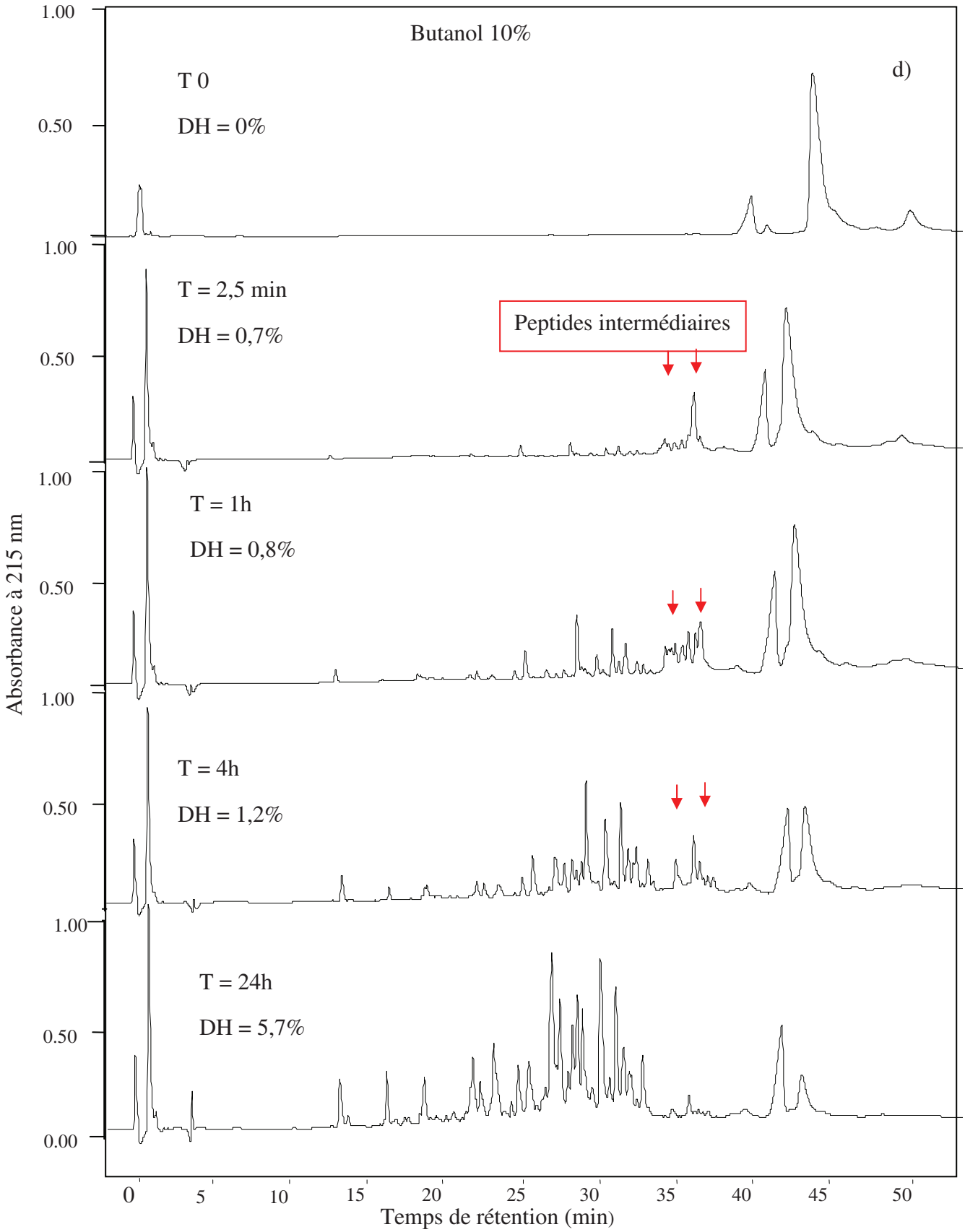
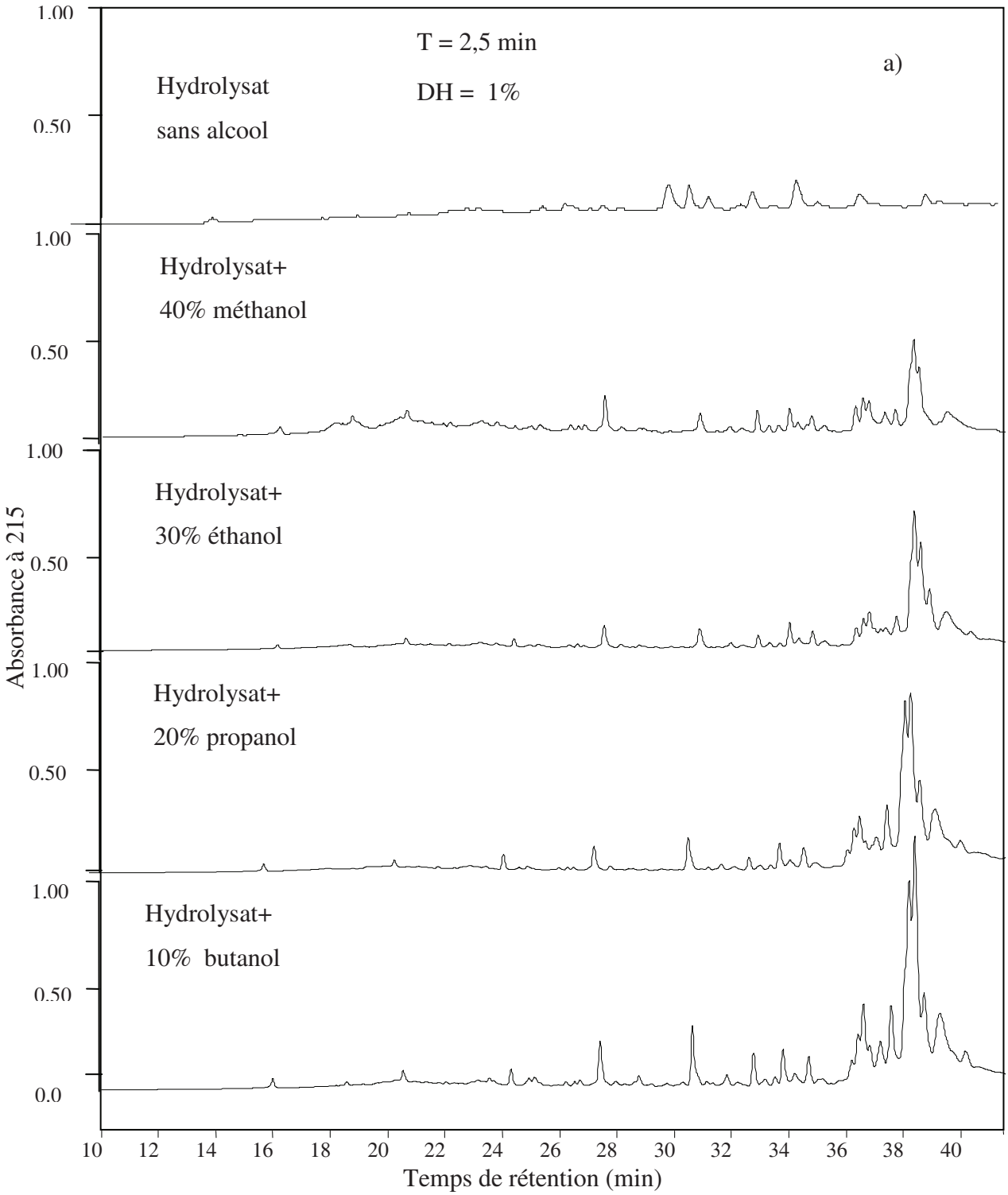


Figure 28 : Cinétique d'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine pH 5,5 à 23°C en présence de méthanol 40% (a), d'éthanol 30% (b), de propanol 20% (c) ou de butanol 10% (d). Volume d'injection= 50µl

Afin de mieux apprécier la similarité des profils chromatographiques un zoom (temps de rétention de 10-40 minutes) est effectué pour les hydrolysats de 2,5 min (Figure 29a). La figure 29b est un récapitulatif qui permet d'effectuer une étude comparative des hydrolysats obtenus après 24h d'hydrolyse en présence des alcools aux concentrations choisies.



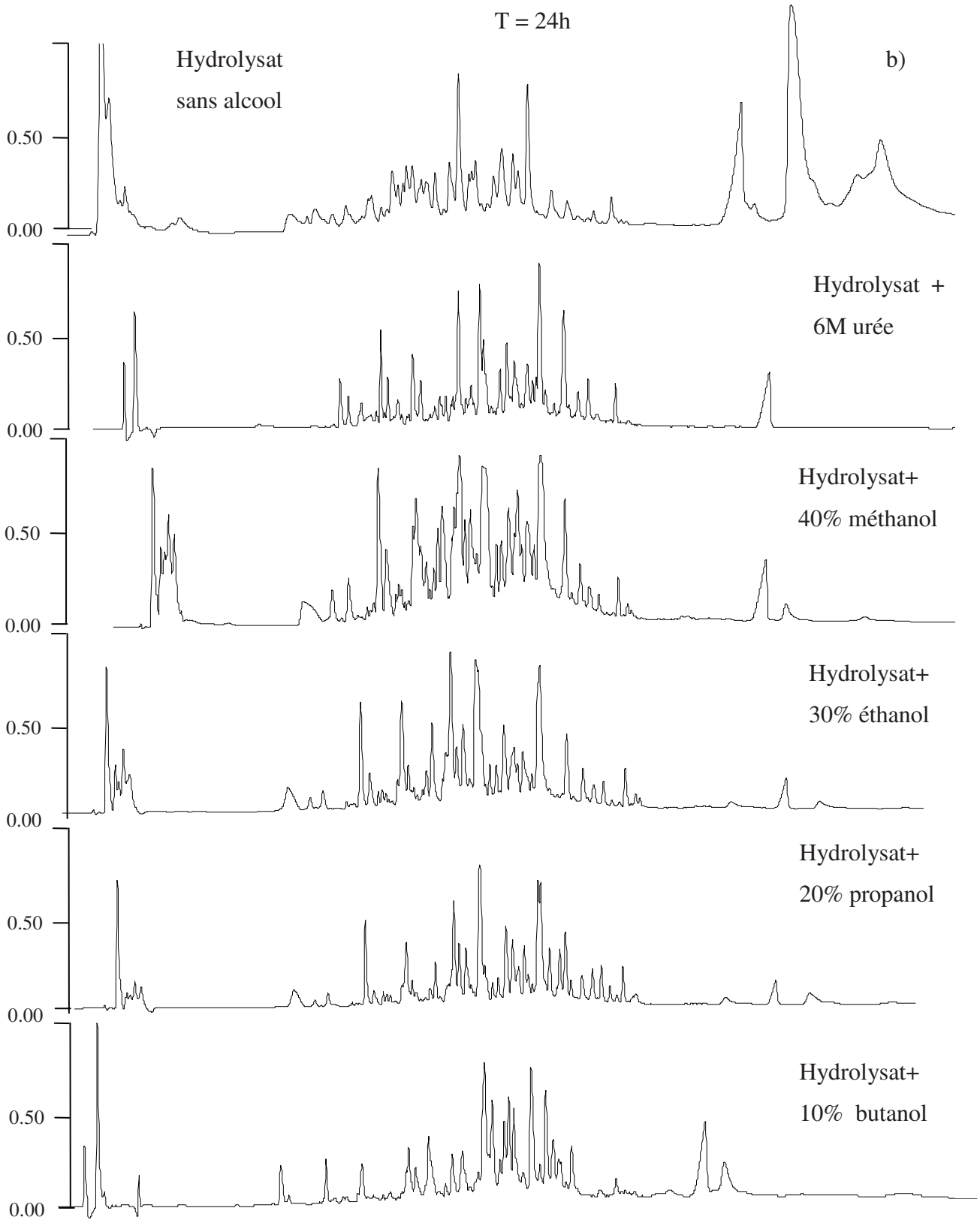


Figure 29 : Profils comparatifs des hydrolysats 2,5 min de 10 à 40 min (a) et 24 h (b) de l'hémoglobine bovine pH 5,5 à 23°C en absence ou en présence de solvant.

Pour de faibles degrés d'hydrolyse, une population peptidique moins dispersée est observée. La grande majorité de ces peptides, sont des peptides hydrophobes et surtout intermédiaires.

En effet, la cinétique d'hydrolyse ainsi présentée (Figure 28), montre que ces peptides plus hydrophobes, présents ici après un temps de rétention supérieur à 35 minutes, sont des peptides intermédiaires car ils sont présents en début d'hydrolyse avec des intensités d'absorption à 215 élevées puis, disparaissent après 24h d'hydrolyse. Ceux-ci laissent place à des peptides finaux beaucoup moins hydrophobes.

Cette cinétique d'hydrolyse montre aussi qu'en plus de voir apparaître ces peptides intermédiaires, au cours de l'hydrolyse (phénomène caractéristique du mécanisme zipper) une hydrolyse progressive des chaînes alpha et béta est aussi observée (phénomène caractéristique du mécanisme d'hydrolyse « one by one »). Il s'agirait ici d'un nouveau mécanisme d'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine combinant les caractéristiques des mécanismes d'hydrolyse de l'hémoglobine native et de celle dénaturée.

Une similitude des profils chromatographiques est observée entre les hydrolysats d'hémoglobine en présence de ces solvants à faible dégrée d'hydrolyse (figure 29a) où seule la concentration des peptides obtenus varie d'une part et d'autre part entre ces hydrolysats et ceux réalisés en absence de solvant après une hydrolyse de 24h (figure 29b).

Au début de l'hydrolyse, pour un degré d'hydrolyse identique les plus fortes concentrations peptidiques sont observées lors de l'utilisation de 10% de butanol et les plus faibles, lors de l'utilisation de 40% de méthanol. Le mécanisme d'hydrolyse mis en jeu dans le cas de ces hydrolyses reste le même. Toutefois, seule l'identification des peptides par spectrométrie de masse permettra de confirmer la similarité des peptides obtenus.

L'hydrolyse de l'hémoglobine bovine en présence de 40% méthanol, 30% éthanol, 20% propanol ou de 10% butanol, se poursuit jusque 24h. Cela montre que la pepsine reste active, contrairement à ce qui était précédemment observé lors de l'utilisation de concentrations de TFE supérieures à 10%.

III.2- Stabilité de l'activité pepsique en présence des alcools aux concentrations choisies

Ces analyses ont été menées en suivant le même protocole que celui précédemment décrit lors de l'analyse avec les concentrations variables de TFE (paragraphe II-1-a), les différents temps d'incubation étudiés sont de 20 min, 1h, 2h, 19h et 24h. La figure 30 décrit la variation de l'activité résiduelle de la pepsine en fonction des différents alcools.

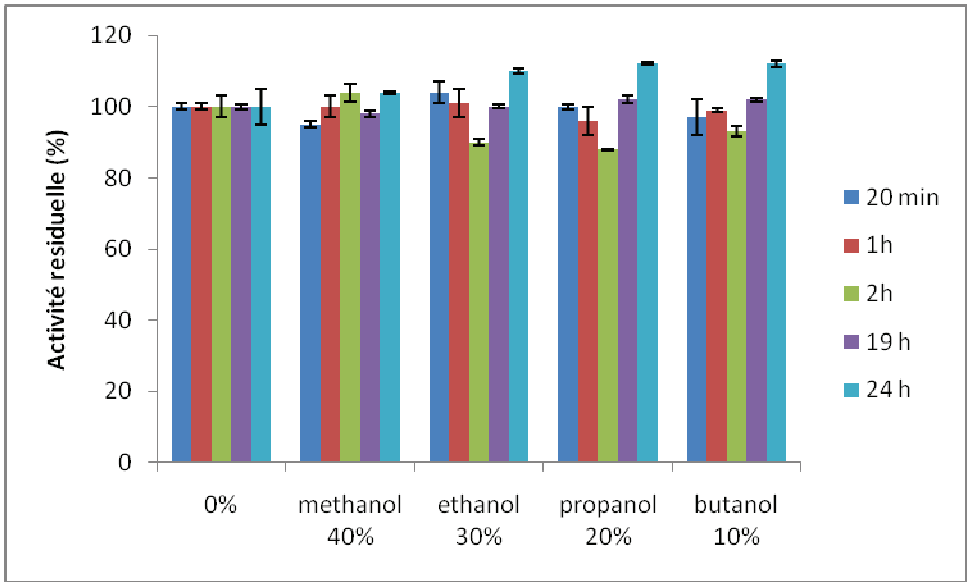


Figure 30 : Etude de la stabilité de l'activité enzymatique de la pepsine en absence et en présence de concentrations variables de méthanol, d'éthanol, de propanol ou de butanol

A ces concentrations d'alcool, l'activité résiduelle de la pepsine est approximativement égale à 100%, cela même après 24h d'incubation. L'enzyme conserve son activité en présence de 40% de méthanol, 30% d'éthanol, 20% de propanol ou de 10% de butanol. Cette stabilité d'activité pourrait être expliquée par une conservation structurale de l'enzyme en présence de ces alcools.

Afin de vérifier l'état structural de l'enzyme en présence des alcools, donc de voir l'influence des alcools sur l'activité de l'enzyme, l'étude spectrale de la pepsine a été réalisée par UV-visible et par fluorescence en présence de 40% de méthanol, 30% d'éthanol, 20% de propanol ou de 10% de butanol.

Les analyses spectrophotométriques ont été réalisées de 200-800 nm avec 11,2 µM de concentration pepsique en milieu tampon acide acétique/acétate de sodium pH 5,5 avec ou

sans solvant. Cette concentration est la même que celle utilisée lors de l'hydrolyse de l'hémoglobine. La figure 31 présente l'intensité d'absorption de la pepsine en fonction de la longueur d'onde.

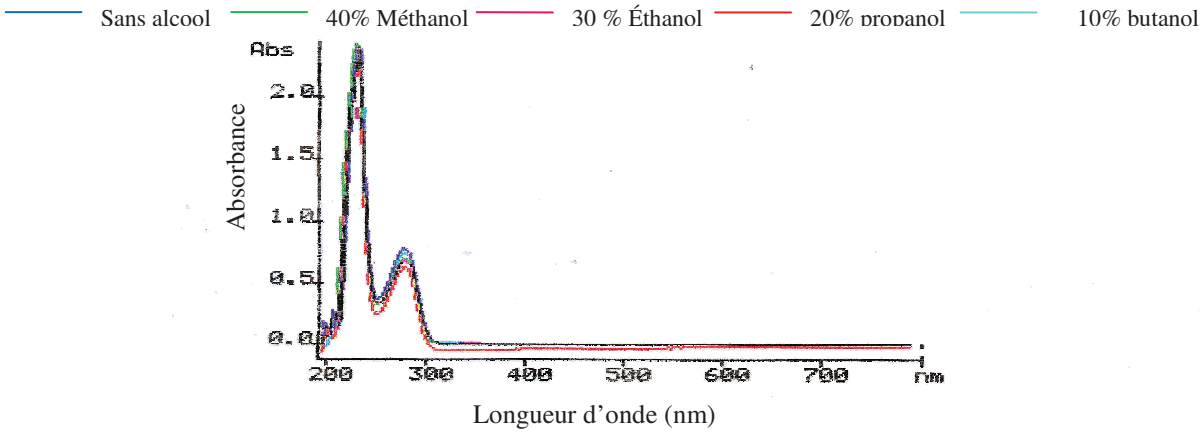


Figure 31 : Spectres d'absorption de la pepsine de porc (17µM) en milieu tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1M en présence d'alcools

En absence ou en présence des alcools précités, le balayage de spectre ne montre aucune différence d'intensité d'absorption. Aucun décalage du maximum d'absorption n'est observé quelque soit l'alcool utilisé. Aucune précipitation n'est aussi observée. L'enzyme reste donc intacte en présence des solvants précités.

L'étude de la fluorescence a été effectuée avec une longueur d'onde d'excitation de 290 nm et l'émission est enregistrée de 300-500 nm. La figure 32 représente l'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde

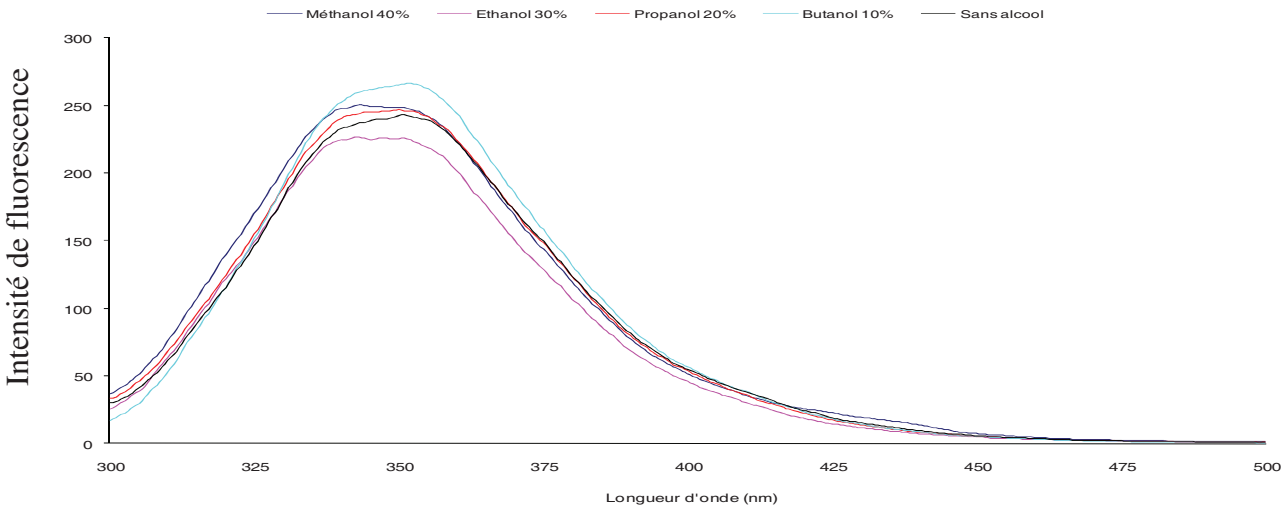


Figure 32 : Spectre de fluorescence de la pepsine (11,2 µM) à pH 5,5 en présence ou en absence d'alcool.

Le spectre de fluorescence de la pepsine montre une intensité d'émission maximale (λm) située entre 340 et 355 nm. Bien qu'une très faible baisse de cette intensité soit observée dans le cas de 30% d'éthanol, ainsi qu'une légère augmentation dans le cas de 10% de butanol, les spectres de fluorescence sont quasi identiques en présence des alcools choisis.

Ces similitudes structurales pourraient expliquer la conservation et la poursuite de l'activité enzymatique même en présence de ces solvants.

CONCLUSION :

Nous avons pu montrer dans ce chapitre que l'utilisation d'un pH 5,5 permet de maintenir l'hémoglobine dans sa conformation la plus proche possible de l'état natif. De plus, l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine en milieu aqueux à ce pH, permet de mettre en évidence le mécanisme d'hydrolyse de type « one by one ». Ce mécanisme a aboutit à la production d'une population peptidique, moins hydrophobe avec de très faibles concentrations. Cela, lorsqu'aucun agent dénaturant n'est utilisé. Tandis qu'en présence d'agent dénaturant tel que l'urée, cette hydrolyse s'effectue selon un mécanisme de type « zipper », aboutissant ainsi à une très forte population peptidique de nature variable. L'utilisation de solvant structurant, tels que certains alcools dont le TFE (10%), le méthanol (40%), l'éthanol (30%), le propanol (20%) ou le butanol (10%), permet d'effectuer un autre mécanisme d'hydrolyse. Ce nouveau mécanisme d'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine, combine les caractéristiques des mécanismes « zipper » (par la formation de peptides intermédiaires) et « one by one » (par l'hydrolyse progressive des chaînes). Ce mécanisme a favorisé l'obtention d'une population peptidique moins dispersée et de concentration significative. Pour un degré d'hydrolyse faible (DH=1%), la plupart des peptides obtenus sont des peptides intermédiaires et de nature hydrophobe.

L'utilisation de 10% de TFE a démontré la faisabilité de la mise en place d'un système hydroalcoolique pour générer des peptides intermédiaires.

Toutefois, même si les concentrations peptidiques obtenues en présence de 10% de TFE sont faibles, l'utilisation de méthanol, d'éthanol, de propanol ou de butanol aux concentrations précitées, permet d'améliorer la production de ces peptides. La meilleure concentration de peptides est obtenue lors de l'utilisation de 10% de butanol. Dans ces conditions d'hydrolyse, l'activité enzymatique demeure stable et une cinétique d'hydrolyse peut être effectuée.

Chapitre 2

Effets des mélanges hydro-alcooliques sur la structure de l'hémoglobine bovine et sur l'hydrolyse pepsique.

Nous avons étudié dans le chapitre précédent, l'hydrolyse de l'hémoglobine en milieu aqueux et en milieu hydroalcoolique. Ces deux hydrolyses ont donc abouti à des populations peptidiques différentes compte tenu des profils chromatographiques obtenus. Les mécanismes mis en jeu en milieu alcoolique différent de ceux obtenus en milieu aqueux à l'état natif et à l'état dénaturé de l'hémoglobine. Les résultats obtenus lors de l'utilisation de 40% de méthanol, 30% d'éthanol, 20% de propanol ou de 10% de butanol sont similaires à ceux obtenus lors de l'utilisation de 10% de TFE, seule la concentration peptidique change.

Afin de comprendre les phénomènes ayant permis la réalisation des mécanismes d'hydrolyse obtenus en milieu hydroalcoolique et de justifier la similarité des résultats en présence de 40% de méthanol, 30% d'éthanol, 20% de propanol ou de 10% de butanol, l'étude structurale de l'effet de ces solvants sur la conformation de l'hémoglobine a donc été effectuée.

L'effet du méthanol, de l'éthanol, du propanol et du butanol à concentration respectivement de 40, 30, 20 et 10%, et du TFE 10% sur la structure de l'hémoglobine bovine a été réalisé par spectrofluorimétrie, par spectrophotométrie UV-visible et par Dichroïsme Circulaire (DC).

Afin d'interpréter les variations structurales observées lors de l'ajout de ces solvants, les études comparatives sont effectuées en considérant deux témoins : l'hémoglobine sans solvant à pH 5,5 (hémoglobine native) et l'hémoglobine à pH 5,5 en présence d'urée 6M (hémoglobine dénaturée).

I- Etude des variations structurales de l'hémoglobine par spectrofluorimétrie

La mesure de la fluorescence a été réalisée à une longueur d'onde d'excitation de 290 nm. L'émission de la fluorescence est enregistrée de 300-550 nm. L'analyse a été réalisée avec 3 µM d'échantillon. La figure 33 représente l'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde

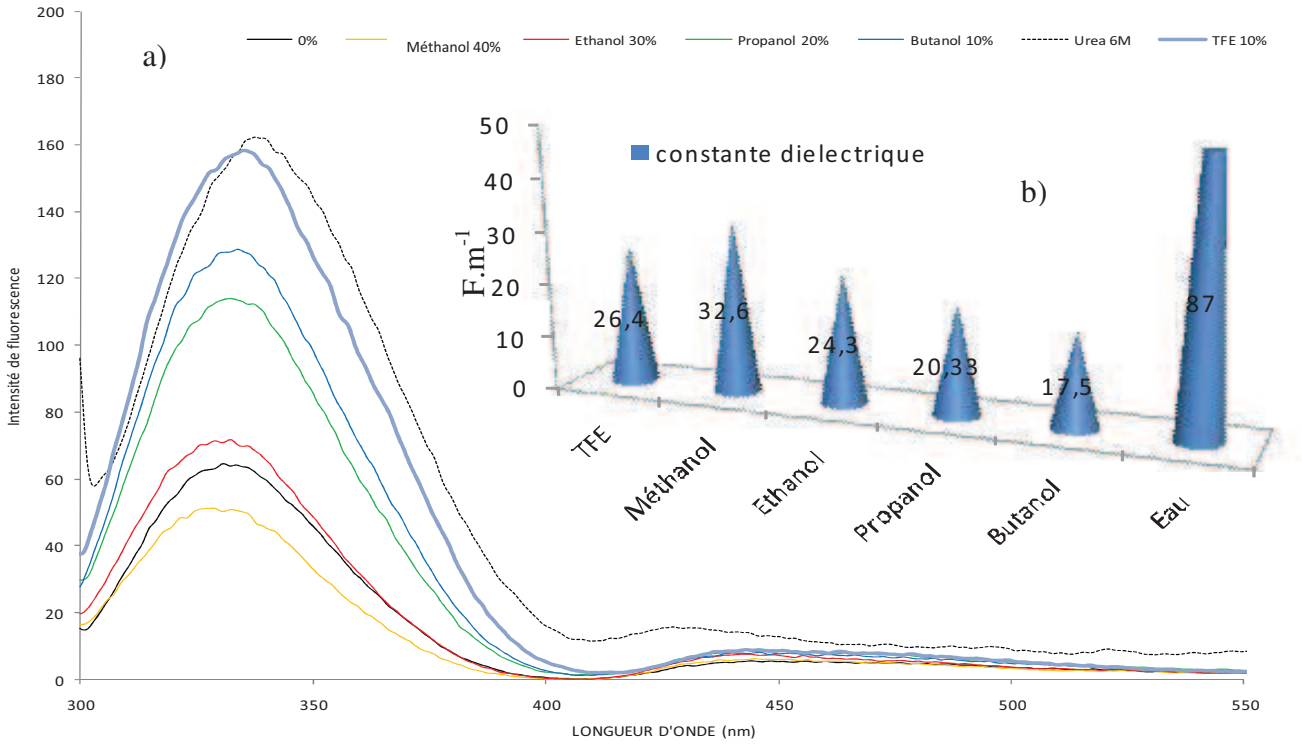


Figure 33: Spectre de fluorescence de l'hémoglobine bovine (3µM) à pH 5,5 en absence de solvants (0%), en présence d'urée 6M et en présence de 40% de méthanol, 30% d'éthanol, 20% de propanol ou de 10% de butanol (v/v) (a) et graphique des constantes diélectriques des milieux d'étude (b).

La fluorescence des protéines est un indicateur très sensible du microenvironnement des résidus Trp (Hirsh et Nagel, 1981). Ainsi, l'évaluation de l'exposition du tryptophane et de ses environs permet de mettre en évidence la variation structurale des chaînes protéiques. L'intensité d'émission entre 300-400 nm augmente avec l'ajout de solvants. La longueur d'onde d'émission maximale est située à 330 nm en absence et en présence d'alcool et à 334 nm en présence d'urée. Les intensités les plus élevées sont observées lorsque l'hémoglobine est à l'état dénaturé et lorsqu'elle est en présence de 10% de TFE, la plus faible intensité étant observée dans le cas de l'utilisation de 40% de méthanol. L'étude comparative de l'effet du

méthanol, de l'éthanol, du propanol et du butanol sur la fluorescence de l'hémoglobine (Figure 33 a), montre qu'à 330 nm, l'intensité est plus élevée dans le cas de l'utilisation de 10% de butanol puis de 20% de propanol, mais beaucoup plus faible lors de l'utilisation de 30% d'éthanol et encore plus faible lors de l'ajout de 40% de méthanol. Le spectre de fluorescence du tryptophane de l'hémoglobine en présence de solvants est compris entre celui de l'hémoglobine à l'état dénaturé et de l'hémoglobine à l'état natif, dans le cas du butanol, du propanol et de l'éthanol; ce spectre, dans le cas de l'hémoglobine en présence de méthanol est inférieur à celui de l'hémoglobine à l'état natif. Les concentrations d'alcools choisies entraînent donc une augmentation de l'intensité d'émission du tryptophane, sauf dans le cas de l'emploi de 40% de méthanol où une diminution de cette intensité est observée.

L'exposition du tryptophane Trp β37 est beaucoup plus importante en présence de 10% de TFE où cette exposition est quasi similaire à celle effectuée lorsque la protéine est à l'état natif, importante lors de l'utilisation de 20% de propanol et de 10% de butanol puisque l'intensité d'émission est beaucoup plus grande que celle obtenue dans le cas de la protéine native. Dans ces deux précédents cas, la structure protéique s'éloigne de celle native et se rapproche de celle à l'état dénaturé.

Toute fois, Dalgalarrondo *et al.,* (1993), soutenaient que l'effet des solvants dépend surtout de la nature de la protéine. Ces résultats obtenus soutiennent donc cette assertion puis que dans le cas de l'hémoglobine une forte augmentation de l'intensité de fluorescence a été observée lors de l'ajout de butanol 10% et de propanol 20%, alors que dans celui de la pepsine une très faible variation était observée lors de l'ajout de ces deux solvants.

De même, Povey *et al.,* (2007) ont montré, après étude de la fluorescence du lysozyme en présence de 0-50% TFE, que l'intensité de fluorescence du tryptophane est élevée de 0-20% de TFE comparativement à 30-50% de TFE où cette intensité diminue considérablement. Cependant cette variation ne se fait pas de façon systématique et dépend de la protéine en présence. Dans le cas de la phosphatase alcaline par exemple (Zhang *et al.,* 2000), l'intensité de la fluorescence du Trp est faible de 0-20% puis augmente de 26-70% avec l'augmentation de la concentration de TFE.

L'analyse des constantes diélectriques (Figure 33 b) des solvants utilisés montre une très faible variation de cette constante (en moyenne de 3 $F.m^{-1}$) entre l'éthanol, le propanol, le butanol et le TFE, tandis qu'une différence d'environs 16 $F.m^{-1}$ existe entre ces alcools et le

méthanol. Toutefois cette différence demeure peut significative en comparaison avec celle de l'eau. La variation de cette constante n'est donc pas proportionnelle à l'effet observé. Ce qui confirme que la variation structurale des protéines ne se fait pas de façon systématique en présence des alcools, mais dépend surtout de la protéine en présence.

II- Etudes structurales de l'hémoglobine par spectrophotométrie UV-Visible

Les études spectrophotométriques ont été réalisées dans l'UV-Visible entre 200 et 700 nm, avec une concentration d'hémoglobine de 3 µM. La figure 34 représente l'intensité d'absorption de l'hémoglobine bovine en fonction de la longueur d'onde.

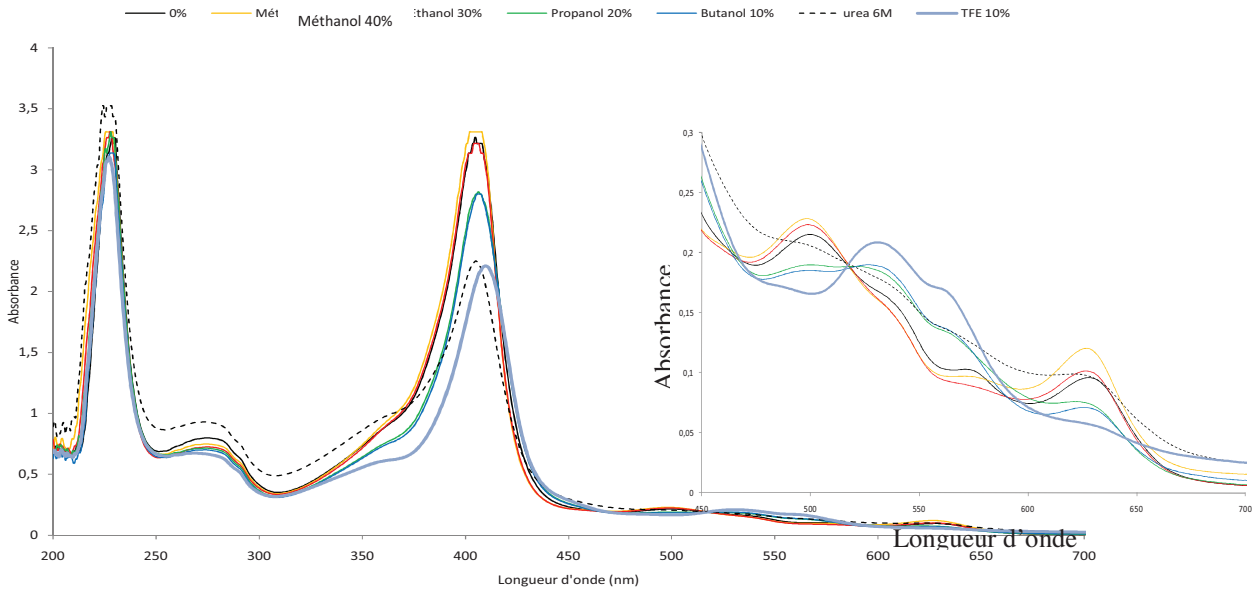


Figure 34 : Spectre d'absorbance UV-Visible de l'hémoglobine bovine (3µM) à pH 5,5 en absence de solvants (0%), en présence d'urée 6M et en présence de 40% de méthanol, 30% d'éthanol, 20% de propanol ou de 10% de butanol (v/v)

Les quatre domaines de variation précédemment décrits (paragraphe I. 2) sont observés; il s'agit de l'UV lointain (200-250nm), UV proche (250-300), Bande de Soret (360-460 nm) et la bande Q (500-700 nm).

Entre 200-250 nm, les spectres de l'hémoglobine en présence des alcools coïncident avec ceux des deux témoins, même si une légère différence est observée dans le cas de l'hémoglobine dénaturée. Les concentrations de départ étant les mêmes, l'absorbance des

liaisons peptidiques (215 nm) reste donc d'intensité égale. Des différences significatives sont effectuées entre 360-460 nm et entre 500-600 nm. En effet les analyses de l'absorption au niveau de la bande de Soret et de la bande Q reflètent un changement au niveau de l'état d'oxydation de l'hème (Zhu *et al.,* 2002 ; Brian et Konerman, 2007), donc une variation des structures tertiaires et quaternaires de l'hémoglobine.

Le spectre d'absorption de l'hémoglobine native coïncide avec celui de l'hémoglobine en présence de 40% de méthanol et de 30% d'éthanol quelque soit la longueur d'onde. Par contre en présence de butanol, de propanol et de TFE, une forte différence est observée par rapport à l'hémoglobine à l'état natif.

De 360-460 nm, en présence de 10 % de TFE, la longueur d'onde d'absorption maximale de l'hémoglobine native et de l'hémoglobine dénaturée, située à 405 nm dans le cas de ces deux témoins, est décalée à 410 nm. A cette longueur d'onde, l'absorbance est inférieure à celle du témoin natif et d'intensité égale à celle du témoin dénaturé. Wang *et al.,* (2009), attribuent ce décalage, à une conversion de l'hémoglobine en hémichromes, après étude de l'interaction de l'hémoglobine avec un surfactant, la GDA (*n*-dodecylammonium *α*-glutamate). En effet d'après ces auteurs, dans le processus d'interaction de ce surfactant avec l'hémoglobine, la bande de Soret à 405 est décalée à 410 nm avec la présence d'un nouveau pic à 537 nm puis l'augmentation de la concentration en GDA entraîne un phénomène inverse. Cette variation témoignerait d'une dénaturation de l'hémoglobine par l'action du surfactant (Wang *et al.*, 2009).

Tandis qu'en présence de 10% de butanol et de 20% de propanol, l'absorbance à 405 est inférieure à celle de la protéine à l'état natif mais demeure supérieure à l'absorbance de l'hémoglobine dénaturée. Cette diminution d'absorbance est due à la précipitation de l'hème.

Entre 500-700 nm, des doublets de pics situés à 530/560 nm et 500/630 nm sont observées selon la nature des alcools. En présence de 10% de TFE, 10% de butanol et de 20% de propanol tous les spectres ont des longueurs d'onde d'absorption maximale identiques entre elles et différentes des deux témoins (hémoglobine à l'état natif et à l'état dénaturé). En présence de ces alcools, deux pics de forte intensité apparaissent à 530 nm et à 560 nm. La présence de ces deux maximums, additionnée au décalage à 410 nm précédemment observé dans le cas de 10% de TFE, confirment la formation d'hémichromes.

Toutefois, en présence de TFE, une disparition totale des pics à 500 nm et 630 nm présents à l'état natif et à l'état dénaturé (pic à 630 nm seulement) et caractéristiques de l'hémoglobine sous sa forme méthémoglobine (Olson, 1976; Zijlstra *et al.,* 2000; Johnson, 2005) est aussi observée. Alors que l'ajout de méthanol, d'éthanol, de propanol et de butanol aux concentrations précitées n'entraîne pas une disparition totale du pic à 630 nm. A cette longueur d'onde, l'absorbance de l'hémoglobine en présence de 40% de méthanol et de 30 % d'éthanol, est supérieure à celle observée dans le cas de l'hémoglobine native et inferieure à l'absorbance obtenue dans le cas de l'ajout de 20 % de propanol ou de 10% de butanol.

Cependant, contrairement aux autres alcools. Les spectres d'absorption de l'hémoglobine bovine en présence de 30% d'éthanol, de 40% de méthanol et en absence de solvants, coïncident une fois encore. En présence de ces deux solvants, l'état d'oxydation de l'hémoglobine ne varie donc pas.

III- Etudes structurales de l'hémoglobine par dichroïsme circulaire

Les études de dichroïsme circulaire sont réalisées de 188-250 nm avec une concentration protéique de 3 µM et de 250-595 avec une concentration de 18,6 µM. La figure 35 représente l'intensité de l'éllipcité molaire [Θ] en fonction de la longueur d'onde de 188- 250 nm.

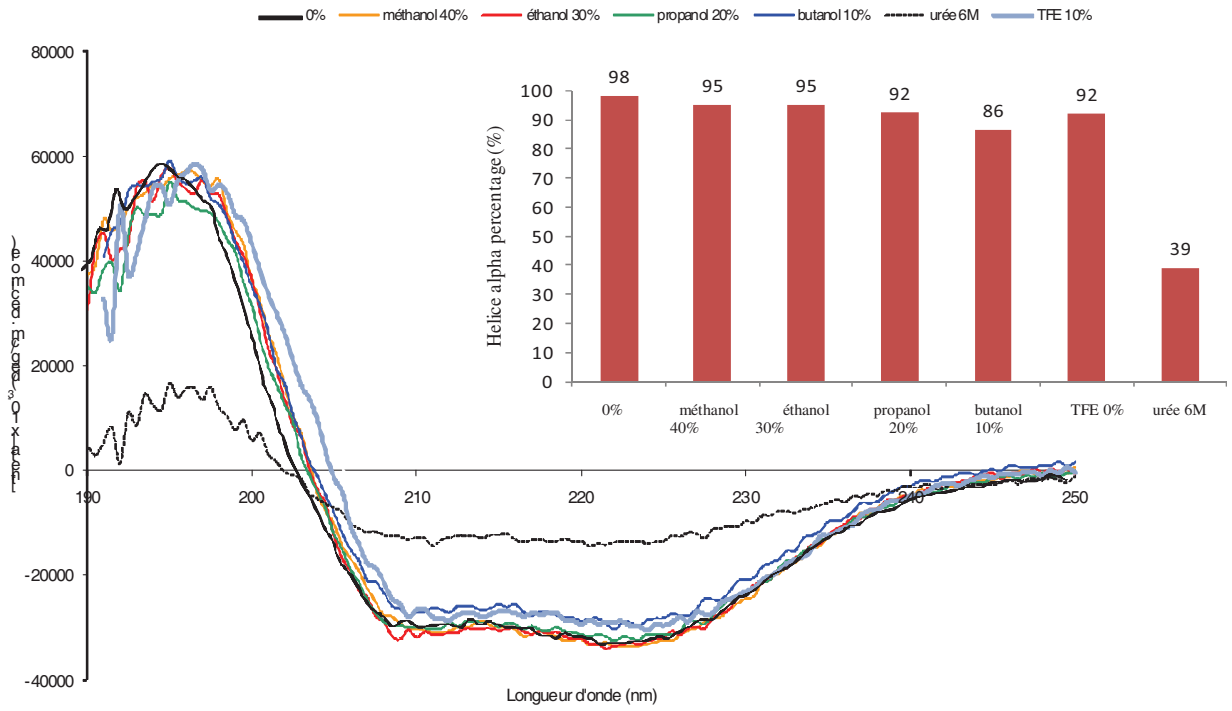


Figure 35: Dichroïsme circulaire de l'hémoglobine bovine (3 µM) en présence d'alcools, sous forme native et dénaturée dans du tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1 M pH 5,5

Le spectre de dichroïsme montre que l'éllipcité molaire de 208-222 nm ne varie pas en présence de solvant. Le pourcentage d'hélices initialement à 98%, est le même (95%) en présence de 40% de méthanol et de 30% d'éthanol et de 92% en présence 10% TFE. Il subit une légère baisse en présence de 20 % de propanol et atteint 86% en présence de butanol. Les structures secondaires de l'hémoglobine en présence de ces alcools ne présentent aucune différence significative. La conformation native et les structures en hélice des protéines dépendent de plusieurs variables comme la température, le pH, la force ionique et la composition en solvant.

Ces résultats confirment ceux précédemment obtenus. En effet, dans le cas du TFE, Main et Jackson (1999) ont démontré qu'en présence de faibles concentrations (10% v/v), le TFE n'entraîne pas de changement significatif sur le repliement de la FKBP12 (FK506 Binding Protein) une protéine cellulaire de type alpha/béta. Les premiers changements structuraux interviennent à des concentrations en TFE comprises entre 13% et 20% (v/v). Ivernizzi *et al.,* (2007) ont montré que les premiers repliements de la béta lactoglobuline en présence de TFE

commencent à des concentrations de TFE comprises entre 13-18% (v/v). A faible concentration, le TFE interagit avec les groupements carboxyles et avec les groupes hydrophobes à la surface de la protéine et augmente les interactions internes des protéines (Roccatano *et al.,* 2002, Wei *et al.,* 2006, Povey *et al.,* 2007). En effet, les liaisons hydrogènes ne sont pas détruites par le TFE ce qui n'est pas le cas des interactions hydrophobes, observations faîtes par Kentsis *et al.,* (1998). L'action du TFE est donc spécifique à chaque protéine.

Les études réalisées par Conio *et al.,* en 1970 sur la poly-L-ornithine et l'acide poly-L-glutamique ont permis d'établir que l'ordre selon lequel les alcools stabilisent au mieux la conformation des structures en hélice alpha est butanol > propanol > éthanol > méthanol (Conio *et al.,* 1970)]. Cependant l'effet de ces alcools est contraire à celui observé pour les grosses molécules comme le collagène et le tropocollagen (Bianchi *et al.,* 1970) comme c'est le cas dans cette présente étude. L'ajout de ces alcools permet une conservation des structures secondaires.

La figure 36 représente l'intensité de l'éllipcité molaire [Θ] en fonction de la longueur d'onde de 250-595 nm.

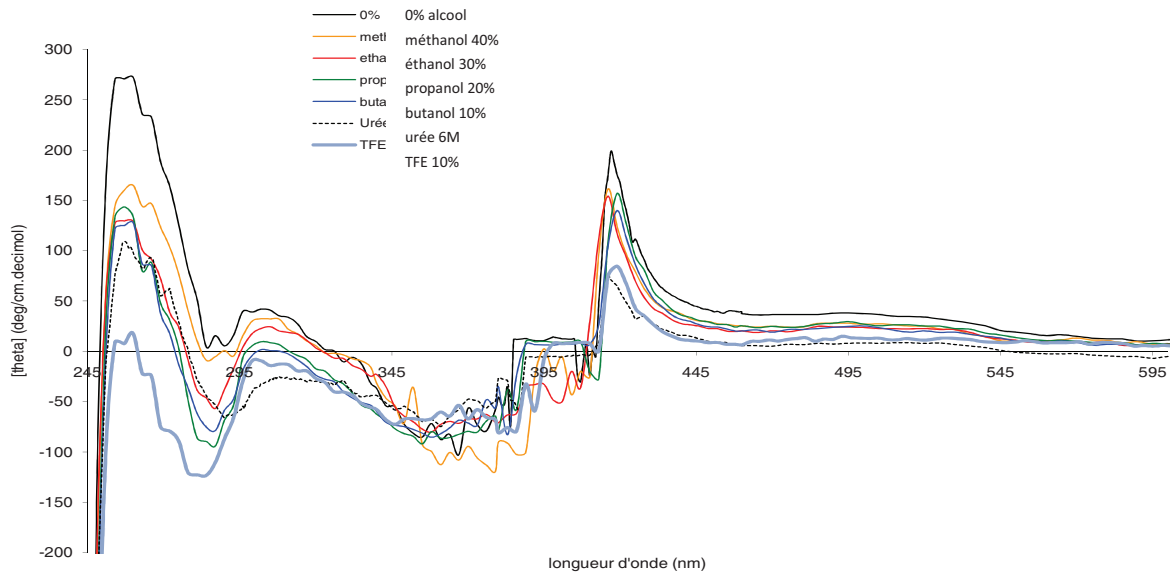


Figure 36 : Dichroïsme circulaire de l'hémoglobine bovine (18,6 µM) en présence d'alcools, sous forme native et dénaturée dans du tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1 M pH 5,5

Les analyses effectuées dans l'UV-visible entre 245-595 nm, montrent que les spectres d'éllipcité de l'hémoglobine en présence de 40% de méthanol, 30% d'éthanol, 20% de propanol ou 10 % de butanol, entre 245-345 et entre 400-600 sont inferieurs à celui du témoin 1 (hémoglobine à l'état natif) et supérieurs à celui du témoin 2 (hémoglobine à l'état dénaturé). Contrairement à ce qui est observé lors de l'utilisation de 10% TFE.

En présence du méthanol, de l'éthanol, du propanol ou du butanol, les longueurs d'onde d'éllipcité positive et négative sont les mêmes que celles des deux témoins (hémoglobine dénaturée par l'urée 6M et hémoglobine native) avec des intensités plus faibles que celle de l'hémoglobine native mais supérieures à celle de l'hémoglobine dénaturée. L'effet Cotton négatif à 390 nm, dû à la chaîne béta de l'hémoglobine (Melki, 1972), est aussi observé en présence des différents solvants comme dans le cas de la protéine à l'état natif ou dénaturé avec des intensités quasi identiques. Cependant dans le visible, en présence d'éthanol et du méthanol, la longueur d'onde d'éllipcité positive maximale est située à 415 nm et en présence de propanol et de butanol cette longueur d'onde est de 420 nm, ces maximums sont caractéristiques respectivement des chaînes α et β de l'hémoglobine (Melki, 1972). Dans le cas de l'hémoglobine native, ce maximum est localisé à 417 nm, caractéristique de l'effet cotton dans les hémoprotéines (Kataoka *et al.,* 1993). Cela suppose que dans le cas de l'éthanol et du méthanol, l'éllipcité de la chaîne alpha de l'hémoglobine l'emporte sur celle de la chaîne béta, tandis que dans le cas du propanol et du butanol l'effet contraire est observé. L'hémoglobine native quant à elle présente l'éllipcité issue de la contribution des deux chaînes (alpha et béta).

Il est important de remarquer que dans le cas de l'utilisation de 40% de méthanol, de 30% d'éthanol, de 20% de propanol ou de 10% de butanol, la structure tertiaire de la protéine bien qu'étant différente de celle de l'hémoglobine native, demeure dans un état autre que celui de l'hémoglobine dénaturée par l'urée. Cette structure tertiaire reste comprise entre l'état dénaturé et l'état natif. Cependant, un effet différent est observé lors de l'emploi de 10% de TFE.

En effet, le spectre caractéristique de l'hémoglobine en présence de TFE à 10% ne se trouve pas entre ceux des deux témoins quelque soit le domaine d'étude. L'intensité positive de l'éllipcité molaire est quasi inexistante entre 245-400 nm. De plus, à cette concentration

l'ajout de TFE entraîne une forte baisse de l'éllipcité à 260 nm et à 417 nm. A cette dernière longueur d'onde, l'éllipcité reste identique à celle de l'hémoglobine dénaturée.

Ces résultats témoignent de différences significatives au niveau de la structure tertiaire de la protéine. En présence de TFE, cette structure est fortement modifiée. La dénaturation protéique observée est même plus importante que celle en présence d'urée, compte tenu de la forte baisse de l'éllipcité au niveau de l'UV-proche. Ces résultats confirment les résultats obtenus lors des études spectroscopiques précédentes (absorption UV-Visible et fluorescence) où tous les spectres en présence de 10% TFE ne se trouvaient pas à l'intermédiaire des deux témoins. Ces spectres étaient similaires à ceux de l'hémoglobine dénaturée, hormis dans le cas de l'étude des structures secondaires.

Par contre, l'utilisation de 10% de butanol et de 20% de propanol, conduit à une variation des structures tertiaires et quaternaires de l'hémoglobine observable grâce aux trois méthodes spectroscopiques utilisées. En effet l'étude de la fluorescence a montré que l'exposition du tryptophane est nettement plus importante lors de l'utilisation de ces deux solvants. Le dichroïsme circulaire a montré que ces solvants entraînaient une variation de la structure tertiaire qui est comprise entre l'état dénaturé et l'état natif de l'hémoglobine. La spectrophotométrie a confirmé cette différence d'état structural par des spectres se démarquant bien de celui de l'hémoglobine à l'état natif. Aussi, lors de l'utilisation de 30% d'éthanol et de 40% de méthanol, seule l'analyse de la structure tertiaire par dichroïsme circulaire, a permis de mettre en évidence le changement structural de l'hémoglobine bovine. Dans ces deux cas, la structure de l'hémoglobine se trouve aussi entre l'état natif et l'état dénaturé.

Ces résultats confirment les propriétés selon lesquelles, les alcools ont la capacité de déstabiliser la structure tertiaire des protéines (dénaturation de la protéine) et de stabiliser la structure secondaire de la protéine (cas du méthanol et d'autres alcools courts) (Liu *et al.,* 2003), observation faîte lors de l'utilisation des alcools précités. L'augmentation de la chaîne hydrocarbonée entraîne une augmentation de l'habilité dénaturante de l'alcool vis-à-vis des protéines (Jansson *et al.,* 2005) comme ce fût le cas du butanol et du propanol.

Ces changements sont dus à la perturbation des liaisons hydrophobes qui entraîneraient un changement de la conformation (Liu et Bolen, 1995). De plus, d'autres études ont montré que ces alcools induisaient un changement conformationnel sur des protéines hémiques telle que

la myoglobine (Eliezer *et al.,* 1993) ou non hémiques telle que l'alpha chymotrypsin (Rezaei-Ghaleh *et al.,* 2007). Ces résultats ont été obtenus par l'étude de la variation de l'intensité d'absorption de l'hème.

Il se pourrait donc, que l'utilisation de 40% de méthanol, 30% d'éthanol, 20% de propanol ou de 10% de butanol permettrait d'obtenir une structure dénaturée autre que celle observée lors de l'utilisation de l'urée 6M, Molten Globule ; puisque les spectres spectroscopiques sont entre l'état natif et l'état dénaturé. Alors qu'en présence de 10% de TFE, il s'agirait d'une autre dénaturation aux caractéristiques proches de celles observées dans le cas de l'utilisation d'urée 6M, c'est-à-dire une dissociation du tétramère mais avec conservation des structures secondaires.

CONCLUSION :

Nous avons montré au cours de ce chapitre, que l'utilisation des solvants permet d'une part de conserver toutes les structures secondaires de l'hémoglobine ; mais aussi de modifier en même temps les structures tertiaires et quaternaires. Cette propriété serait à l'origine de la mise en place d'une hydrolyse permettant d'obtenir une faible population peptidique enrichie en peptides intermédiaires.

Lors des hydrolyses effectuées dans le chapitre précédent ; nous avons constaté que l'ajout de 40% de méthanol, de 30% d'éthanol, de 20% de propanol ou de 10% de butanol, suivait un mécanisme identique aboutissant aux mêmes profils chromatographiques. Bien que des différences structurales aient été observées entre les doublets [éthanol 30%-méthanol 40%] d'une part, et [butanol 10%-propanol 20%] d'autres part, le point commun entre ces quatre solvants concernant les variations structurales de l'hémoglobine, est qu'ils favorisent une restructuration de l'hémoglobine en une conformation se trouvant entre l'état natif et l'état dénaturé. Ce qui expliquerait cette similitude du mécanisme d'hydrolyse et surtout des profils chromatographiques permettant d'améliorer l'hydrolyse en présence de 10% de TFE, hydrolyse étant aussi différente du « one by one » et du « zipper ».

Chapitre 3

Identification et caractérisation des peptides issus des hydrolysats : Etudes comparatives et Obtention d'une nouvelle famille peptidique.

I- Peptides issus de l'hydrolysat à faible degré d'hydrolyse : Conséquences de l'utilisation des alcools

Un couplage LC-MS ainsi qu'une MS/MS ont permis d'identifier et de comparer les peptides présents dans chacun des hydrolysats de l'hémoglobine bovine pour un degré d'hydrolyse faible (DH=1%) correspondant à un temps d'hydrolyse de 2,5 min. Le choix d'un faible degré d'hydrolyse permet d'identifier tous les peptides intermédiaires produits au cours de l'hydrolyse. L'étude comparative a été effectuée entre les hydrolysats réalisés en milieu aqueux (état natif et dénaturé de l'hémoglobine) et ceux réalisés en milieu hydroalcoolique amélioré (10% butanol, 20% propanol, 30% d'éthanol ou 40% de méthanol).

A ce stade de l'hydrolyse, l'analyse spectrométrique de chacune des fractions CLHP obtenues lors de l'hydrolyse en présence des alcools précités, révèle une similarité des peptides produits. En présence de 10% de butanol, 20% de propanol, 30% d'éthanol ou de 40% de méthanol, les peptides identifiés sont les mêmes, bien qu'une variation au niveau de la concentration de chaque peptide soit observée.

Cependant, la comparaison de l'identité des peptides obtenue au niveau de chaque fraction d'hydrolysats montre que la population peptidique en présence de solvant est différente de celle observée en absence de solvant, ainsi qu'en présence d'urée (état dénaturé).

Le tableau 11 représente le récapitulatif des résultats obtenus en présence et en absence de solvants ainsi qu'à l'état dénaturé.

Tableau 11: Etude comparative des peptides obtenus dans les différents hydrolysats après un temps d'hydrolyse de 2,5 min. (- : absence du peptide ; x : présence du peptide). Les peptides communs sont marqués par des fonds colorés.

* Séquences non élucidées

Masse (Da)	Peptides	0% alcool	Présence d'alcool	Présence d'urée 6M
520,7	α133-137	x	_	_
563,7	β114-118	x	_	_
586,5	α59-65	x	_	_
653	α 137-141	x	x	_
668,6	α 100-105	_	x	_
695,6	β136-142	x	_	_
739,9	β114-120	x	_	_
775,7	α80-86	x	_	_
797	α 99-105	x	x	x
815,8	α129-136	x	_	_
*856	α 36-42, 37-43, 38-44, 116-123; ou β89-95, 96-102	_	_	x
*879	β9-16; α28-34, 127-134	_	_	x
903	β102-109	x	_	_
910	α 99-106	_	x	x
1003,8	α129-138	x	_	_
1023,2	α25-33	_	_	x
1039,1	β106-115	x	_	_
*1057,1	β87-95; α117-126, 116-126, 34-42	_	_	x
1067,6	α44-53	_	_	x
*1209,2	α51-63, 77-88	_	_	x
1238,1	α37-46	x	_	_
1265,4	β 114-124	_	x	_
1305	β74-84	x	_	_
1308	β31-40	x	_	x
*1324,8	β95-105; α65-76	_	_	x

1378,8	β114-125	x	_	_
1381	β1-13	x	_	x
*1403,3	α3-16, 84-94, 122-134; β127-140, 128-141	_	_	x
*1451,8	α129-141, 62-75; β59-63, 44-57	_	_	x
1270,5	α 96-106	_	x	_
1530,3	β126-140	x	_	_
1569,1	β30-41; α25-38, 106-120, 119-133	_	_	x
1692,1	β108-122, 114-128, 120-134; α107-122	_	_	x
1710,6	β70-84	x	_	_
*1789,9	α42-57, 49-67; β38-53	_	_	x
1813	β14-30	x	_	x
1917	α47-66	x	_	x
2040,4	α110-128	x	_	_
2045,8	β100-117	_	_	x
*2047,8	β123-142; α33-49	_	_	x
2087,4	α74-92	_	_	x
*2091,8	α102-121; β90-107	_	_	x
2123,3	α 67-86	_	x	_
2196	β 126-145	x	x	_
2253,6	34-53	x	_	_
2354	α 107-128	_	x	x
2392	β 85-105	_	x	_
*2742,2	α99-124, 2-29	_	_	x
2751,6	α 86-109	_	x	_
2838,2	α 107-133	_	x	_
2941,3	β 79-104	_	x	_
3151,5	α 107-136	_	x	x
*3174,2	β12-39, 21-48, 112-141	_	_	x
3176,6	β 1-30	_	x	_
3257,6	α 1-32	_	x	x
3297,7	β 62-91	_	x	_
3372	α 34-65	_	x	_

3404,8	α 1-33	_	x	x
3436	β71-101	_	_	x
3473,9	α 110-141	_	x	x
3520,1	β 2-34	_	x	_
3539,9	α 3-36	_	x	x
3556,1	β 114-145	_	x	_
3626,1	β45-78	_	_	x
3633,3	β22-54	_	_	x
3651,6	α 73-105	_	_	x
3651,1	α 73-105	_	x	_
3753,2	α1-36	_	_	x
3787,3	α 107-141	_	x	x
3820	β57-91	_	_	x
3900,5	α 106-141	_	x	_
4430,1	α 67-106	_	x	_
*4800	α 68-11, 90-133	_	_	x
4973	α 1-46	_	x	_
5437,3	β 77-125	_	x	x
*6091,2	α2-58, 71-126	_	_	x
6092	β 71-125	_	_	x
*6204	β 72-127; β52-110, 53-111, 81-137, 82-138	_	_	x
*6659	β58-117; α2-65, 3-66, 6-68, 23-84	_	_	x
*6773,1	α2-66; β49-110	_	_	x

Comme attendu, en milieu hydroalcoolique, la protéolyse de l'hémoglobine est limitée. En effet, alors qu'une cinquantaine de peptides ont pu être identifiés dans l'hydrolysat de l'hémoglobine à l'état dénaturé, seulement 29 peptides ont été identifiés dans l'hydrolysat en présence d'alcool et 24 peptides dans celui de l'hémoglobine à l'état natif.

Parmi les peptides obtenus, en présence d'alcools, 16 peptides peuvent être considérés comme des peptides communs aux différents hydrolysats. La plupart de ces peptides communs (8 peptides), ont été identifiés au niveau de l'hydrolysat d'hémoglobine dénaturée.

Cependant, Parmi les peptides identifiés, dix-sept peptides peuvent être considérés comme de nouveaux peptides présents seulement à ces conditions d'hydrolyses, c'est à dire lorsque l'hydrolyse de l'hémoglobine est réalisée en présence de 40% de méthanol, 30% d'éthanol, 20% propanol ou de 10% de butanol. Ces peptides sont la conséquence directe de l'effet des solvants sur la conformation de l'hémoglobine, donc sur les sites de coupures de la pepsine.

À l'état natif, sans solvant, l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine à pH 5,5, conduit à la formation de 24 peptides essentiellement de petite taille, entre 520-2195 Da, peptides résultant du mécanisme «one-by-one ». Tandis que l'identification des peptides issus de l'hydrolysat de l'hémoglobine dénaturée donne des peptides de taille comprise entre 797-6773 Da. Ce hydrolysat complexe étant dû au mécanisme "zipper". Toutefois, en présence de ces alcools et quelle que soit l'alcool, l'hydrolyse d'hémoglobine suit un mécanisme se trouvant entre celui « one by one » et «zipper». En effet, ces nouvelles conditions d'hydrolyse, ont permis l'identification de peptides intermédiaires de 796-5438 Da. La taille et le nombre des peptides sont plus élevés dans l'hydrolysat d'hémoglobine sans solvant et sont plus faibles dans l'hydrolysat de l'hémoglobine dénaturée.

I.1- Analyse comparative des peptides obtenus en absence et en présence de solvants : mise en évidence des domaines de flexibilité de l'hémoglobine

Les caractéristiques des peptides à DH= 1% après hydrolyse pepsique de l'hémoglobine à l'état natif et ceux des peptides obtenus en présence d'alcools, respectivement représentés par les tableaux 12 et 13.

Tableau 12: Masse moléculaire, séquence peptidique, pourcentage d'hydrophobie et charge globale des peptides issus de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine native par la pepsine en absence d'alcool.

Masse (Da)	Peptides	Séquence peptidique	Hydrophobie (%)	Charge nette à pH 7
2253,6	α34-53	(F)LSFPTTKTYFPHFDLSHGSA	30	+2
2195,4	β126-145	(L)QADFQKVVAGVANALAHRYH	50	+ 3
2040,4	α110-128	(L)ASHLPSDFTPAVHASLDKF	42	+1
1917,2	α47-66	(F)DLSHGSAQVKGHGAKVAAAL	45	+ 3
1813,2	β14-30	(F)WGKVKVDEVGGEALGRL	41	0
1710,6	β70-84	(S)FSNGMKHLDDLKGTF	33	+ 1
1530,3	β126-140	(L)QADFQKVVAGVANAL	60	0
1381,1	β1-13	MLTAEEKAAVTAF	61	-1
1378,8	β114-125	(L)ARNFGKEFTPVL	41	+1
1308,2	β31-40	(L)LVVYPWTQRF	50	+1
1305	β74-84	(G)MKHLDDLKGTF	36	+1
1238,1	α37-46	(F)PTTKTYFPHF	20	+2
1039,1	β106-115	(L)GNVLVVVLAR	70	+1
1003,8	α129-138	(F)LANVSTVLTS	50	0
903	β102-109	(N)FKLLGNVL	62	+1
815,8	α129-136	(F)LANVSTVL	62	0
796,9	α99-105	(F)KLLSHSL	37	+1
775,7	α80-86	(A)LSELSDL	42	0
739,9	β114-120	(L)ARNFGKE	28	+1
695,6	β136-142	(G)VANALAH	71	+1
652,8	α 137-141	(L)TSKYR	0	+1
586,5	α59-65	(H)GAKVAAA	71	+1
563,7	β114-118	(L)ARNFG	40	+1
519,5	α133-137	(V)STVLT	40	0

Tableau 13: Masse moléculaire, séquences, pourcentage d'hydrophobie, charge globale et prediction des structures secondaires des peptides issus de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine en présence d'alcools (40% méthanol, 30% éthanol, 20% propanol ou 10% butanol). Les logiciels « antimicrobial peptide database analysis » (http://aps.unmc.edu/) et « Pôle BioInformatique Lyonnais » (http://pbil.ibcp.fr) avec la « cons. Seq. Method » ont été utilisés pour étudier ces caractéristiques structurales.

Masse (Da)	Peptides	Séquences	Hydrophobie (%)	Charge nette à pH 7	Structure secondaire
5437,3	β 77-125	(H)LDDLKGTFAALSELHCDKLHVDPENFKLLGNVLVVVLARNFGKEFTPVL	48	0	53% α hélice
4972,6	α 1-46	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHF	43	+3	50% α hélice
4430,1	α 67-106	(L)TKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHSLL	42	+2	60% α hélice
3900,5	α 106-141	(L)LVTLASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVSTVLTSKYR	44	+3	53% α hélice
3787,3	α 107-141	(L)VTLASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVSTVLTSKYR	42	+3	47% α hélice
3651,1	α 73-105	(H)LDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHSL	42	+1	43% α hélice
3556,1	β 114-145	(L)ARNFGKEFTPVLQADFQKVVAGVANALAHRYH	42	+4	72% α hélice
3539,9	α 3-36	(L)SAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEALERMFLSF	47	+1	66% α hélice
3520,1	β 2-34	(M)LTAEEKAAVTAFWGKVKVDEVGGEALGRLLVVY	51	-1	58% α hélice
3473,9	α 110-141	(L)ASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVSTVLTSKYR	40	+3	56% α hélice
3404,8	α 1-33	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEALERMF	48	+1	67% α hélice
3371,8	α 34-65	(F)LSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAA	37	+5	67% Random Coil
3297,7	β 62-91	(A)HGKKVLDSFSNGMKHLDDLKGTFAALSELH	36	+3	72% α hélice
3257,6	α 1-32	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEALERM	46	+1	63% α hélice
3176,6	β 1-30	MLTAEEKAAVTAFWGKVKVDEVGGEALGRL	50	+4	42% α hélice
3151,5	α 107-136	(L)VTLASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVSTVL	50	+1	60% α hélice
2941,3	β 79-104	(D)DLKGTFAALSELHCDKLHVDPENFKL	42	0	58% α hélice
2838,2	α 107-133	(L)VTLASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVS	48	+3	56% α hélice
2751,6	α 86-109	(D)LHAHKLRVDPVNFKLLSHSLLVTL	50	+5	50% Random Coil
2392,7	β 85-105	(F)AALSELHCDKLHVDPENFKLL	47	0	43% α hélice
2353,6	α 107-128	(L)VTLASHLPSDFTPAVHASLDKF	45	+1	41% α hélice
2195,4	β 126-145	(L)QADFQKVVAGVANALAHRYH	50	+3	70% α hélice
2123,3	α 67-86	(L)TKAVEHLDDLPGALSELSDL	40	-3	85% α hélice
1270,5	α 96-106	(P)VNFKLLSHSLL	54	+2	91% Random Coil
1265,4	β 114-124	(L)ARNFGKEFTPV	36	+1	99% Random Coil
910,1	α 99-106	(F)KLLSHSLL	50	+2	99% Random Coil
797	α 99-105	(F)KLLSHSL	50	+2	99% Random Coil
668,8	α 100-105	(K)LLSHSL	37	+1	99% Random Coil
653,7	α 137-141	(L)TSKYR	0	+1	93% Random Coil

Alors que la plupart des peptides obtenus en absence de solvant possedent une taille inferieur ou egale à 10 acides aminés, l'analyse comparative des caractéristiques des peptides obtenus en absence ou en présence d'alcools, montre que les peptides de tailles superieur à 10 acides aminés (comprise antre 10-40 acides aminés) sont majoritairement obtenus lorsque l'hydrolyse se fait en milieu hydroalcoolique. De plus ces peptides ont pour la plupart, la capacité d'adopter une structuration secondaire en hélice alpha, ils possèdent une charge globale positive et sont de nature hydrophobe (avec 43,5% d'hydrophobie moyenne). D'après l'ensemble des coupures observées, les liaisons clivées sont majoritairement du type Leu-X ou Phe-X, avec des coupures préférentiellement localisées sur les sites Leu-X dans le cas de l'hydrolyse en présence d'alcool (environs 60% des coupures en leu-X contre seulement 30% en absence de solvants).

La spécificité de la pepsine semble donc d'avantage accrue en présence de solvant. Les peptides obtenus dans ces conditions d'hydrolyses nouvelles ont surtout une charge globale positive à un pH 7 (83% contre seulement 66% en absence de solvants). Le tableau 14 est un récapitulatif des différences observées lors de l'hydrolyse de l'hémoglobine en présence et en absence d'alcool.

Tableau 14 : Etude comparative des spécificités de coupures primaires de la pepsine en début d'hydrolyse (DH= 1%)

	En absence d'alcool	En présence d'alcool
Nombre de coupures total	47	48
Peptides issus de la chaîne alpha	13	20
Peptides issus de la chaîne béta	11	9
Localisation des coupures majoritaires (position C-terminale)	Leucine : 17 Phénylalanine : 13 Alanine : 3 Autres acides aminés : 14	Leucine : 27 Phénylalanine : 8 Alanine : 2 Autres acides aminés : 11

En début d'hydrolyse, en absence de solvants, la pepsine hydrolyse autant la chaîne alpha que la chaîne béta ; tandis qu'en présence de solvant la majorité des coupures s'effectue au niveau

de la chaîne alpha (deux fois plus de peptides sont issus de la chaîne alpha par rapport à ceux obtenus au niveau de la chaîne bêta). Cela peut être expliqué par les spécificités observées au niveau de chacune des chaînes et par le fait que l'alcool permet effectivement de réaliser une hydrolyse dirigée de l'hémoglobine.

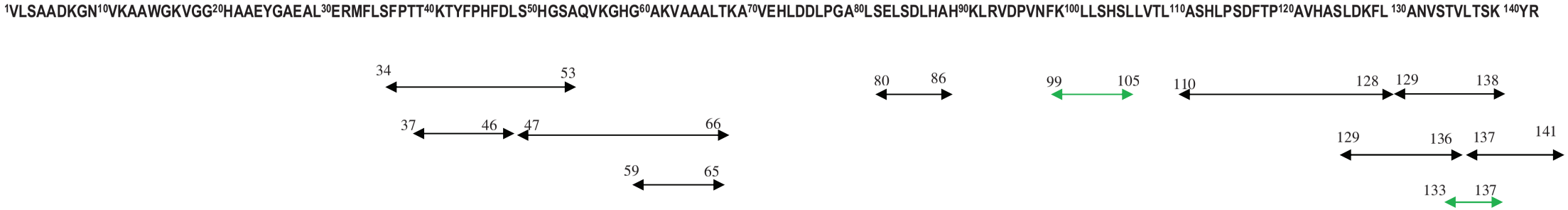
En effet, selon les études bibliographiques précédemment menées, la chaîne bêta bien que comprenant 145 résidus dont 57% de résidus hydrophobes n'est constituée que d'une faible proportion de résidus leucine. Ce qui n'est pas le cas de la chaîne alpha, qui pour environs le même pourcentage de résidus hydrophobes (54%) est constituée à majorité de résidus leucine et alanine. Ce qui favoriserait la préférence de coupure pour la chaîne alpha. Cependant étant donné que le pourcentage de peptides issus de la chaîne alpha est plus important en présence de solvant qu'en absence de solvant. Cela signifierait que l'alcool favoriserait l'exposition de la chaîne alpha, rendant ainsi plus accessibles les sites de coupures de la pepsine.

Les peptides obtenus peuvent être mis en relation avec l'hydrophobie des acides aminés des chaînes polypeptidiques. Les cartographies peptidiques des hydrolysats obtenus en absence et en présence de solvants sont représentées respectivement par les figures 37 et 38.

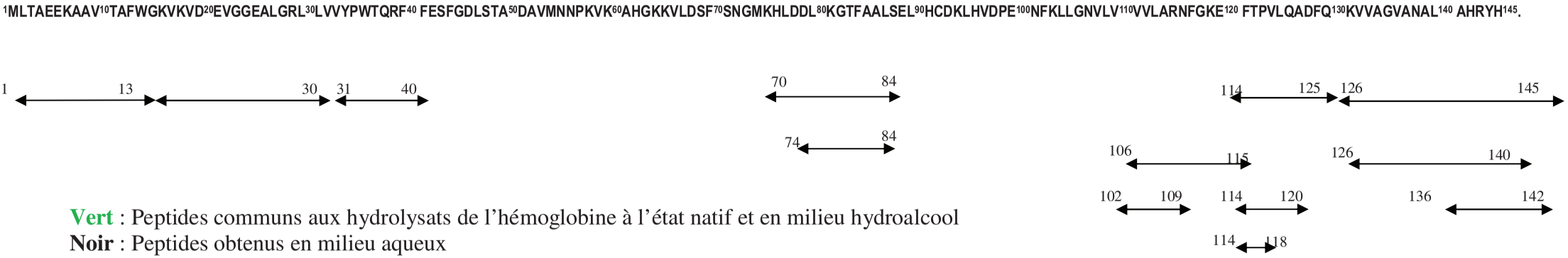
En effet, comme le montrent ces cartographies, les peptides détectés au stade précoce de l'hydrolyse (à DH = 1%) sont tous issus des régions N-terminale et C-terminale des chaînes α et β de l'hémoglobine bovine dans le cas de l'hydrolyse en milieu hydroalcoolique. Il s'agit des régions de 1 à 46 et 106 à 141 pour la chaîne α et des régions 1 à 30 et 114 à 145 pour la chaîne β. Ces régions possèdent des pourcentages d'hydrophobie relativement plus élevées (Su *et al.,* 2007).

Cependant, en présence des alcools, de nouveaux peptides situés dans la zone centrale de la chaîne α (en particulier dans la région 67 à 106), éventuellement à l'intérieur du cœur hydrophobe de la molécule, sont accessibles dès ce début de l'hydrolyse. Cela signifierait que la présence d'alcools, permettrait à la pepsine de cliver non seulement les liaisons peptidiques hydrophobes des régions exposées, mais aussi celles situées à l'intérieur de la protéine. De plus, lors de l'hydrolyse de l'hémoglobine dénaturée où tous les sites de clivage par la pepsine sont exposés, l'absence de peptides issus de cette région montre que l'enzyme utilise un nouveau chemin de clivage des chaînes de l'hémoglobine bovine dans ces milieux hydroalcooliques. L'hydrolyse s'effectue de façon ciblée et dirigée.

Chaîne α



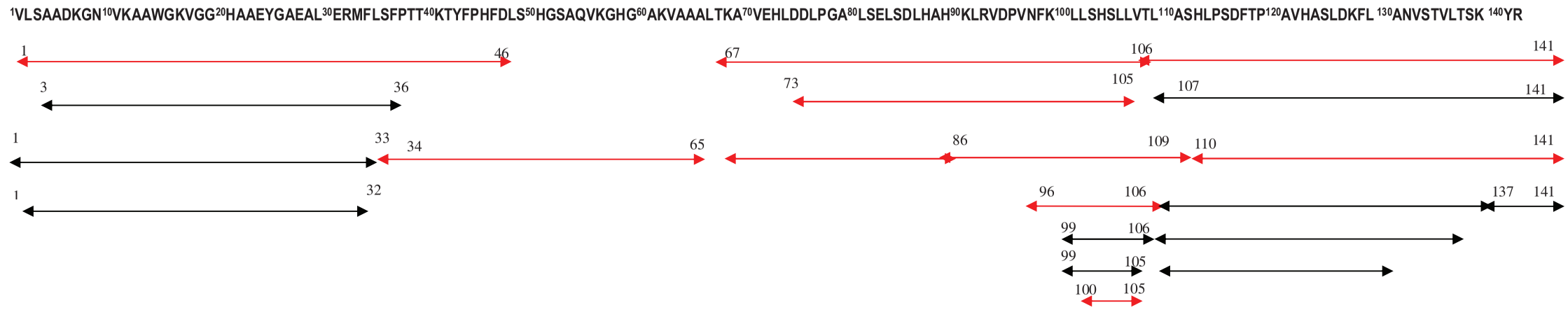
Chaîne β



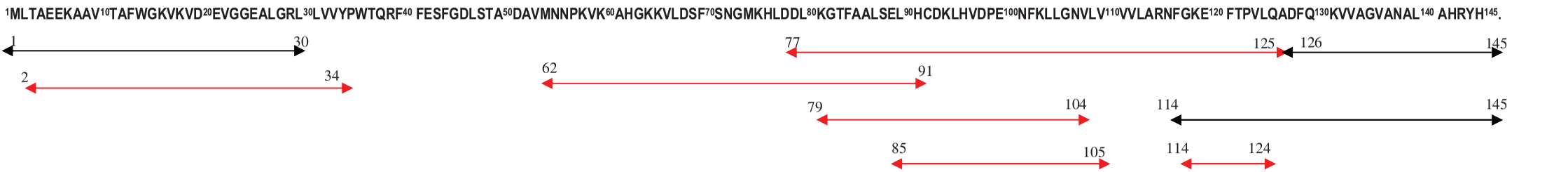
Vert : Peptides communs aux hydrolysats de l'hémoglobine à l'état natif et en milieu hydroalcool
Noir : Peptides obtenus en milieu aqueux

Figure 37 : Cartographie peptidique de l'hydrolysat pepsique de l'hémoglobine bovine native à pH 5,5, DH=1%

Chaîne α



Chaîne β



Rouge : Peptides présents uniquement dans l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine en présence d'alcool
Noir : Peptides communs présents en milieu hydroalcoolique et milieu aqueux (en présence et/ou en absence d'urée)

Figure 38 : Cartographie peptidique de l'hydrolysat pepsique de l'hémoglobine à pH 5,5 en présence d'alcool DH=1%.

I.2- Impact de la présence des solvants sur l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine

L'établissement de la carte peptidique des hydrolysats (Figures 37 et 38), permet de faire une étude des variations structurales de l'hémoglobine bovine et de mettre en relation les coupures enzymatiques et la variation structurale de l'hémoglobine.

En effet, en analysant les zones de coupure il est possible d'identifier les domaines de flexibilité de la protéine. En début d'hydrolyse, en absence d'alcool, dans la région α1-30 (extrémité N-terminale de la chaîne alpha) aucun peptide appartenant à cette zone n'a pu être identifié. Cela pourrait être dû au faite que les peptides appartenant à cette zone soient présents à l'état de trace, étant donné la présence de peptides dans la région environnante (α 34-35). Par contre, en présence d'alcools tous les peptides intermédiaires issus de cette zone ont été identifiés. Il semblerait donc que l'ajout d'alcool ait favorisé la stabilisation des peptides intermédiaires issus de cette extrémité N-terminale où le premier intermédiaire peptidique est le peptide α1-46.

Une mise en relation des études structurales effectuées dans le chapitre précédent et de domaine non clivé est possible puisque la région α 1-30 contient le tryptophane α 14 (Figure 39). En effet, lors des études de fluorescence, l'analyse de l'effet des solvants sur la structure de l'hémoglobine, avaient montré qu'en absence de solvant l'exposition du tryptophane soit inferieure à celle obtenue en présence des solvants. Comparativement à ce qui est observé dans le cas de l'hémoglobine humaine (Alper *et al.,* 1976), il se pourrait que les résultats obtenus au niveau de l'étude des variations structurales impliquent aussi ce tryptophane.

Compte tenu des analyses précédemment effectuées, un autre domaine de flexibilité pourrait donc être la région du cœur hydrophobe qui compte tenu du fait qu'en présence de solvants, l'hémoglobine subit des modifications conformationnelles favorisant les coupures obtenues dans cette région.

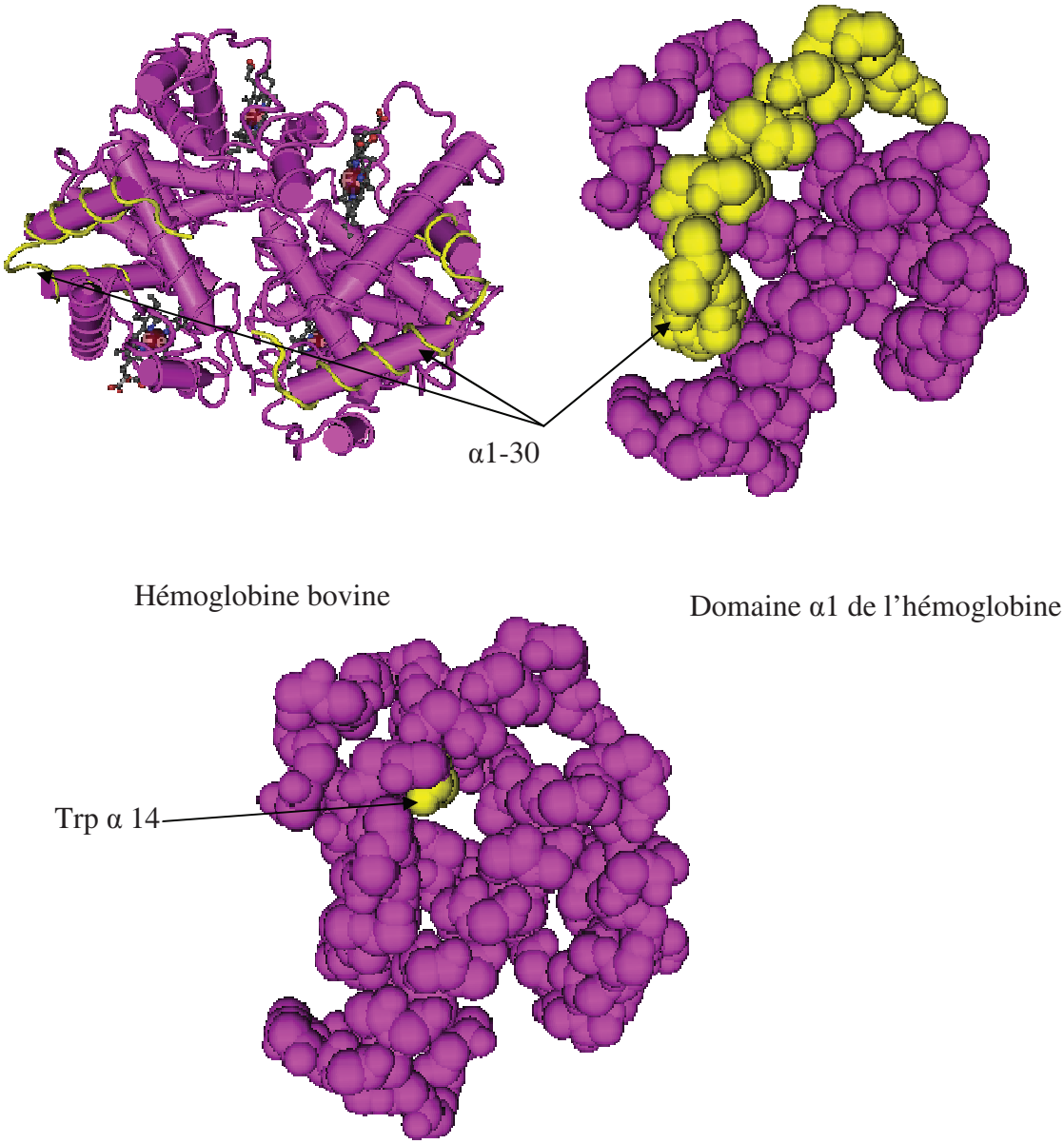


Figure 39 : Localisation du domaine α 1-30

La stabilisation des intermédiaires peptidiques est aussi effective dans les régions α 67 -106, α 106-141, β 77-125 et β 1-34. Cette stabilisation pourrait être liée à l'obtention de ce hydrolysat moins complexe mis en évidence en milieu hydroalcoolique.

En effet, les alcools choisis ayant la capacité de conserver ou d'induire la formation des structures secondaires des peptides et protéines comme ce fût démontré dans cette étude lors des analyses structurales de l'hémoglobine (Chapitre 2) a eu un effet non seulement sur les structures secondaires de l'hémoglobine mais aussi sur la conservation et/ou la formation des

structures secondaires (notamment des hélices alpha) des intermédiaires peptidiques produits dès le début de l'hydrolyse. Ces structurations pourraient avoir limité l'accessibilité des sites de clivage de la pepsine aboutissant ainsi, à une hydrolyse limitée et maîtrisée dans les milieux hydroalcooliques choisis.

I 3- La famille α 67-106 : Une nouvelle famille peptidique

L'hydrolyse de l'hémoglobine bovine réalisée en présence de 40% de méthanol, 30% d'éthanol, 20% de propanol ou 10% de butanol permet d'aboutir à la production de 29 peptides. Ces peptides sont localisés au niveau de la région C-terminale et N-terminale, mais aussi au niveau du cœur hydrophobe de l'hémoglobine (Figure 38).

Parmi les peptides issus de l'hydrolyse pepsique en présence des alcools précités, au début de l'hydrolyse la cartographie peptidique de la chaîne α permet de mettre en évidence entre autres, trois familles peptidiques classées en fonction de la génération peptidique produite et cela grâce à la capacité qu'ont ces alcools de stabiliser les peptides intermédiaires formés. Il s'agit des familles α1-46, α67-106, et α106-141. La particularité de la famille α 67-106, tient du fait que hormis le peptide 99-105, tous les membres de cette famille appartiennent aux 17 nouveaux peptides identifiés seulement en présence d'alcool. De plus, même dans le cas de l'hydrolyse à l'état dénaturé, dans cette étude ou dans les études précédemment réalisées au sein du laboratoire et en dehors, la stabilisation des intermédiaires peptidiques issus de cette famille n'a jamais été possible. Grâce à la présence des alcools, les intermédiaires peptidiques issus de cette famille ont pu être identifiés. Cette nouvelle famille constitue l'une des conséquences directes de l'ajout de solvant au cours de l'hydrolyse.

La famille α67-106 est constituée des peptides α67-106, α76-105, α96-106, α99-106, α99-105 et α100-105.

La mise en évidence de cette famille permet de faire un screening de tous les peptides potentiellement actifs issus de la chaîne alpha de l'hémoglobine bovine. L'hydrolyse en présence de ces alcools permet de stabiliser la structure secondaire des peptides intermédiaires produits, cette stabilisation pourrait être à l'origine d'un ralentissement de l'hydrolyse de ces peptides par la pepsine.

II- Peptides issus de l'hydrolysat après 24h d'hydrolyse

En vue de vérifier la similarité des peptides obtenus après 24h d'hydrolyse, les hydrolysats issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine à pH 5,5 en milieu aqueux , à l'état natif et dénaturé (présence d'urée 6M) ainsi que les hydrolysats réalisés en présence de 40% de méthanol, 30% d'éthanol, 20% de propanol ou de 10% de butanol ont tous été analysés par couplage LC-MS/MS. Des collectes de fractions issus de l'analyse chromatographique ont aussi été réalisées en vue d'effectuer de la spectrométrie de masse en tandem afin d'identifier certains peptides.

Comme ce fût le cas lors des analyses des hydrolysats de début d'hydrolyse, les analyses spectrométriques ont montré une similitude au niveau de l'identité des peptides pour tous les hydrolysats réalisés en milieu hydro alcoolique d'une part mais aussi une similitude entre les peptides issus de ces hydrolysats et ceux issus des deux hydrolysats réalisés en milieu aqueux. Ces résultats peuvent s'expliquer par la cinétique d'évolution d'une réaction enzymatique pour des temps d'hydrolyse plus importants (supérieurs à 15h).

En effet, les travaux précédemment réalisés au sein du laboratoire (Lignot, 1998) ont montré que la courbe d'évolution du degré d'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine, peut être représentée par une courbe exponentielle croissante de 0-15h, puis qui tend vers une phase stationnaire à partir de 15h, ce qui conduit à des peptides identiques au sein des hydrolysats. Comme ce qui est constaté dans cette présente étude, après 24h d'hydrolyse. Le figure 40 établit la cartographie peptidique des hydrolysats après 24h d'hydrolyse.

Cette cartographie montre que les peptides finaux peu hydrophobes obtenus après 24h d'hydrolyse, majoritairement de taille inférieure à 10 acides aminés, sont repartis à tous les niveaux des chaînes alpha et bêta et cela de façon quasi identique. En effet, 69 peptides ont été identifiés dont 36 sont issus de la chaîne α et 32 de celle β.

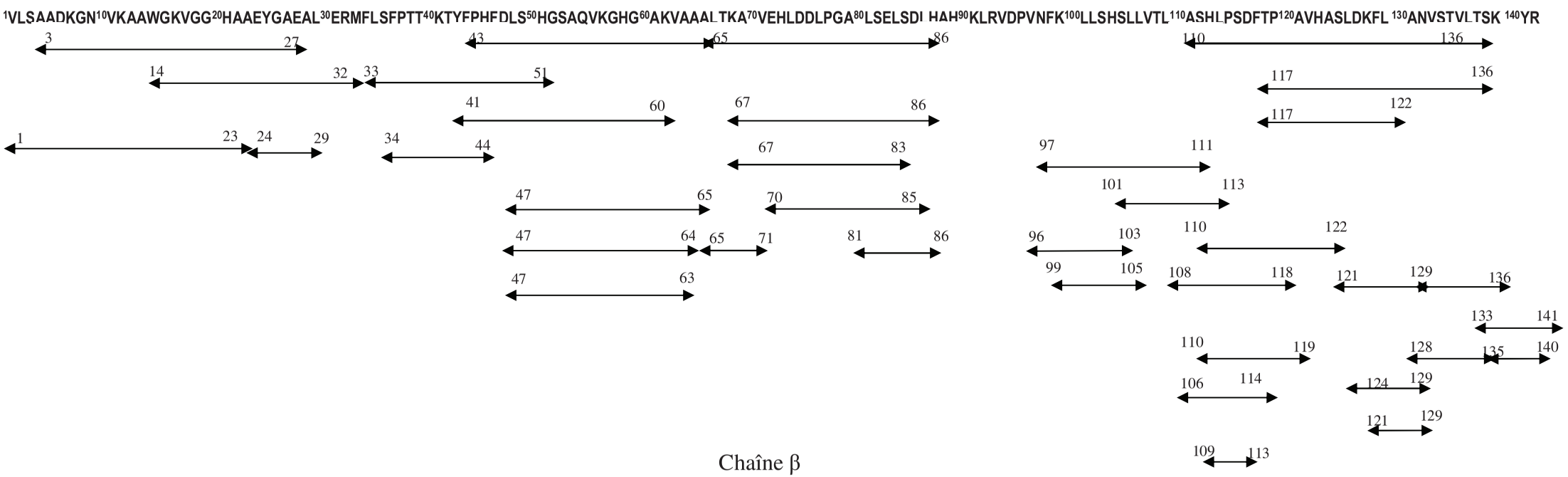


Figure 40 : Cartographie peptidique de l'hydrolysat pepsique de l'hémoglobine bovine à pH 5,5, après 24h

CONCLUSION :

L'analyse chromatographique et spectrométrique des hydrolysats pepsiques de l'hémoglobine bovine en milieux aqueux et hydro alcooliques a permis au cours de ce chapitre, d'identifier, dés le début de l'hydrolyse (DH=1%), des populations peptidiques différentes aux caractéristiques variables entre les hydrolysats témoins et ceux obtenus dans les concentrations d'alcool choisis.

En effet, en milieu aqueux, l'hydrolyse de l'hémoglobine native a aboutit à l'obtention de 24 peptides finaux provenant équitablement des chaînes alpha et béta de l'hémoglobine, majoritairement de petite taille (taille inferieure ou égale à 10 acides aminés). Alors qu'une cinquantaine de peptides environs a été obtenue lors de l'hydrolyse de l'hémoglobine en conditions dénaturantes, 29 peptides de taille comprise entre 10 et 40 acides aminés dont 90% sont des peptides intermédiaires, de nature hydrophobe et capables de se structurer en hélices alpha ont été identifiés en milieux hydroalcooliques. L'obtention de ce hydrolysat spécifique et moins complexe pourrait être fortement lié à la spécificité de clivage des chaînes polypeptidiques par la pepsine localisée en position C-terminale des leucines plus importante en milieu hydroalcoolique, et à la capacité qu'ont ces alcools d'induire la formation ou de conserver les structures secondaires des intermédiaires peptidiques formés et de l'hémoglobine bovine.

La stabilisation des peptides intermédiaires formés grâce à la présence des alcools a permis de mettre en évidence la flexibilité protéique et l'identification de nouvelles séries peptidiques dont la série α 67-106 spécifiques à ces hydrolysats hydroalcooliques. La similarité des hydrolysats peptidiques obtenus en début d'hydrolyse en milieux hydroalcooliques, et après 24h d'hydrolyse dans entre les hydrolysats témoins et ceux obtenus en milieu hydroalcoolique, a permis de mettre en évidence un nouveau chemin réactionnel d'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine en présence des alcools choisis.

Chapitre 4 ***:***

Mise en évidence de l'activité antimicrobienne : Intérêt des peptides obtenus en milieu hydroalcoolique

I- Mise en évidence des activités biologiques des fractions peptidiques issues de l'hydrolysat obtenu en milieu hydro alcoolique

Au cours des dernières décennies, la recherche de nouveaux médicaments a mis en évidence un groupe de polypeptides de taille moyenne, de 10- 40 acides aminés présentant des activités biologiques très intéressantes (Toke, 2006). Parmi ces activités l'activité, antimicrobienne demeure la plus représentative compte tenu du nombre important de peptides découverts (plus de 800 peptides identifiés à ce jour et consultables sur http:// www.bbcm.univ.trieste.it/_tossi/pag2.htm. Ces peptides antimicrobiens ou AMPs possèdent généralement une charge globale positive à un pH physiologique, bien que quelqu'un faible nombre de AMPs négativement chargés ait été découvert (Lai *et al.,* 2002 ; Brogden *et al.,* 2005). A partir de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine, l'obtention de ces peptides de taille moyenne susceptibles de présenter une activité antimicrobienne se fait grâce à la réalisation d'un degré d'hydrolyse très court. En présence de 40% méthanol, 30% d'éthanol, 20% de propanol ou de 10 % de butanol, comme précédemment décrit, un degré d'hydrolyse de 1% a donc été appliqué. A ce degré d'hydrolyse, les profils chromatographiques ainsi que les peptides obtenus étant identiques, La mise en évidence et la caractérisation de peptides actifs ont été effectués sur l'hydrolysat de l'hémoglobine bovine par la pepsine à pH 5,5 en présence de 10% de butanol. Après analyse par CLHP, les fractions chromatographiques ont été numérotées de 1-12 (figure 41), identifiées et collectées. Chacune des fractions collectées a ensuite été évaporée par speed-vac puis 1 mg a été solubilisé dans de l'eau distillée afin de tester leurs activités antimicrobiennes.

Cette activité a été évaluée sur milieu solide selon la méthode décrite dans le chapitre matériels et méthodes. La présence d'une zone d'inhibition met en évidence l'activité antimicrobienne. La cécropine A, un peptide antimicrobien a été utilisé comme témoin positif. Les résultats des analyses effectuées sont illustrés par le tableau 15. La photo 2 est un exemple des lectures effectuées sur boîte de Pétri.

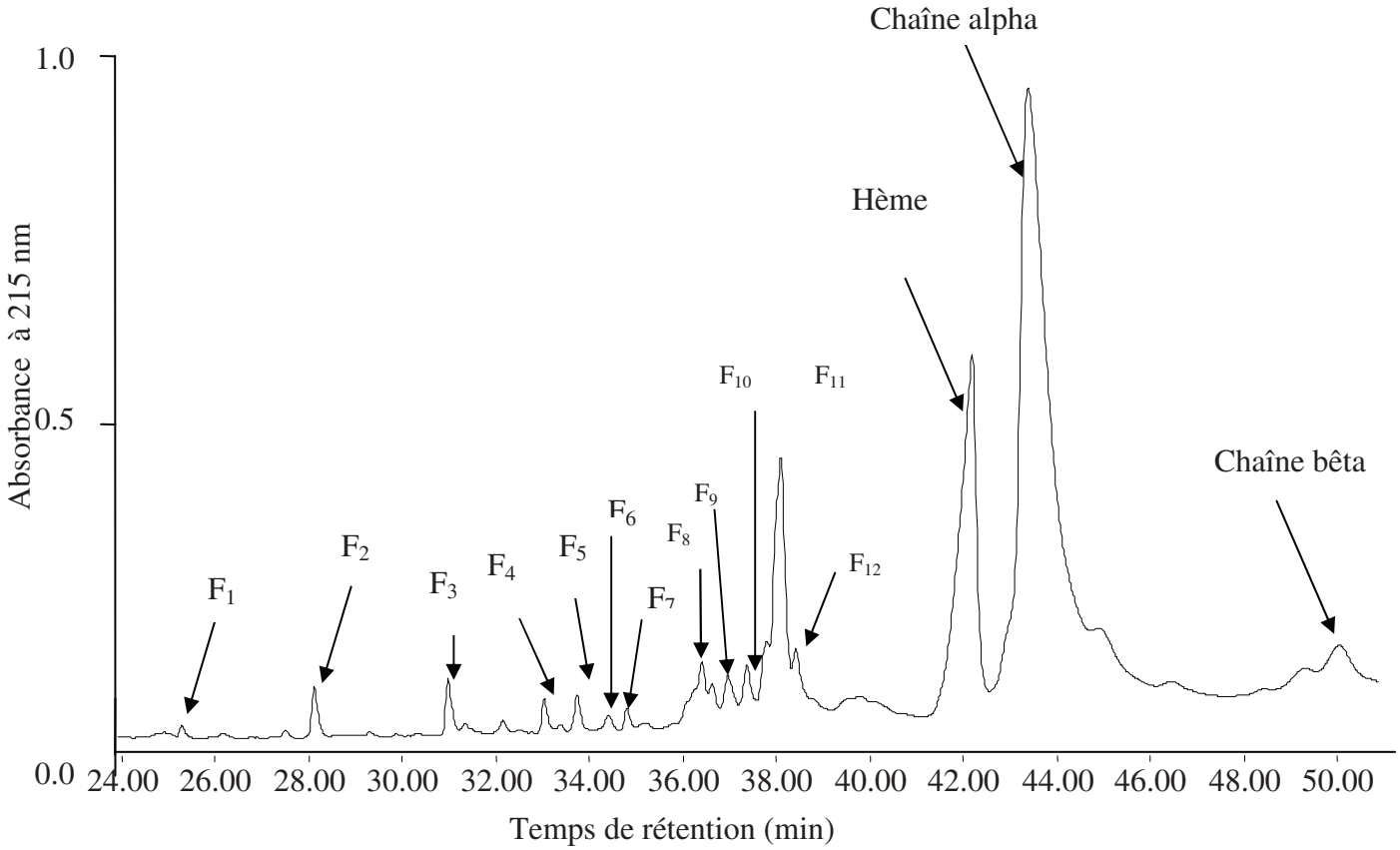


Figure 41 : Profil chromatographique de l'hydrolysat à DH=1% en présence d'alcool présentant les différentes fractions.

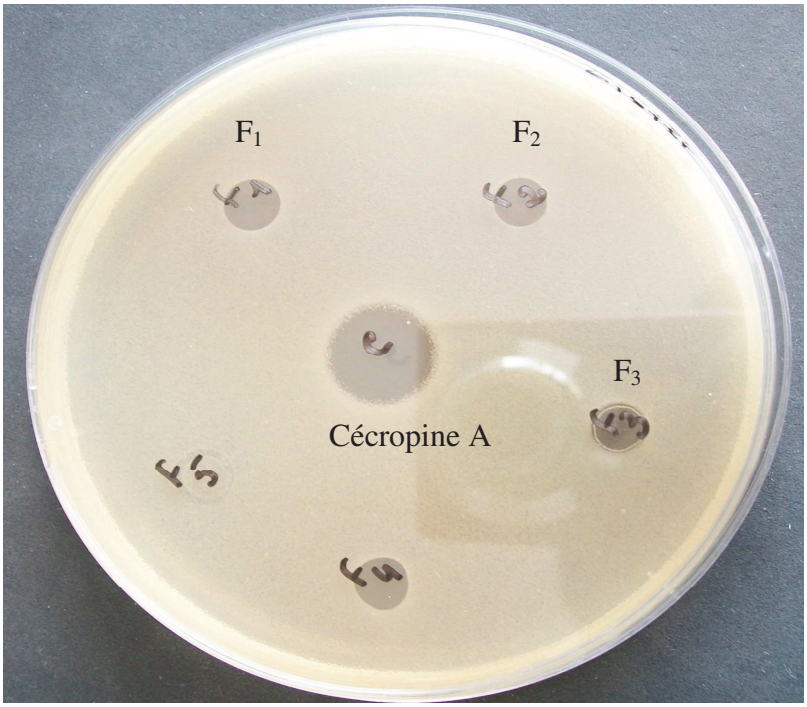


Photo2: Boîte de pétri présentant des zones d'inhibition. La souche testée est *Staphylococcus aureus.*

Tableau 15 : Activité antimicrobienne de fractions issues de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine en présence de 10% de butanol.
Les peptides précédemment identifiés (Nedjar-Arroume *et al.,* 2008) sont en caractère gras. Les fractions actives sont identifiées par un fond coloré. + : actif, - : pas actif, +/- : faiblement actif.

			Souches microbiennes			
Fractions	Masse (Da)	Fragments	*M. luteus A270*	*L. innocua*	*S. aureus*	*E. coli*
F_1	797 668,8	α 99-105 α 100-105	+	+	+	+
F_2	910 **653,7**	α 99-106 **α 137-141**	+	+	+	+
F_3	3297,7 3371,8 **3257,6**	β 62-91 α 34-65 **α 1-32**	+	+	+	+
F_4	2123,3 2392,7 2353,6	α 67-86 β 85-105 α 107-128	+	+	+	+
F_5	3520,1 3539,9 3404,8 3651,1	β 2-34 α 3-36 α 1-33 α 73-105	+	+	+/-	+
F_6	**2195,4** 1270,5 1265,4 2941,3	**β 126-145** α 96-106 β 114-124 β 79-104	+	+	+/-	+
F_7	4430,1 **3176,6** 2751,6	α 67-106 **β 1-30** α 86-109	+	+	+	+
F_8	5437,3	β 77-125	-	-	-	+/-
F_9	**2838,2**	**α 107-133**	+	+	+	+
F_{10}	4972,6 3473,9	α 1-46 α 110-141	+	+	+	+
F_{11}	**3151,5** **3787,3** **3556,1**	**α 107-136** **α 107-141** **β 114-145**	+	+	+	+
F_{12}	3900,5	α 106-141	+	+	+	+
Chaîne Alpha	15053,1	α 1-141	+	+	+	+
Chaîne béta	15954,3	β 1-145	-	-	-	+
hème	616		-	+/-	-	+/-

Comme le montre le tableau 15, toutes les fractions présentent une activité antimicrobienne. Parmi ces fractions, les fractions 8, 9 et 12 constituent des fractions pures. Les diamètres d'inhibition varient de 0,5-0,9 cm tandis qu'ils sont de 1,5 cm dans le cas du témoin positif, la

cécropine A. Toutefois, il est important de constater que la chaîne alpha de l'hémoglobine présente aussi une activité antimicrobienne contre les souches testées, avec un diamètre d'inhibition variant de 1,2-1,5 cm. La chaîne béta quant à elle n'a montré aucune activité vis-à-vis des souches testées. En effet, très peu d'études font état de l'activité antimicrobienne des chaînes de l'hémoglobine, bien que cette protéine soit l'une des mieux caractérisée en raison de sa fonction principale de transporteur d'oxygène. Aucune étude ne met en évidence la présence d'activité concernant les chaînes de l'hémoglobine bovine, la plupart des études concernant l'hémoglobine humaine.

Parish *et al.,* (2001) avaient démontré que les chaînes de l'hémoglobine humaine, ainsi que le tétramère lui-même, présentaient une activité antimicrobienne contre un large panel de bactéries gram- et gram+. Récemment Zhou *et al*. (2008) ont montré que les chaînes alpha/béta de l'hémoglobine humaine présentaient une activité antimicrobienne vis-à-vis d'*Escherichia coli* et que la présence de ces chaînes pouvait entraîner une réduction de la contamination vaginale par cette bactérie chez le rat.

A l'image d'autres protéines telles que le Lysozyme (composée de 129 acides aminés) découvert par Alexander Fleming en 1922 et utilisé depuis plusieurs années dans les domaines des industries pharmaceutiques et agroalimentaires, les chaînes de l'hémoglobine et surtout la chaîne alpha, faciles à isoler en concentration importante, pourraient aussi constituer un nouveau matériel applicable dans ces domaines.

Les fractions non pures issues de l'hydrolyse de l'hémoglobine en présence d'alcool, ont ensuite été séparées afin d'évaluer l'activité des peptides vis-à-vis des souches bactériennes. Compte tenu de la faible concentration des peptides obtenus cette activité a été testée sur trois souches bactériennes selon la méthode de mise en évidence précédemment décrite : *Micrococcus luteus, Listeria innocua* et *Escherichia coli.* Une concentration de 1mg/ml de chaque peptide a été utilisée. Le tableau 16 représente les résultats obtenus suite à ces tests d'activité.

Tableau 16 : Activité antimicrobienne des peptides présents dans les différentes fractions issues de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine en présence de 10% de butanol.
Les peptides précédemment identifies (Nedjar-Arroume *et al.,* 2008) sont en caractère gras. Les fractions actives sont identifiées par un fond coloré. + : actif, - : pas actif, +/- : faiblement actif.

			Souches microbiennes		
Fraction	Masses (Da)	Fragments	*M. luteus*	*L. innocua*	*E. coli*
F_1	797	α 99-105	+	+	+
	668,8	α 100-105	+	+	+
F_2	910	α 99-106	+	+	+
	653,7	**α 137-141**	+	+	+
F_3	3297,7	β 62-91	+	+	+
	3371,8	α 34-65	+	+	+
	3257,6	**α 1-32**	+	+	+
F_4	2123,3	α 67-86	-	-	-
	2392,7	β 85-105	-	+/-	-
	2353,6	α 107-128	+	+	+
F_5	3520,1	β 2-34	-	-	-
	3539,9	α 3-36	+	+	+
	3404,8	α 1-33	+	+	+
	3651,1	α 73-105	+	+	+
F_6	**2195,4**	**β 126-145**	+	+	+
	1270,5	α 96-106	+	+	+
	1265,4	β 114-124	+	+	+
	2941,3	β 79-104	+	+	+
F_7	4430,1	α 67-106	+	+	+
	3176,6	**β 1-30**	+	+	+
	2751,6	α 86-109	+	+	+
F_8	5437,3	β 77-125	-	-	+/-
F_9	**2838,2**	**α 107-133**	+	+	+
F_{10}	4972,6	α 1-46	+	+	+
	3473,9	α 110-141	+	+	+
F_{11}	**3151,5**	**α 107-136**	+	+	+
	3787,3	**α 107-141**	+	+	+
	3556,1	**β 114-145**	+	+	+
F_{12}	3900,5	α 106-141	+	+	+

Parmi les peptides identifiés seulement deux peptides ne sont pas des peptides actifs vis-à-vis des souches gram+ sélectionnés; il s'agit des fragments α 67-86 et β 2-34, tous deux de charge globale négative (respectivement de -3 et -1) à pH 7. Toutefois, ces peptides contiennent ou

sont issus de fragments ayant présentés des activités antimicrobiennes. La perte d'activité de ces peptides vis-à-vis des souches testées pourrait être liée à leur charge à pH neutre.

Le peptide α 67-86 est issu de la série α 67-106. Les autres fragments (73-105, 96-106,99-106, 99-105 et 100-105), de charge globale positive à pH neutre, ont montré une activité antimicrobienne.

^{67}TKAVEH^{73}LDDLPGALSELSD^{86}LHAHKLRVDP^{96}VNF^{99}K^{100}LLSHSL^{105}L^{106}



α 67-86

Tandis que le peptide β 2-34 est issu du peptide β 1-30, qui a préalablement montré une activité antimicrobienne contre les mêmes souches.

Les peptides β 77-125 et β 85-105 quant à eux, ont présenté une très faible activité respectivement vis-à-vis des souches *Escherichia coli* et *Listeria innocua*.

La CMI des peptides a été déterminée selon la méthode précédemment décrite en microplaque (cf section Matériels et méthodes), en microplaque. Cette CMI a été déterminée vis-à-vis de, *Listeria innocua, Escherichia coli, Salmonella enteridis et Staphilococcus Aureus.*

La détermination de la CMI (tableau 17) montre que ces peptides actifs présentent des activités antimicrobiennes avec des CMI allant de 1-183 µM vis à vis des souches testées. Hormis les huits peptides précedemment identifiés (Nedjar-Arroume *et al.,* 2008), les dix-neuf nouveaux peptides antimicrobiens possedent des CMI non negligeable, pouvant meme atteindre 5 µM, comme dans le cas des peptides α 34-65 et β 62-91. Parmis les 15 peptides spécifiques au milieu hydro alcoolique, 13 de ces peptides présentent des CMI allant de 5 - 183 µM. Ce tableau montre que la chaîne α, comparativement à celle β, est très active vis-à-vis des quatre souches testée, avec une CMI pouvant même atteindre 2 µM.

Tableau 17 : Détermination de la CMI des peptides actifs issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine en présence de 10% de butanol.
Les peptides précédemment identifiés (Nedjar-Arroume *et al.,* 2008) sont en caractère gras. Les peptides non actifs sont identifiés par un fond coloré. ND : Non Déterminé.

			CMI : µM		
Fraction	Masses (Da)	Fragments	*Micrococcus luteus*	*Listeria innocua*	*Escherichia coli*
F_1	797 668,8	α 99-105 α 100-105	39,2 46,78	39,2 187,1	78,4 46,78
F_2	910 **653,7**	α 99-106 **α 137-141**	34 9	34 1	68 9
F_3	3297,7 3371,8 **3257,6**	β 62-91 α 34-65 **α 1-32**	18 9 90	5 9 38	5 5 154
F_4	2123,3 2392,7 2353,6	α 67-86 β 85-105 α 107-128	- - 53	- ND 53	- - 26
F_5	3520,1 3539,9 3404,8 3651,1	β 2-34 α 3-36 α 1-33 α 73-105	- 70 73 43	- 35 73 43	- 70 146 171
F_6	**2195,4** 1270,5 1265,4 2941,3	**β 126-145** α 96-106 β 114-124 β 79-104	71 24 6 170	71 24 6 42	71 98 12 170
F_7	4430,1 **3176,6** 2751,6	α 67-106 **β 1-30** α 86-109	141 45 45	35 45 11	35 45 11
F_8	5437,3	β 77-125	-	-	183
F_9	**2838,2**	**α 107-133**	9	37	73
F_{10}	4972,6 3473,9	α 1-46 α 110-141	100 72	25 36	100 72
F_{11}	**3151,5** **3787,3** **3556,1**	**α 107-136** **α 107-141** **β 114-145**	76 87 85	38 43 85	76 87 73
F_{12}	3900,5	α 106-141	64	32	64
Chaîne α	15053,1	α 1-141	2	41	10 (et *Staphylococcus aureus*)
Chaîne β	15954,3	β 1-145			31
Hème	616			ND	

II- Analyse de l'activité antimicrobienne de peptides issus de la famille α 67-106 : effet bactéricide ou bactériostatique ?

Quatre peptides issus de la famille α67-106 ont été choisis afin d'évaluer leur activité antimicrobienne :

- α 67-106 : TKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHSLL (4430 Da)
- α 73-105 : LDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHSL (3651 Da)
- α 99-105 : KLLSHSL (797 Da)
- α 100-105 : LLSHSL (668,9 Da)

Après détermination de la CMI vis-à-vis de, *Listeria innocua, Escherichia coli, et Staphylococcus Aureus,* dont le récapitulatif des résultats obtenus est présenté dans le tableau 18, l'effet bactéricide ou bactériostatique de peptides a ensuite été évalué (tableau 19).

Tableau 18: CMI des peptides issus de la famille α 67-106

	CMI en µM			
	α 67-106	α 73-105	α 99-105	α 100-105
E. Coli	35,27	171,18	78,4	46,79
L. innocua	35,27	42,79	39,2	187,1
M. Luteus A270	141,08	42,79	39,2	46,78
S. Aureus	-	-	39,2	-
S. enteritidis	-	-	-	-

Tableau 19: Taux de mortalité induit par les peptides issus de la famille α 67-106

	Pourcentage de mortalité (%)			
	α 67-106	α 73-105	α 99-105	α 100-105
E. Coli	100	93	83	100
L. innocua	100	100	100	63
M. Luteus	100	100	100	100
S. Aureus	-	-	100	-

Comme le montre le tableau 8, ces peptides appartenant à la famille α 67-106, présentent tous une activité antimicrobienne avec une CMI comprise entre 32,27- 187,1 µM. la population

microbienne initialement de 2.10^6 UFC/ml dans les puits correspondants à la CMI est finalement comprise entre 126- 284 10^4 UFC/ml après 24 h d'incubation. Ce qui correspond à une population finale de 63 à 100% (tableau 19). Ces résultats mettent en évidence le caractère bactéricide de ces peptides vis-à-vis de certaines souches bactériennes.

Une analyse des caractéristiques de ces peptides (tableau 20), montre que ces 4 peptides possèdent une charge globale positive et sont de structure variable. Cette charge positive a permis leur interaction avec les membranes microbiennes, les rendant ainsi actifs.

Tableau 20: Caractéristiques des peptides purs

Sequence des peptides	Masse (Da)	Nombre d'acides aminés	[a]Charge à pH 7	[b]Structure	[a]Pourcentage d'hydrophobie
α 67-106	4429	40	+2	56,27 % hélice	42
α 73-105	3650	33	+1	36,36 % hélice	42
α 99-105	796	7	+2	64,28% Random coil	50
α 100-105	667	6	+1	66,66 % Random coil	37

[a]Les caractéristiques structurales ont été obtenues à partir du site internet d'analyse des séquences peptidiques du pôle bioinformatique lyonnais (http://pbil.ibcp.fr) en utilisant les méthodes MLRC et cons. Seq.
[b]La banque de données « antimicrobial peptide database » (http://aps.unmc.edu/) a été utilisée pour la détermination de l'hydrophobie et de la charge à pH 7 (Wang et Wang, 2004).

CONCLUSION :

Prenant pour exemple l'hydrolysat obtenu en présence de 10% de butanol, l'activité antimicrobienne des peptides obtenus a été effectuée au cours de ce chapitre. Cette étude a consisté à une mise en évidence de l'activité sur milieu gélosé et une détermination de la CMI en milieu liquide en microplaque. L'effet bactéricide ou bactériostatique de certains de ces peptides a aussi été déterminé.

Suite à l'analyse chromatographique 12 fractions, ont été collectées ainsi que les chaînes de l'hémoglobine afin de mettre en évidence leur activité antimicrobienne. Toutes les fractions collectées ainsi que les chaînes de l'hémoglobine ont présenté une activité antimicrobienne. La forte activité de la chaîne alpha comparée à celle béta, avec une CMI pouvant atteindre 2µM a été constaté. Cela peut s'expliquer par la différence des caractéristiques spécifiques de cette chaîne en comparaison avec la chaîne béta : charge globale et pourcentage d'hélices plus importants.

Parmi les 29 peptides obtenus en présence des alcools, 26 ont présenté une activité antimicrobienne vis-à-vis de toutes les souches testées, 13 peptides étant spécifiques à la présence des alcools. Quatre peptides issus de la nouvelle famille α 67-106 ont montré un effet bactéricide vis-à-vis des souches testées.

Chapitre 5 :

Autre activité induite par la famille α 67-106 : Inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine.

I- Rappels bibliographiques

Les maladies cardiovasculaires représentent la plus grande cause de décès chez l'adulte dans les pays industrialisés (Bonow *et al.*, 2002). L'hypertension se traduit par une pression sanguine élevée (> 140 mm Hg pour la pression systolique et > 90 mm Hg pour la pression diastolique selon les limites fixées par l'Organisation Mondiale de la Santé). Cette affection constitue le facteur de risque principal sur le plan cardiovasculaire. Les éléments contribuant majoritairement à l'augmentation de la pression sanguine sont le volume sanguin, le débit cardiaque et les résistances périphériques vasculaires (Page *et al.*, 1999). La pression artérielle est maintenue par une régulation du débit cardiaque et des résistances vasculaires périphériques, sous le contrôle rénal du volume de liquide intra-vasculaire (Figure 42). Tous les médicaments antihypertenseurs agissent en modifiant ces paramètres.

Lorsque la pression artérielle diminue lors d'un état de choc, d'une hémorragie ou de toute autre cause, de la rénine est sécrétée par le rein. Cette rénine va agir sur une protéine plasmatique fabriquée par le foie et libérer ainsi un décapeptide : l'angiotensine I.

Le Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (SRAA) est le système endocrine le plus important dans le contrôle de la pression sanguine (Beevers *et al.,* 2001). Les enzymes clés du SRAA sont la rénine et l'enzyme de conversion de l'angiotensine-I (Figure 42).

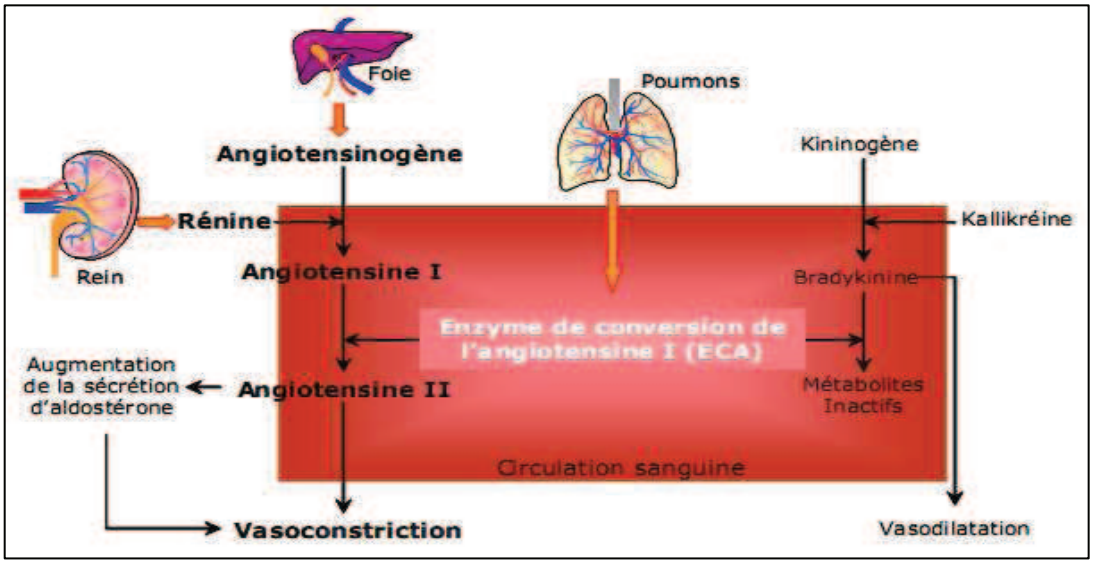


Figure 42: Représentation du Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (SRAA)

La rénine permet la conversion de l'angiotensinogène en angiotensine-I (inactive), qui sera ensuite clivée (en position C terminale -His-Leu) par l'ECA en angiotensine-II, un

octapeptide fortement vasoconstricteur (Merk index). Sa présence entraîne une constriction rapide des artérioles et donc une remontée rapide de la pression artérielle. Mais l'action de l'angiotensine II est double, elle stimule également la libération d'aldostérone. Ce qui entraîne au niveau des reins, une accumulation de sodium et une excrétion du potassium. L'accumulation du sodium s'accompagne obligatoirement d'une rétention de l'eau, ce qui va accroître les volumes extracellulaires, donc le débit sanguin et par voie de conséquence la pression artérielle et la neutralisation de la production de rénine.

L'ECA inactive aussi la bradykinine (peptide vasodilatateur). Le rôle clé de l'ECA dans le SRAA combiné au faite qu'elle soit ubiquitaire, justifie qu'elle ait été choisie comme cible privilégiée des agents thérapeutiques à même d'intervenir contre l'hypertension (Maubois *et al.*, 1991). L'inhibition de l'ECA permet de prévenir la formation d'angiotensine II, le peptide vasoactif du système rénine-angiotensine. L'ECA est une ectoenzyme ancrée dans la membrane cellulaire, et ayant son site actif à la surface des cellules.

Caractéristiques des peptides à activité antihypertensive

L'examen systématique des séquences de peptides inhibiteurs de l'ECA a montré qu'ils avaient tous l'enchaînement Pro-Pro, Ala-Pro ou Ala-Hyp à leur extrémité C-terminale, (Maruyama et Suzuki, 1982).

Cependant, en général, la présence d'acides aminés aromatiques tels que le Trp, Tyr et Phe ou d'acide aminé tel que la Pro à l'extrémité C-terminale renforce l'activité inhibitrice (Gobbetti *et al.*, 2000). Toutefois, ces caractéristiques ne sont ni suffisantes ni essentielles pour conférer l'activité inhibitrice de l'ECA.

Cheung *et al.* (1980) ont montré que les peptides constitués d'acides aminés ramifiés tels que la valine ou l'isoleucine à l'extrémité N-terminale présentent des activités d'inhibition de l'ECA et que les acides aminés de la partie C-terminale contribuent fortement à l'élaboration de l'activité.

II- Mise en évidence de l'activité anti hypertensive

Le test d'activité d'inhibition de l'ECA mis en œuvre est inspiré de la méthode originale de dosage de l'activité de l'ECA (Nakamura *et al.*, 1995). Cette méthode consiste à doser la quantité d'acide hippurique libérée au cours de l'hydrolyse de l'Hippuryl-Histidyl-Leucine (HHL, Sigma-Aldrich, Germany) par l'ECA de poumon de lapin (Sigma Aldrich, Germany). 200 µl d'une solution HHL 5 mM dans du tampon borate 100 mM, NaCl 300 mM pH 8,3 sont

mélangés à 80 µl d'inhibiteur (échantillons à tester) préparé dans le même tampon, puis préincubés à 37 °C pendant 3 minutes. L'initiation de la réaction se fait par ajout de 20 µl d'enzyme à 0,1 U ml^{-1} ajoutée au volume réactionnel et incubé pendant 30 minutes à 37 °C. La réaction est arrêtée par ajout de 250 µl d'HCl à 1N. Après arrêt de la réaction, 100 µl du volume réactionnel sont injectés en CLHP (système Waters TM 600) sur colonne de phase inverse C_{18} et élués par un gradient linéaire d'acétonitrile de 0 à 28% en 50 minutes et de 28 à 47% en 20 minutes. L'acide hippurique libéré est quantifié à 228 nm par le logiciel Millénium par estimation des aires sous la courbe du pic d'acide hippurique. Le taux d'inhibition de l'ECA est déterminé par la formule suivante :

$$\text{Inhibition de ECA (\%)} = \frac{T - I}{T - C} \times 100$$

I : Inhibiteur

L'activité enzymatique témoin (T) est mesurée en remplaçant les 80 µl d'inhibiteur par du tampon et l'autolyse (C) en remplaçant les 20 µl d'enzyme par 20 µl de tampon. Chaque essai est réalisé trois fois.

Détermination des CI_{50}

L'activité propre des peptides antihypertensifs est caractérisée en déterminant sa CI_{50}. Cette valeur représente la concentration en peptides qui permet d'inhiber 50% de l'activité de l'ECA dans les conditions du test. L'équation de la droite de régression linéaire de la courbe d'inhibition permet alors de calculer la CI_{50}. Les résultats illustrés sur la figure 43, représentant un exemple de la détermination de CI_{50}, montrent que dans cet example, la CI_{50} est de l'ordre de 1 mg/ml.

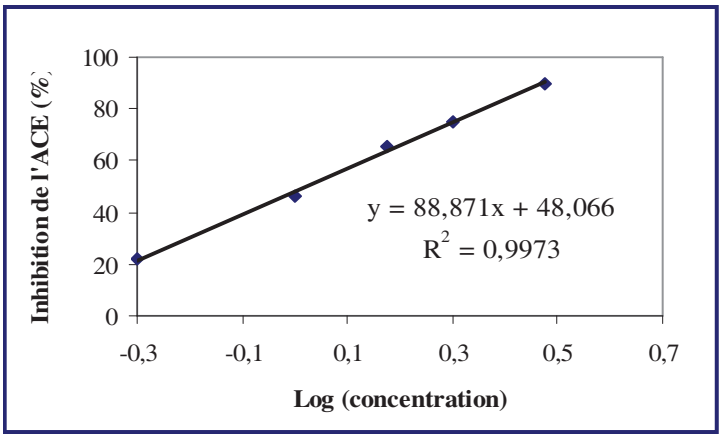


Figure 43 : Régression linéaire du pourcentage d'inhibition de l'ECA en fonction de la concentration peptidique

Comme la montre la figure 43, il suffit de faire varier la concentration et de déterminer les activités d'inhibition correspondantes puis reporter le pourcentage d'inhibition en fonction du logarithme décimale des concentrations utilisées pour avoir la linéarité ou encore la proportionnalité entre la concentration et l'activité antihypertensive. Finalement il suffit de déduire d'après la courbe celle en log qui correspond à 50% d'inhibition puis déterminer la concentration exacte (10^x).

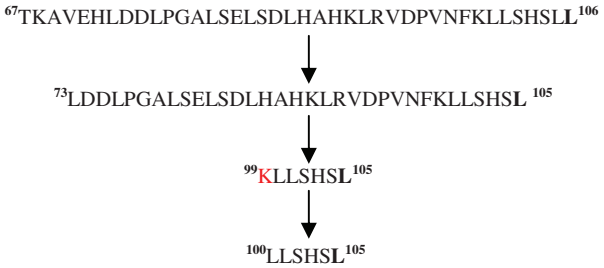
III- Activité antihypertensive de la famille alpha 67-106

L'activité antihypertensive a été déterminée par mesure du pourcentage d'inhibition de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine. Une gamme de concentration a été préparée afin de déterminer la CI_{50} des différents peptides. Des solutions de 2 ; 1,5 ; 1 ; 0,75 ; 0,5 ; 0,40 ; 0,30 et 0,25 mg/ml ont donc été préparées selon le peptide. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 21.

Tableau 21 : CI_{50} des peptides purs

Peptides	Masses (Da) [M + H]+	CI_{50}^a (mg/ml)	CI_{50}^a (µM)
α 67-106	4430,1	1,62±0,07	366 ± 16,10
α 73-105	3651,1	1,89±0,13	518,29 ± 37,3
α 99-105	797	0,033±0,003	42,51 ± 3,96
α 100-105	**668**	**0,73±0,04**	**1095,5 ± 65,5**

Tous les quatre peptides testés entraînent une inhibition de l'activité de l'ECA. Le pourcentage d'inhibition calculé, pour une concentration de 0,75 mg/ ml est d'environs 20% pour les peptides α 67-106 et α 73-105, d'environ 50% pour le peptide α 100-105 et dépasse les 100% dans le cas du peptide α 99-105. Ce pourcentage rendant compte de l'activité antihypertensive (plus le pourcentage d'inhibition est important plus l'activité antihypertensive l'est aussi), ces peptides et particulièrement le peptide α 99-105 possèdent donc un potentiel antihypertensif très important. La détermination de la CI_{50} permet de quantifier donc ce potentiel. Comme le montre l'analyse des séquences peptidiques, seule la présence d'un résidu lysine diffère le peptide α 99-105 et α 100-105.



Bien que l'activité antihypertensive soit améliorée par la diminution de la taille du peptide, l'inhibition de l'ECA du peptide α 99-105 est 1000 fois plus importante que celle du peptide α 100-105. La présence de cette lysine en position N-terminale serait donc à l'origine de cette augmentation de l'activité.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans ces travaux, nous avons réalisé une hydrolyse contrôlée de l'hémoglobine bovine par la pepsine permettant d'obtenir un hydrolysat moins complexe riche uniquement de peptides antimicrobiens. Concernant les caractéristiques de peptides antimicrobiens, notre attention s'est portée principalement sur l'obtention de peptides intermédiaires, de taille moyenne, hydrophobes et de charge globale positive à pH neutre, compte tenu de leur diversité d'applications. La mise en place d'un nouveau système enzymatique incluant la présence d'alcools, c'est-à-dire, l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine en milieu hydroalcoolique, a permis d'obtenir cet hydrolysat enrichi en peptides actifs.

Afin de mieux évaluer l'effet des alcools sur l'hydrolyse et la structure de l'hémoglobine, nous avons travaillé à un pH n'entraînant aucune variation structurale sur le substrat. Le pH d'hydrolyse a donc été un pH de 5,5 car comme l'on montré les analyses structurales, c'est seulement à ce pH que la protéine garde la conformation la plus proche de l'état natif. De plus, comme l'a confirmé cette présente étude, à ce pH, l'enzyme demeure active.

L'hydrolyse réalisée à ce pH en milieu aqueux a montré qu'à l'état natif, l'hydrolyse de l'hémoglobine suivait un mécanisme de type « one by one », aboutissant à la production de peptides finaux de petites tailles tandis qu'en présence d'agent dénaturant tel que l'urée, un hydrolysat très complexe contenant des peptides de caractéristiques variables suivant un mécanisme de type « zipper » a été obtenu. Ces deux états structuraux (état natif où toutes les structures protéiques secondaires, tertiaires et quaternaires sont conservées et état dénaturé où toutes ces structures protéiques sont altérées) ont représenté pour nous les limites structurales inférieures et supérieures aboutissant à des mécanismes d'hydrolyse « extrêmes ».

L'hydrolyse en milieux aqueux a ensuite été remplacée par l'hydrolyse en milieu hydroalcoolique afin d'obtenir un hydrolysat différent de celui obtenu en milieu aqueux. Nous avons donc défini un état structural intermédiaire protéique pouvant nous permettre de réaliser une hydrolyse se trouvant entre le mécanisme de type « one by one » et le mécanisme de type « zipper ». Cet état structural se définit comme un état où toutes les structures secondaires sont conservées et en même temps les structures tertiaires et quaternaires sont modifiées.

Les solvants utilisés pour réaliser cette hydrolyse ont été des solvants dits « structurants » parce qu'ils sont utilisés dans la littérature comme agents permettant d'induire ou de conserver les structures secondaires des polypeptides et protéines.

L'utilisation de 10% de TFE a permis d'obtenir cet hydrolysat moins complexe riche en peptides intermédiaires hydrophobes mais à concentration faible.

La réalisation de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine en présence de 40% de méthanol, 30% d'éthanol, 20% de propanol ou de 10% de butanol a permis d'améliorer les concentrations peptidiques avec une nette amélioration lors de l'utilisation de 10% de butanol.

La présence de ces alcools a permis de modifier les structures tertiaires et quaternaires de l'hémoglobine en des structures se trouvant entre l'état natif et l'état dénaturé, tout en gardant intactes les structures secondaires. Ce fût grâce à cet état structural, qu'une hydrolyse contrôlée a pu être réalisée. A cet effet, ***la réalisation d'une modélisation bioinformatique permettant de visualiser ces modifications structurales pourrait être envisagée afin de mieux maîtriser ce modèle enzymatique***.

La présence de ces alcools primaires a aussi permis de rendre plus spécifique l'activité de l'enzyme par une augmentation de l'hydrolyse préférentiellement en position C-terminale des leucines et de rendre plus stables les peptides intermédiaires produits au cours de l'hydrolyse.

Elle a aussi permis de rendre accessible le cœur hydrophobe de l'hémoglobine permettant ainsi d'obtenir une nouvelle famille peptidique jamais décrite jusqu'alors, il s'agit de la famille α 67-106, famille issue de la chaîne alpha de l'hémoglobine.

Ces alcools ont permis d'obtenir un hydrolysat moins complexe, permettant d'obtenir seulement 12 fractions après l'analyse par RP-CLHP, contenant en tout 29 peptides. Parmi ces peptides identifiés, seulement deux peptides n'ont montré aucune activité antimicrobienne. Tout les autres peptides ont quant à eux, présenté une activité antimicrobienne conséquente (CMI de 1-180 µM) vis-à-vis de souches bactériennes gram- ou gram +. ***Les activités hémolytiques de ces peptides resteront à déterminer afin de vérifier la toxicité de ces peptides actifs .Il faudra également étudier les mécanismes d'action de ces peptides antimicrobiens et la relation structure fonction.***

La famille α 67-106 en plus de l'activité antimicrobienne, a présenté aussi une activité antihypertensive potentielle par sa capacité d'inhibition de l'ECA, avec des IC_{50} variant en fonction de la taille du peptide. L'analyse structurale de ces peptides a permis de mettre en évidence l'importance de la présence du résidu lysine en position N-terminale permettant d'accroître par un facteur 1000 cette activité.

L'évaluation de cette activité à des degrés d'hydrolyse plus importants, pourrait permettre d'identifier et d'isoler de nouveaux peptides antihypertensifs avec de IC_{50} encore plus faibles. La stabilité des peptides vis-à-vis d'autres protéases ainsi que l'effet d'inhibiteurs vis-à-vis de ces peptides seront à envisager.

L'analyse de cette autre activité permet de mettre en évidence le potentiel étendu de ces peptides obtenus en milieu hydroalcoolique, comme agents pouvant intervenir dans divers domaines. ***Compte tenu de la structure de ces peptides, la recherche de nouvelles activités biologiques pourrait donc être envisagée.***

Des procédés de production de ces peptides pourraient être développés afin d'obtenir en quantité importante dans le cadre d'applications alimentaires ou pharmaceutiques. De plus ce système enzymatique utilisant des alcools plus conventionnels permet de réduire les coûts de production car la présence d'alcool limite le temps de séchage des hydrolysats.

On pourra également envisager une hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine en remplaçant les solvants par l'effet de la température, du pH ou de concentrations ioniques, des sels…

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

A

Alpert B., Lopez-Delgado R. Fluorescence lifetimes of haem proteins excited into the tryptophan absorption band with synchrotron radiation. *Nature*. 1976. 263, p 445-446.

Antonini, E., Brunori, M. Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions With Ligands. *North-Holland Publishing Company, Amsterdam*. 1971. 21, p 20-52.

Arai M, Kuwajima K. Rapid formation of a molten globule intermediate in refolding of alpha-lactalbumin. *Fold Des*. 1996. 1(4), p 275-287.

Artmann G. M., Burns L., Can*ECA*s J. M., Temiz A, Schmid- Schonbein G. W., Chien S., Maggakis-Kelemen C. Circular dichroism spectra of human hemoglobin reveal a reversible structural transition at body temperature. *Eur Biophys J*. 2004. 33, p 490–496.

B

Baillet J., Demarez JP., Nortier E. De retour de Babel: Une histoire biophysique de l'humanité. 2003. p 108.

Barkhudaryan N., Kellermann J., Galoyan A., Lottspeich F. High molecular weight aspartic endopeptidase generates a coronaro-constrictory peptide from the beta-chain of hemoglobin. *FEBS Lett*. 1993. 329(1-2), p 215-218.

BARET ROUVIERE H. Les antibiotiques peptidiques d'origine animale. Ecole Nationale Veterinaire De Lyon. 2007. Thèse n° 007. p 49.

Barkhudaryan N., Oberthuer W., Lottspeich F., Galoyan A. A. structure of hypothalamic coronaro-constrictory peptide factor. *Neurochem. Res*. 1992. 17, p 1217-1221.

Beevers G., Lip G.Y.H., O'brien E. ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension. *Brit. Med. J*. 2001. 322, p 912-916.

Bello J., Bello H. R., Granados E. Conformation and aggregation of melittin: dependence on pH and concentration. *Biochemistry.* 1982. 21, p 461–465.

Bhakuni V. Alcohol-induced molten globule intermediates of proteins: are they real folding intermediates or off pathway products? *Arch Biochem Biophys*. 1998. 357(2), p 274-284.

Bianchi E., Rampone R., Tealdi A., Ciferri A. The Role of Aliphatic Alcohols on the Stability of Collagen and Tropocollagen. *The Journal of Biological Chemistry*. 1970. 245(13), p 3341-3345.

Biziulevicius G. A., Kislukhina O. V., Kazlauskaite J., Zukaite V. Food-protein enzymatic hydrolysates possess both antimicrobial and immunostimulatory activities: a cause and effect theory of bifunctionality. *FEMS immunol medical microbiol*. 2006. 46, p 131-138.

Boffi A., Wittenberg J. B., Chiancone E. Circular dichroism spectroscopy of Lucina I hemoglobin. *FEBS Lett*. 1997. 411(2-3), p 335-338.

Bonow R. O., Smaha L. A., Smith S. C., Mensah G. A., Lenfant C. The international burden of cardiovascular disease: responding to the emerging global epidemic. *Cir*. 2002. 106, p 1602-1605.

Bouhallab S., Favrot C., Maubois J. L. Growth-promoting activity of tryptic digest of caseinomacropeptide for L. lactis subsp. *Lait*. 1993. 73, p 73-77.

Brahms S., Brahms J. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism.. 1980. *J. Mol. Biol*. 138, p 149-178.

Brantl V., Gramsch C., Lottspeich F., Mertz R., Jaeger K. H., Herz A. Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins. *Eur J Pharmacol*. 1986. 125(2), p 309-310.

Breukink E. de Kruijff B. The lantibiotic nisin, a special case or not? *Biochim Biophys Acta* 1999. 1462, p 223-234.

Brian B. L., Konermann L. Folding and assembly of haemoglobin monitored by electrospray Mass spectrometry using an on-line dialysis system. *J. Am Soc. Mass Spectrom.* 2007. 18, p 8-16.

Brian L. B., Mark C., Konermann. K. L. Symmetric behavior of hemoglobin α- and β-subunits during acid-induced dénaturation observed by electrospray mass spectrometry. *Biochemistry.* 2007**.** *46,* p 10675-10684.

Brotz H., Bierbaum G., Leopold K., Reynolds P. E., Sahl H. G. The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998. 42, p 154-160.

Buchet R., Iona I., Martorosi A.. Correlation of structure and function in the Ca2+-ATPase of sarcoplasmic reticulum: a Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) study on the effects of dimethyl sulfoxide and urea. *Biochemica and Biophysica Acta.* 1989. 983, p 167-178.

Buck M. TriXuoroéthanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. *Q. Rev. Biophys*. 1998. 31, 297–355.

Buck M., Radford S. E., Dobson C. M. A partially folded state of hen egg white lysozyme in trifluoroéthanol: structural characterization and implications for protein folding. *Biochemistry*. 1993. 32(2), p 669-678.

Buck M., Schwalbe H., Dobson C.M., Characterization of conformational preferences in a partly folded protein by heteronuclear NMR spectroscopy: assignment and secondary structure analysis of hen eggwhite lysozyme in triXuoroéthanol. *Biochemistry*. 1995. 34, p 13219–13232.

C

Cellmer T., Douma R., Huebner A., Prausnitz J., Blanch H. Kinetic studies of protein L aggregation and disaggregation. *Biophys Chem*. 2007. 125(2-3), p 350-359.

Cempel N., Aubry JM., Piot JM., Guillochon D. Isolation from bovine haemoglobin of a peptide that might be used as a potential hydrophobic photosensitizer carrier. Biotechnol Appl Biochem. 1995. 3, p 287-294.

Chang R. C. C., Huang W.Y., Redding T. W., Arimura A., Coy D. H., Schally A. V. Isolation and structure of several peptides from porcin hypothalami. *Biochem. Biophys. Acta.* 1980. 625, p 266–273.

Cheung H. S., Wang F. L., Ondetti M. A.; Sabo E. F., Cushman D. W. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensinconverting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J. Biol. Chem*. 1980. 255, p 401–407.

Choisnard L., Froidevaux R., Nedjar-Arroume N., Lignot B., Vercaigne-Marko D., Krier F., Dhulster P., Guillochon D. Kinetic study of the appearance of an anti-bacterial peptide in the course of bovine haemoglobin peptic hydrolysis. *Biotechnol Appl Biochem*. 2002. 36(3), p 187-194.

Church F. C., Swaisgood H. E., Porter D. H., Catignani G. L. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J Dairy Sci*. 1983. 66, p 1219-1227.

Conio G., Patrone E., Brighetti S.. The effect of aliphatic alcohols on the helix-coil Transition of Poly-L- ornithine and poly-L-glutamic acid. *The Journal of Biological Chemistry*. 1970. 245(13), p 3335-3340.

Crespin M. O., Boys B. L., Konermann L. The reconstitution of unfolded myoglobin with henin dicyanide is not accelerated by fly casting. *FEBS Lett*. 2005. 579, p 271-274.

Crosby W. H., Munn J. I., Furth F. W. Standardizing a method for clinical hemoglobinometry. *U S Armed Forces Med J*. 1954. 5(5), p 693-703.

Cui H., Webber M. J., Stupp S. I. Self-assembly of peptide amphiphiles: From molecules to nanostructures to biomaterials. 2010. 94(1), p 1-18.

Curtis J. W. Jr. Secondary structure of proteins through circular dichroïsme spectroscopy. *Ann. Rev. Biophys. Chem*. 1988. 17, p 145-166.

D

Dalgalarrondo M., Dufour E., Chober JM., Bertrand-Harb C. , Haertlk. **T.** Proteolysis of P-Lactoglobulin and p-Casein by Pepsin in Éthanolic Media. *Int. Duiry Journal*. 1993. 5, p 1-14.

Daoud R., Dubois V., Bors-Dodita L., Nedjar-Arroume N., Krier F., Chihib NE, Mary P., Kouach M., Briand G., Guillochon D. New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin. *Peptides*. 2005. 26(5), p 713-719.

Dathe M., Wieprecht T., Nikolenko H., Handel L., Maloy W. L., MacDonald D. L., Beyermann M., Bienert M. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Lett*. 1997. 403, p 208-212.

Dathe M., Nikolenko H., Meyer J., Beyermann M., Bienert M. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett.* 2001. 501, p 146-150.

Dathe M., Wieprecht T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim Biophys Acta*. 1999. 1462, p 71–87.

Decaffmeyer M., Thomas A., Brasseur R., «Les médicaments peptidiques : mythe ou réalité ?». *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2008. 12(1), p 81-88.

De Laureto P. P., Frare E., Gottardo R., van Dael H., Fontana A. Spectroscopy and limited proteolysis superfamily: A comparative study by circular dichroism Partly folded states of members of the lysozyme/lactalbumin. *Protein Sci*. 2002. 11, 2932-2946.

Del Castillo M. D., Ferrigno A., Acampa I., Borrelli R. C., Olano A., Martinez-Rodriguez A., Fogliano V. In vitro release of angiotensin-converting enzyme inhibitors, peroxyl radical scavengers and antibacterial compounds by enzymatic hydrolysis of glycated gluten. *J Cereal Sci.,* 2007. 45, p 327-334.

De Swati, Girigoswami A. A fluorimetric and circular dichroism study of hemoglobin--effect of pH and anionic amphiphiles. *J Colloid Inter*face *Sci*. 2006. 296 (1), p 324-331.

Dev S.B., Rha C. K., Walder F. Secondary structural changes in globular protein induced by a surfactant: Fourier self-deconvolution of FT-IR spectra. *J Biomol Struct Dyn*. 1984. (2), p 431-442.

Dixon, M., Webb E. C. Enzymes: a classic work on enzyme kinetics and properties of enzyme. *Academic Press, New York.* 1979. 3rd Ed, p 262.

Dobo A., Kaltashov I. A. Detection of multiple protein conformational ensembles in solution via deconvolution of chargestate distributions in ESI MS. *Anal. Chem*. 2000. 173, p 4763-4773.

Drabkin D. L. The standardization of hemoglobin measurement. *Am J Med Sci*. 1948. 215(1), p 110.

Dubois V., Nedjar-Arroume N., guillochon D.. The influence of pH on the appearence of active peptides in the course of peptic hydrolysis of Bovine hemoglobin. *Prep Biochem Biotechnol.* 2005. 35(2), p 85-102.

Duclohier H. Bilayer lipid composition modulates the activity of dermaseptins, polycationic antimicrobial peptides. *Eur Biophys J*. 2006. DOI 10.1007/s00249-006-0047-9

Dunn B. M.. Structure and Mechanism of the Pepsin-Like Family of Aspartic Peptidases. *Chem. Rev*. 2002. 102, p 4431-4458.

Dunn, B.M., Fink, A.L. Cryoenzymology of porcine pepsin. *Biochemistry*. 1984. 23, 5p 241-5247.

E

Eduardo D. P., De Robertis E. M. F., De Robertis A. L., Delisle C. Biologie cellulaire et moléculaire. 1983. Edition Maloine S. A. p 87-88.

Eliezer D., Chiba K., Tsuruta H., Doniach S., Hodgson K.O., Kihara H. Evidence of an associative intermediate on the myoglobin refolding pathway. *Biophysical Journal*. 1993. 65(2), p 912-917.

Eisenberg D. Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. *Annu Rev Biochem*. 1984. 53, p 595–623.

F

Fales-Williams A. J., Gallup J. M., Ramirezromero R., Brogden K. A., Ackerman M. R. Increased anionic peptide distribution and intensity during progression and resolution of bacterial pneumonia. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*. 2002. 9(1), p 28-32.

Forssmann WG., Kirchhoff F., Munch J., S. L. Peptides for the Treatment of Herpes Virus Infections. 2008. Brevet, N° 20080312144.

Froidevaux R., Krier F., Nedjar-Arroume N., Vercaigne-Marko D., Kosciarz E., Briand G., Guillochon D. Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. *FEBS Lett*. 2001. 491, p159-163.

G

Ganong W., Jobin M. Physiologie Medicale.. 2005. 2e edition. P 503.

Garrett R. H., Grisham C. M., Lubochinsky B. Biochimie. 2000. 2e edition 1254, p 525-526.

Gersonde K., Wollmer A. ESR and CD spectra of the pH-dependent conformation isomers of hemoglobin (3).*Eur J Biochem*. 1970. 15(2), p 226-236.

Giangiacomo L., D'Avino, R., di Prisco G., and Chiancone, E. Monomer-dimer equilibrium and oxygen binding properties of ferrous Vitreoscilla hemoglobin. *Biochemistry* .2001. 40, p 3062–3068.

Gildberg A., Brgwald J., Johansen A., Stenberg E. Isolation of acid peptide fractions from a fish protein hydrolysate with strong stimulatory effect on atlantic salmon (Salmo salar) head kidney leucocytes. *Comp. Biochem. Physiol*. 1996. 114, 97-101.

Glämsta E. L., Marklund A., Hellman U., Wernstedt C., Terenius L., Nyberg F. Isolation and characterization of a hemoglobin-derived opioid peptide from the human pituitary gland. *Regul Pept*. 1991.34(3), p 169-179.

Gobbetti M.; Ferranti P.; Smacchi E.; Goffredi F.; Addeo F. Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus SS1 and Lactococcus lactis subsp. cremoris FT4. *Appl. Environ. Microbiol*. 2000. 9, p 3898–3904.

González-Jiménez J., Cortijo M. Urea-induced dénaturation of human serum albumin labeled with acrylodan. *J Protein Chem*. 2002. 21(2), p 75-79.

Goodman M., Felix A. M. Conformational Aspects Of Polypeptide Structure. 13. A Nonionic Helical Polypeptide In Aqueous Solution. *Biochemistry*. 1964. 3, p 1529-1534.

Goodman M., Felix A. M., Deber C. M., Brause A. R. Side Chain Effects On Polypeptide Hélices. The Nitroaromatic Effect. *biopolym symp*. 1964.13, p 409-420

Goodman M. Schmitt E. E..Conformational Aspects Of Low Molecular Weight Peptides. *ann n y acad sci*. 1960. 88, p 669-675.

Gordon Y.J., Romanowski E. G., McDermott A. M. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr. Eye Res*., 2005. 30(7), p 505-515. Review.

Goto Y., Hamaguchi K. Unfolding and refolding of the reduced constant fragment of the immunoglobulin light chain. Kinetic role of the intrachain disulfide bond. *J Mol Biol*. 1982. 156(4), 911-926.

Gregory R. B.. Protein-solvent interactions. 1995. P 520-528.

Greenfield N. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *J.Analytical Biochemistry***.** 1996. 235, p 1–10.

Griffith W. P., Kaltashov I. A. Highly asymmetric interactions between globin chains during hemoglobin assembly revealed by electrospray ionization mass spectrometry. *Biochemistry*. 2003. 42(33), p 10024-10033.

Griffiths A. J. F. , Suzuki D. T. , Sanlaville C. Introduction à l'analyse génétique . 2002. 860 pages, p. 274

H

Hancock, R. E. Peptide antibiotics. *Lancet*. 1997. 349, p 418–422.

Hancock, R. E. W.. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect. Dis*. 2001. 1, p 156–164.

Hancock R. E. W., Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*. 2006. 24, p 1551-1557.

Hirsch R. E.,. Front-face fluorescence spectroscopy of hemoglobins. *Methods Enzymol Review*. 1994. 232, p 231-246.

Hirsch R. E. Hemoglobin fluorescence *Methods Mol Med*. 2003. 82, p 133-154.

Hirsch R. E., Zukin R. S., Nagel R. L. intrinsic fluorescence emission of intact oxy hemoglobins. *Biochem. Biophys.* Res. Commun. 1980. 93, p 432.

Hirsch R. E., Nagel R. L. Conformational studies of hemoglobins using intrinsic fluorescence measurements. *J. biol Chem*. 1981. 256, p 1080-1083.

Hirsch R. E., Noble R. W. Intrinsic fluorescence of carp hemoglobin: a study of the R----T transition. *Biochim Biophys Acta*. 1987. 914(3), p 213-219.

Howard M. J., Smales C. M.. NMR analysis of synthetic human serum albumin alpha-helix 28 identiWes structural distortion upon amadori modiWcation. *J. Biol. Chem*. 2005. 280, p 22582–22589.

Hsu M. C. Woody, R. W. The origin of the heme Cotton effects in myoglobin and hemoglobin. *J. Am. Chem. Soc*. 1971. 93, p 3515–3525.

Hu T., Li,D., Manjula,B. N., Brenowitz, M., Prabhakaran M. et Acharya S. A. PEGylation of Val-1(R) Destabilizes the Tetrameric Structure of Hemoglobin. *Biochemistry*. 2009. 48, p 608–616.

Hummel G., Reineke U., Reimer U. Translating peptides into small molecules. *Mol. Biosyst*. 2006. 2, p 499-508.

Hunkapiller M. W., Richards J. H. Studies on the catalytic mechanism of pepsin using a new synthetic substrate. *Biochemistry*. 1972. 11, p 2829-2839.

I

Invernizzi G., Grandori R. Detection of the equilibrium folding intermediate of β-lactoglobulin in the presence of trifluoroéthanol by mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*; 2007. 21, p 1049–1052.

Ivanov V.T., Karelin A. A., Karelina E. V., UI'yashin V. V., Vaskovsky B. V., Mikhaleva I. I., Nazimov I. V., Grishina G. A., Khavinson V. K., Morossov V. G., Mikhatsov A. N.

peptides, chemistry and biology: total screening of bovine brain and bone marrow extracts for actives peptides. *Proccedings of twelfth American peptide Symposium, J. A. Smith and J. E. rivier (Eds), ESCOM, Leiden*. 1992. p 939-941.

Ivanov V. T., Karelin A. A., Philippova M. M., Nazimov I. V., Pletnev V. Z. Hemoglobin as a source of endogenous bioactive peptides: the concept of tissue-specific peptide pool,. *John Wiley & Sons, Inc. Biopoly*. 1997. 43, p 171–188.

Iyer K. S., Acharya A. S. Conformational studies of a-globin in 1-propanol: Propensity of the alcohol to limit the sites of proteolytic cleavage (semisynthesis/a-helical conformation/protein structure/organic cosolvents/segmental flexibility). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Biochemistry.* 1987. 84, p 7014-7018.

J

Jackson M., Mantsch H. H. Beware of proteins in DMSO. *Biochemica and Biophysica Acta.* 1991. 1078, p 231-235.

Jacobson A. L., Krueger P. J. Infrared spectroscopic studies of solvent-induced conformational changes in globular proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1975. 393(2), p 274-283.

Jansson H., Bergman R., Swenson J.,. Relation between solvent and protein Dynamics as Studied by dielectric spectroscopy. *J. Phys. Chem. Biol*. 2005. 109, p 241434-24141.

Jansson H., Swenson J. Dynamical changes of hemoglobin and its surrounding water during thermal dénaturation as studied by quasielastic neutron scattering and temperature modulated differential scanning calorimetry. *J Chem Phys*. 2008. 128(24), p 245104.

Jin Y., Hammer J., Pate M., Zhang Y., Zhu F., Zmuda E., Blazyk J. Antimicrobial Activities and Structures of Two Linear Cationic Peptide Families with Various Amphipathic β-Sheet and α-Helical Potentials. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 2005. P 4957-4964.

Johnson LN. The structure and function of lysozyme. *Sci Prog*. 1966. 54(215), p 367-385.

K

Kagawa K., Matsutaka H., Fukuhama C., Fujino H., Okuda H. Suppressive effect of globin digest on postprandial hyperlipidemia in male volunteers. *J Nutr*. 1998. 128(1), p 56-60.

Kagawa K., Matsutaka H., Fukuhama C., Watanabe Y., Fujino H. Globin digest, acidic protease hydrolysate, inhibits dietary hypertriglyceridemia and Val-Val-Tyr-Pro, one of its constituents, possesses most superior effect. 1996. 58(20), p 1745-155.

Kebreab A., Ghebremichael, K. R., Gunaratna, H. H., Harry Brumer, G. D. A simple purification and activity assay of the coagulant protein from Moringa oleifera seed. *Water Res.* 2005. 39, p 2338-2344.

Kelly S. M.., Jess T. J., Price N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica Biophysica Acta.* 2005. 1751, p 119-139.

Kendrew J. C. Architecture of a protein molecule. *Nature*. 1958. 182(4638), p 764-767.

Kendrew J. C. Structure and function in myoglobin and other proteins. *Fed Proc*. 1959. 18(2, Part 1), p 740-751.

Kendrew J. C. The structure of globular proteins. *Comp Biochem Physiol*. 1962. 4, p 249-252.

Kendrew J. C. Myoglobin and the structure of proteins. *Science*. 1963. 139(29), p 1259-1266.

Kendrew J. C., Dickerson R.E., Strandberg B. E., Hart RG, Davies D. R., Phillips D. C., Shore V. C. Structure of myoglobin: A three-dimensional Fourier synthesis at 2 A. resolution. *Nature*. 1960. 185, p 422-427.

Kentsis A., Sosnick T. R.. Trifluoroéthanol Promotes Helix Formation by Destabilizing Backbone Exposure: Desolvation Rather than Native Hydrogen Bonding Defines the Kinetic Pathway of Dimeric Coiled Coil Folding. *Biochemistry*. 1998. 37, p 14613-14622.

Kientz M. L., Bigelow C. C. The effect of ethylene glycol on the structure of beta-lactoglobulin. *Biochemistry*. 1966. 5(11), p 3494-3500.

Kohama Y., Matsumoto S., Oka H., Teramoto T., Okabe M., Mimura T. Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Biochem. Biophys Res Commun*. 1988. 155, p 332-337.

Konermann L. A minimalist model for exploring conformational effects on the electrospray charge state distribution of proteins, *J. Phys. Chem. B*. 2007. 111, p 6534-6543.

Konermann L., Douglas D. J. Unfolding of proteins monitored by electrospray ionization mass spectrometry: a comparison of positive and negative ion modes. *J Am Soc Mass Spectrom*. 1998. 9(12), p 1248-1254.

Kong X. Z., Zhou H. M., Hua Y. F., Qian H. F. Preparation of wheat gluten hydrolysates with high opioid activity. *Eur Food Res Technol*. 2008. 227, p 511–517.

Kotzamanis Y. P., Gisbert E ., Gatesoupe F. J., Infante J . Z., Cahu C. Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to Vibrio anguillarum in European sea bass (Dicentrarchus labrax) larvae. *Comp. Biochem. Physiol*. 2007. 147, p 205-214.

Kragl U., Eckstein M., Kaftzik N.Enzyme catalysis in ionic liquids. *Curr Opin Biotechnol.* 2002. 13(6), p 565-571.

Kumar Y., Muzammil S., Tayyab S. Influence of fluoro, chloro and alkyl alcohols on the folding pathway of human serum albumin. *J. Biochem.* (Tokyo). 2005. 138, p 335–341.

Kuwajima K, Nitta K, Sugai S. Intramolecular perturbation of tryptophans induced by the protonation of ionizable groups in goat alpha-lactalbumin. *Biochim Biophys Acta*. 1980. 623(2), p 389-401.

L

Lantz I., Glämsta E. L., Talbäck L., Nyberg F. Hemorphins derived from hemoglobin have an inhibitory action on angiotensin converting enzyme activity**.** *FEBS Lett.*. 1991. 287(1-2), p 39-41.

Laurel M., Pegram M., Record T. Jr. Thermodynamic Origin of Hofmeister Ion Effects. *J. Phys. Chem.* B. 2008. 112, p 9428–9436.

Lebrun F., Bazus A., Dhulster P., Guillochon D. Solubility of heme in heme-iron enriched bovine haemoglobin hydrolysates. *J. Agric. Food Chem*. 1998. 46, p 5017-5025.

Lehninger, A. L. Principles of Biochemistry. 2000. 3ème Edition.

Liepke C., Baxmann S., Heine C., Breithaupt N., Ständker L., Forssmann WG. Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity: a class of host defense peptides. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003. 791(1-2), p 345-356.

Liepke C., Zucht H. D., Forssmann W. G., Ständker L. Purification of novel peptide antibiotics from human milk. *J Chromatography B.* 2001. 752, p 369-377.

Linderstrom-Lang K. The initial phases of the enzymatic degradation of proteins. *Bull Soc Chim Biol* (Paris). 1953. 35(1-2), p 100-116.

Lignot B. Effet de solvant sur la sélectivité de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine et sur l'obtention de peptides de peptides à activités biologiques. *Thèse de doctorat.* Université de Compiègne, France.

Lignot B, Froidevaux R, Nedjar-Arroume N, Guillochon D. Solvent effect on kinetics of appearance of neokyotorphin VVh4 and a bradykinin-potentiating peptide in the course of peptic hydrolysis of bovine haemoglobin *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1999. 30, p 201-207.

Liu C., Bo A., Cheng, G., Lin X., Dong S., characterization of the structural and functional changes of hemoglobin in dimethyl sulfoxide by spectroscopic techniques. *Biochemica and Biophysica Acta.* 1998. 1385, p 53-60.

Liu H. L., Hsu C. M., the effects of solvent and temperature on the structural integrity of monomeric melittin by molecular dynamics simulations; *Chemicals Physics Letters*.2003. 375, p 119-125.

Liu Y., **Bolen D. W**. The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally occurring osmolytes. *Biochemistry.* 1995. 34(39), p 12884-12891.

Liu Z., Zeng M., Dong S., Xu J., Song H., Zhao H. Effect of an antifungal peptide from oyster enzymatic hydrolysates for control of gray mold (Botrytis cinerea) on harvested strawberries. Posthavest Biol Technol. 2007. 46, p 95–98.

Loffet A., Peptides as drugs: is there a market? J. Peptide Sci. 2002. 8(1), p 1-7.

Lopez C. F., Nielsen S. O., Srinivas G., Degrado W. F., Klein M. L. Probing membrane insertion activity of antimicrobial polymers via coarse grain molecular dynamics. J. Chem Theory Comput. 2006. 2, p 649-655.

Lu Z., Zhang Y., Liu H., Yuan J., Zheng Z., Zou G. Transport of a cancer chemopreventive polyphenol, resveratrol: interaction with serum albumin and hemoglobin. *J Fluoresc*. 2007. 17(5), p 580-587.

M

Main E. R., Jackson S. E. Does trifluoroéthanol affect folding pathways and can it be used as a probe of structure in transition states? *Nat Struct Biol.* 1999. 6(9), p 831-835.

Markham C., Manglik A., Castillo K., Mao K., Frey R. Hemoglobin and the Heme Group: Metal Complexes in the Blood for Oxygen Transport Inorganic Synthesis Experiment. 2007. http://www.chemistry.wustl.edu/~courses/genchem/Tutorials/Hemoglobin/151_T3_hemoglobin.htm.

Marr A. K., Gooderham W. J., Hancock R. E. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr. Opin. Pharmacol.,* 2006. 6(5), p 468- 472.

Marshall S. H., Arenas G. Antimicrobial peptides: a natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2003. 6(3), p 1-14.

Maubois J.L., Leonil J., Trouve R., Bouhallab S. Les peptides du lait à activité physiologique III. Peptides du lait à effet cardiovasculaire : activité antithrombotique et antihypertensive. *Lait*. 1991. 71, p 249-255.

Maruyama S., Suzuki H. A peptide inhibitor of angiotensin 1 converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agrie. Biol. Chem*. 1982. 46, p 1393-1394.

Matsuzaki, K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta.* 1999. 1462(1-2), p 1-10.

Melki G. Apport du dichroïsme à la connaissance des modifications structurales de l'hémoglobine en solution au cour de la fixation de l'oxygène. *Journal de Physique*. 1972. Tome 33, p 37-47.

Mercier A., Gauthier S.F., Fliss I. Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests. Int. Dairy J. 2004. 14, p 175-183.

Miranker A., Radford S. E., Karplus M., Dobson C. M. Demonstration by NMR of folding domains in lysozyme. *Nature*. 1991. 349(6310), 633-636.

Mito K., Fujii M., Kuwahara M., Matsumura N., Shimizu T., Sugano S., Karaki H. Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from hemoglobin. *Eur J Pharmacol*. 1996. 304(1-3), p 93-98.

N

Nagai M., Sugita Y., Yoneyama Y. Circular dichroism of hemoglobin and its subunits in the Soret region. *J Biol Chem*. 1969. 244(6), p 1651-1653.

Nagai M, Nagai Y, Aki Y, Imai K, Wada Y, Nagatomo S, Yamamoto Y. Effect of reversed heme orientation on circular dichroïsm and cooperative oxygen binding of human adult hemoglobin. *Biochemistry.* 2008. 47(2), p 517-525.

Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K., Okubo A., Yamazaki S., Takano T. Purification and characterization of angiotensin I-converting-enzyme inhibitors from Sour Milk. *J. Dairy Sci.* 1995. 78, p 777-783.

Nandi P. K., Robinson D. R. The effects of salts on the free energy of the peptide group. *J. Am. Chem. Soc.* 1972. 94, p 1299-1308.

Nedjar-Arroume N., Dubois-Delval V., Miloudi K., Daoud R., Krier F., Kouach M., Briand G. Isolation and Characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. *Peptides.* 2006. 27, p 2082-2089.

Nedjar-Arroume N., Dubois-Delval V., Adje Y. E., Traisnel J., Krier F., Mary P., Kouach M., Briand G., Guillochon D. Bovine hemoglobin: an attractive source of antibacterial. *Peptides.* 2008. 29 (6): p 969-977.

Nishi T., Hara H., Hira T., Tomita F. Dietary protein peptic hydrolysates stimulate cholecystokinin release via direct sensing by rat intestinal mucosal Cells. *Exp Biol Med.,* 2001. 226, p 1031-1036.

Nishimura K., Hazato T. Isolation and identification of an endogenous inhibitor of enkephalin-degrading enzymes from bovine spinal cord. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993. 194, p 713-719.

Nishimura C., Dyson J. H., and Peter E. Wright Enhanced picture of protein-folding intermediates using organic solvents in H/D exchange and quench-flow experiments

Nyberg F., Sanderson K., Glämsta E. L. The hemorphins: a new class of opioid peptides derived from the blood protein haemoglobin. *Inc. Biopoly*. 1997. 43, p 147–156.

Nobbs C. L., Watson H. C., Kendrew J. C. Structure of deoxymyoglobin: a crystallographic study. *Nature*. 1966. 209(5021), p 339-341.

O

Orts R. J., Liao T. H., Sartin J. L., Bruot B. Purification of a tripeptide with antireproductive properties isolated from pineal glands. *Physiologist.* 1978. 21, p 87.

P

Park P. J., Jung W. K. Nam K. S., Shahidi F., Kim S. K. Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. Journal of the American oil Chemists Society. 2001. 78, p 651-656.

Page C. L., Curtis M. J., Walker M. J., Sutter M. C., Hoffman B. B. Physiopathologie et maladies cardiovasculaires. *Pharmacologie intégrée. Bruxelles : De Boeck Université*. . 1999. p 153-196.

Perutz M. F. Relation between structure and sequence of haemoglobin. *Nature.* 1962. 194, p 914-917.

Estelle Y. ADJE

Perutz M. F., Bolton W., Diamond R., Muirhead H., Watson H. C.. Structure of haemoglobin. an x-ray examination of reduced horse haemoglobin. *Nature*. 1964. 203, p 687-690.

Perutz, M. F., Ladner, J. E., Simon, S. R., Ho, C. Influence of globin structure on the state of the heme. I. Human deoxyhemoglobin. *Biochemistry*. 1974. 13, 2163–2173.

Picot L., Bordenave S., Didelot S., Fruitier-Arnaudin I., Sannier F., Thorkelsson G., Bergé J.P., Guérard F., Chabeaud A., Piot J. M. Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. Process Biochem., 2006. 41, p 1217- 1222.

Piot J. M., Zhao Q. Y., Guillochon D., Ricart G., Thomas D. Isolation and characterisation of two opioid peptides from a bovine hemoglobin peptic hydrolysate. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 1992a. 189, p 101-110.

Piot J. M., Zhao Q. Y., Guillochon D., Ricart G. et Thomas D. Isolation and characterization of a bradykinin potentiating peptide from a bovine peptic hemoglobin hydrolysate. *FEBS Lett*. 1992b. 299, p 75-79.

Protasevich I., Ranjbar B., Lobachov V., Makarov A., Gilli R., Briand C., Lafitte D., Haiech J. Conformation and thermal dénaturation of apocalmodulin: role of electrostatic mutations. *Biochemistry*. 1997. 36(8), p 2017-2024.

Povey J. F., Smales C. M., Hassard S. J., Howard M. J. Comparison of the effects of 2,2,2-triXuoroéthanol on peptide and protein structure and function. *Journal of Structural Biology*. 2007. 157, p 329–338.

Q

Xu Qi Timothy A. Keiderling; Trifluoroéthanol-Induced Unfolding of Concanavalin A: Equilibrium and Time-Resolved Optical Spectroscopic Studies. *Biochemistry*, 2005. 44, p 7976-7987.

R

Radford S. E., Dobson C. M., Evans P. A. The folding of hen lysozyme involves partially structured intermediates and multiple pathways. *Nature.* 1992. 358(6384), p 302-307.

Ravallec-Plé R., Van Wormhoudt A. Secretagogue activities in cod (Gadus morhua) and shrimp (Penaeus aztecus) extracts and alcalase hydrolysates determined in AR4 2J pancreatic tumour cells. *Comp. Biochem. Physiol*. 2003. 134, p 669-679.

Reiersen H., Rees A. R. Trifluoroéthanol may form a solvent matrix for assisted hydrophobic interactions between peptide side chains. *Protein E*ng. 2000. 13(11), p 739-743.

Rezaei-Ghaleh N., Ebrahim-Habibi A., Moosavi-Movahedi A. A., Nemat-Gorgani M.. Effect of polyamines on the structure, thermal stability and 2, 2, 2-trifluoroéthanol-induced aggregation of α-chymotrypsin. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2007. 41, p 597–604.

Rezaei-Ghaleh N., Zweckstetter,M., Azadeh D. M., Ebrahim-Habibi, Gorgani M. N. Potential of a-Chymotrypsin in Different Conformational States. Biopolymers. 2008. 91(1), p 28-36.

Roccatano D., Colombo G., Fioroni M., and Mark A. E.. Mechanism by which 2,2,2-trifluoroéthanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: A molecular dynamics study. *PNAS Biophysics*. 2002. 99(19), p 12179–12184.

Ryle, A. P. Pepsins, gastricsins and their zymogens. *Methods Enzym. Anal*. 1984. 3e Edition, p 228-238.

S

Sánchez-Ruiz J. M., López-Lacomba J. L., Cortijo M., Mateo P. L. Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal dénaturation of thermolysin. *Biochemistry*. 1988. 27(5), p 1648-1652.

Santiago P. S., Neto D.de S., Gandini S. C., Tabak M. On the localization of water-soluble porphyrins in micellar systems evaluated by static and time-resolved frequency-domain fluorescence techniques. *Colloids Surf B Biointer*faces. 2008. 65(2), p 247-256.

Satoh M., Kawajiri S., Yamamoto M., Akaike A., Ukai Y., Takagi H. Effects of tyrosyl-arginine (kyotorphin), a new opioid dipeptide, on single neurons in the spinal dorsal horn of rabbits and the nucleus reticularis paragigantocellularis of rats. *Neurosci Lett*. 1980. 16(3), p 319-322.

Sattar M. A., Paul D. K., Arafat S. M. Y., Khan M. Z. H., Mia M. C. Antibacterial Activity of Méthanol Extract of Boal Fish (Wallago attu). *CMU. Journal*. 2006. 5, p 323-331.

Schechter I., Berger:A. On the active site of proteases. 3. Mapping the active site of papain; specific peptide inhibitors of papain. *Biochem Biophys Res Commun,* 1968. 32, p 898-902.

Schechter I., Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun,* 1967. 27, p 157-162.

Schroeder,W. A., Shelton,J. R., Shelton,J. B., Robberson B., Babin,D. R. Amino acid sequence of the alpha-chain of bovine fetal hemoglobin. *Arch. Biochem. Biophys*. 1967. 120 (1), p 1-14.

Schally A. V., Nair R. M. G., Tommie W. R., Arimura A. Isolation of the Luteinizing Hormone and Follicle-stimulating Hormone-releasing Hormone from Porcine Hypothalami. *The Journal Of Biological Chemistry.* 1971. 246(23), p 7230-7239.

Shai, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membranelytic peptides. *Biochim Biophys Acta.* 1999. 1462(1-2), p 55-70.

Sherwood L. L., Lockart A. physiologie humaine. 2006. P 215.

Simmons D. A., Wilson D. J., Lajoie G. A., Doherty-Kirby A, Konermann L. Subunit disassembly and unfolding kinetics of hemoglobin studied by time-resolved electrospray mass spectrometry. *Biochemistry*. 2004. 43(46), p 4792-4801.

Simon L. M., Kotorman M., Szabo A., Nemcsok J., Laczko I. The effects of organic solvent/water mixtures on the structure and catalytic activity of porcine pepsin. *Proc. Biochem*. 2007. 42, p 909-912.

Solís-Mendiola S., Rojo-Domínguez A., Hernández-Arana A. Cooperativity in the unfolding transitions of cysteine proteinases. Calorimetric study of the heat dénaturation of chymopapain and papain. *Biochim Biophys Acta*. 1993. 1203(1), p 121-125.

Stephen R. M., Schilstra M. J.. Circular Dichroism and its application to the study of biomolecules. *Methods in cell Biology.* 2008. 84, p 263-297.

Su R. X., Qi W., He Z. M. Time-dependent nature in peptic hydrolysis of native bovine hemoglobin. *Eur Food Res Technol*. 2007. 225, p 637-647.

Sweeney P. J.,Walker J. M. Enzymes of Molecular Biology. 1993. Edition Burrell M. M., p 290-291.

T

Takahashi K., Fukada H. Calorimetric studies of the binding of Streptomyces subtilisin inhibitor to subtilisin of Bacillus subtilis strain N'. Biochemistry. 1985. 24(2), p 297-300.

Takagi H., Shiomi H., Ueda H., Amano H. Morphine-like analgesia by a new dipeptide, L-tyrosyl-L-arginine (Kyotorphin) and its analogue. *Eur J Pharmacol*. 1979. 55(1), p 109-111.

Takagi H., Shiomi H., Fukui K., Hayashi K., Kiso Y., Kitagawa K. Isolation of a novel analgesic pentapeptide, neo-kyotorphin, from bovine brain. *Life Sci.* 1982. 31(16-17), p 1733-1736.

Tanaka T., Yada R. Y. N-terminal portion acts as an initiator of the inactivation of pepsin at neutral pH. *Protein Eng*. 2001. 14, p 669-674.

Tasiemski A., Vandenbulcke F., Mitta G., Lemoine J., Lefebvre C., Sautiere PE., Salzet M. Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid : the leech theromyzon tessulatum. *J Biol Chem*. 2004. 279(30), 30973-30982.

Taylor R. P., Chau V, Zenkowich M. J., Leake L. H. Stopped-flow studies on the n equilibrium f transition in serum albumin. *Biophys Chem.* 1979. 7(4), p 293-299

Tchorbanov B., Iliev I. Limited hydrolysis of casein in the presence of éthanol. *Enzym. Microb. Technol*. 1993. 15, p 974-978.

U

Ueda Y., Shiga T., Tyuma I. Circular dichroism spectra of human adult hemoglobin and its subunits. *Biochem Biophys Res Commun*. 1969. 35(1), p 1-5.

Uematsu N., Matsuzaki K. Polar angle as a determinant of amphipathic alpha-helix-lipid interactions: a model peptide study. *Biophys J*. 2000. 79, 2075-2083.

Urry D. W., Pettegrew J. W. Model systems for interacting heme moieties. II. The ferriheme octapeptide of cytochrome c. *J Am Chem Soc*. 1967. 89(20), p 5276-5283.

V

Van Kampen E. J, Zijlstra W. G. Determination of hemoglobin and its derivatives. *Adv Clin Chem*. 1965. 8, p 141-187.

Vercaigne-Marko D., Kosciarz E., Nedjar-Arroume N., Guillochon D. Improvement of Staphylococcus aureus-V8-protease hydrolysis of bovine haemoglobin by its adsorption on to a solid phase in the presence of SDS: peptide mapping and obtention of two haemopoietic peptides. *Biotechnol Appl Biochem*. 2000. 2, 127-134.

Voet D., Voet J. G., Rousseau G. Biochimie. 2007a. 2e édition, p 256-367.

Voet D., Voet J. G., Rousseau G., Biochimie. 2007b. *ed Boeck,* p 360-450.

W

Wang Y., Guo R., Xi J. Comparative studies of interactions of hemoglobin with single-chain and with gemini surfactants. *Journal of Colloid and Inter*face *Science*. 2009. 331, p 470‑475.

Wang Z., Wang G. APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Research*. 2004. 32, p 590-593.

Wei X., Ding S., Jiang Y., Zeng X. G., Zhou H. M. Conformational Changes and Inactivation of Bovine Carbonic Anhydrase II in 2,2,2-Trifluoroéthanol Solutions. *Biochemistry (Moscow),* 2006. 71(1), p 77-82.

Welinder K. G. Generation of peptides suitable for consequences analysis by proteolytic cleavage in reversed-phase high performance liquid chromatography solvents. *Anal. Biochem.* 1988. 174, p 54-64.

Wieprecht T., Dathe M., Krause E., Beyermann M., Maloy W. L., MacDonald D. L., Bienert M. Modulation of membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides by slight modifications of the hydrophobic moment. *FEBS Lett*. 1997. 417, p 135-140.

X

Xu Q., Keiderling T. A Trifluoroéthanol-Induced Unfolding of Concanavalin A: Equilibrium andTime-Resolved Optical Spectroscopic Studies. *Biochemistry.* 2005. 44, p 7976-7987.

Y

Yan YB., Wang Q., He HW., Zhou HM. Protein thermal aggregation involves distinct regions: sequential events in the heat-induced unfolding and aggregation of hemoglobin. 2004. *Biophysical Journal*. 2004. 86, p 1682-1690.

Yang Z. Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis *Journal of Biotechnology Review*. 2009. 144(1), p 12-22

Yang L., Weiss T. M., Lehrer R. I., Huang H. W. Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophys J*. 2000. 79, p 2002-2009.

Yeaman M., Yount N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmaco. rev*. 2003. 55 (1), p 27–55.

Yoshikawa M., Tani F., Yoshimura T., Chiba H. Opioid peptides from milk proteins. *Agric. Biol Chem*. 1986. 50, p 2419-2421.

Yu Y., Hu J., Miyaguchi Y., Bai X., Du Y., Lin B. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from porcine hemoglobin. *Peptides*. 2006. 27 (11), p 2950-29506.

Z

Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002. 415, p 389-395.

Zerlin K., Thorsten F., Kasischke N., Digel I., Maggakis-Kelemen C., Artmann T., Porst D., Kayser P., Linder P., Artmann G. M. Structural transition temperature of hemoglobins correlates with species body temperature. *Eur Biophys J*. 2007. 37, p 1–10.

Zijlstra W. G., Buursma A., Meeuwsen-van der Roest W. P. Absorption spectra of human fetal and adult oxyhemoglobin, de-oxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin**.** *Clin Chem*. 1991. 37(9), 1633-1638.

Zinner S. H. Antibiotic use: present and future. *New Microbiol*. 2007. 30(3), p 321-325.

Zioudrou C., Streaty R. A., Klee W. A. Opioid Peptides Derived from Food Proteins. THE EXORPHINS. *The Journal of Biological Chemistry*. 1979. 254 (7), p. 2446-2449.

Zhang H., Zhang X., Xu B. Analysis and detemination of biologically activity of short-chain peptides from porcine brain hydrolysate. *J Pharm Biomedical Anal,* 2004. 37, p 333-339.

Zhang Y. X., Zhu Y., Zhou H. M. Conformational changes and inactivation of calf intestinal alkaline phosphatase in trifluoroéthanol solutions. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2000. 32, p 887-894.

Zhao H. Effect of ions and other compatible solutes on enzyme activity, and its implication for biocatalysis using ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2005. 37(1-6), p 16-25.

Zhao H. , Jackson L., Song Z., Olubajo O. Enhancing protease enantioselectivity by ionic liquids based on chiral- or ω-amino acids. *Tetrahedron: Asymmetry*. 2006. 17(10), p 1549-1553.

Zhao Q., Piot J.M. Investigation of inhibition angiotensin-converting enzyme (*ECA*) activity and opioid activity of two hemorphins, LVV-hemorphin-5 and VV-hemorphin-5, isolated from a defined peptic hydrolysate of bovine hemoglobin. *Neuropeptides*. 1997. 2, 147-153.

Zhao Q., Piot J. M. Organic solvent extraction associated with CLHP in the preparation of hemorphins from bovine hemoglobin peptic hydrolysate. *Prep Biochem Biotechnol*. 1998. 28(1), p 61-78.

Zhao Q., Sannier F., Garreau I., Guillochon D., Piot J. M. Inhibition and inhibition kinetics of angiotensin converting enzyme activity by hemorphins, isolated from a peptic bovine hemoglobin hydrolysate. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994. 204(1), 216-223.

Zhu Y., Cheng G., Dong S. Structural electrochemical study of hemoglobin by in situ circular dichroism thin layer spectroelectrochemistry. *Biophys Chem*. 2002. 97(2-3), p 129-138.

Liste des annexes et communications scientifiques

Articles soumis ou publiés

- **Adje, Estelle**; Balti, Rafik; kouach, Mostafa; Didier Guillochon, Didier; Arroume, Naïma. α 67-106 of bovine hemoglobin: a new family of antimicrobial and angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *European Food research and Technology*. ID: jf-2010-02754j (**Accepté**)

- Balti R, Nedjar-Arroume N, **Adje EY**, Guillochon D, Nasri M. Analysis of novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from enzymatic hydrolysates of cuttlefish (Sepia officinalis) muscle proteins. *J Agric Food Chem.* 2010. 58(6):3840-6. (**Annexe 1**)

- Nedjar-Arroume N, Dubois-Delval V, **Adje EY**, Traisnel J, Krier F, Mary P, Kouach M, Briand G, Guillochon D. Bovine hemoglobin: an attractive source of antibacterial peptides. *Peptides.* 2008. 29(6):969-77. (**Annexe 2**)

- Ali Bougatef, Rafik Balti, Naïma Nedjar-Arroume, Rozenn Ravallec, **Estelle Yaba Adje**, Nabil Souissi, Imen Lassoued, Didier Guillochon, Moncef Nasri. Evaluation of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates generated by gastrointestinal proteases: identification of the most potent active peptide. *Eur Food Res Technol.* (Annexe 3).

Communications écrites ou orales

- Naïma Nedjar-Arroume, Véronique Dubois-Delval, **Estelle Yaba Adje**, François Krier, Mostafa Kouach, Gilbert Briand et Didier Guillochon. (2007). L'obtention et la caractérisation de cinq peptides antimicrobiens à partir de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine. 15ème Congrès du Groupe Français des Peptides et des Protéines, 20-25 mai, Dinard, France.

- Nedjar-Arroume N, Dubois-Delval V, **Adjé Y.E,** Krier F, Kouach M, Briand G, Guillochon D. (2007). L'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine: Préparation de peptides antimicrobiens. CNRIUT. 31 mai et 1 juin. Thionville - Yutz, France

- **Adje Y.E.**, Nedjar-Arroume N. et Guillochon D. (2009) Obtention de peptides actifs par hydrolyse ménagée d'hémoglobine bovine 15ème Colloque National de la Recherche en IUT, 8-10 juin, Villeneuve d'Ascq, France. .

- **Adje Y.E.,** Nedjar-Arroume N. et Guillochon D (2009) Obtention de peptides actifs après modification structurale de l'hémoglobine bovine : Cas de quelques alcools. 15ème Colloque National de la Recherche en IUT, 8-10 juin, Villeneuve d'Ascq, France . (Annexe 4).

- **Adje Y.E.,** Nedjar-Arroume N., Kaouach M., Guillochon D., Dhulster P. (2009) Obtaining antimicrobials peptides by spared hydrolysis of bovine hemoglobin Second International Symposium on Antimicrobial Peptides. 17-19 June, Saint-Malo, France.

- Rafik Balti, Naima Nedjar-Arroume, **Estelle Yaba Adje**, Didier Guillochon, Moncef Nasri, Pascal Dhulster. (2010). Procédé de production d'hydrolysats de protéines de muscle de la seiche commune (/sepia officinalis/) enrichis en peptides antihypertensifs. Journée Jeunes Chercheurs, UGéPE. 3 juin. Nord Pas-de-Calais, Université du Littoral Côte d'Opale, Dunkerque.

- Rafik Balti, Naima Nedjar-Arroume, **Estelle Yaba Adjé**, Didier Guillochon, Moncef Nasri, Pascal Dhulster. (2010). Procédé de production d'hydrolysats de protéines de muscle de la seiche commune (/sepia officinalis/) enrichis en peptides antihypertensifs. 16ème Colloque National de la Recherche en IUT. 9-11 juin, Anger, France

ANNEXES

ANNEXE 1

3840 J. Agric. Food Chem. 2010, 58, 3840–3846
DOI:10.1021/jf904300q

JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY
ARTICLE

Analysis of Novel Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Enzymatic Hydrolysates of Cuttlefish (*Sepia officinalis*) Muscle Proteins

Rafik Balti,[†] Naima Nedjar-Arroume,[‡] Estelle Yaba Adjé,[‡] Didier Guillochon,[‡] and Moncef Nasri*,[†]

[†]Laboratoire de Génie Enzymatique et de Microbiologie—Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, BP "1173" 3038 Sfax, Tunisia, and [‡]Laboratoire de Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien, IUT A Lille I, BP 179, 59653 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

The angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of protein hydrolysates prepared from cuttlefish (*Sepia officinalis*) proteins by treatment with various bacterial proteases were investigated. The hydrolysate generated by the crude enzyme from *Bacillus mojavensis* A21 displayed the highest ACE inhibitory activity, and the higher inhibition activity (87.11 ± 0.92% at 2 mg/mL) was obtained with hydrolysis degree of 16%. This hydrolysate was fractionated by size exclusion chromatography on a Sephadex G-25 into eight major fractions (P_1-P_8). Fraction P_6, which exhibited the highest ACE inhibitory activity, was then fractionated by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). Eleven ACE inhibitory peptides were isolated, and their molecular masses and amino acids sequences were determined using ESI-MS and ESI-MS/MS, respectively. The structures of the most potent peptides were identified as Ala-His-Ser-Tyr, Gly-Asp-Ala-Pro, Ala-Gly-Ser-Pro and Asp-Phe-Gly. The first peptide displayed the highest ACE inhibitory activity with an IC_{50} of 11.6 μM. The results of this study suggest that cuttlefish protein hydrolysates are a good source of ACE inhibitory peptides.

KEYWORDS: *Sepia officinalis*; muscle protein hydrolysates; ACE inhibitory peptide; purification and identification

INTRODUCTION

High blood pressure has been considered a risk factor for developing cardiovascular diseases (arteriosclerosis, stroke and myocardial infarction) and end-stage renal disease (*1*). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) plays an important role in the renin−angiotensin system (RAS), which regulates human blood pressure and fluid homeostasis. The main molecule of the RAS, angiotensin II, is produced through an enzymatic cascade consisting of renin, an aspartic protease that first cleaves angiotensinogen to form the decapeptide angiotensin I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu, 1−10), and ACE, an M2 family metallopeptidase that then further cleaves angiotensin I into the octapeptide angiotensin II (1−8) by removing the C-terminal dipeptide His-Leu (*2*). The resulting angiotensin II is a potent vasoconstrictor, which stimulates the release of aldosterone and antidiuretic hormone or vasopressin and increases the retention of sodium and water and the regeneration of rennin. In addition, ACE, also termed kininase II, inactivates the vasodilators bradykinin (Arg-Pro-Pro- Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) and kallidin (Lys-bradykinin) in the kallikrein−kinin system by cleaving the C-terminal dipeptide Phe-Arg. These effects directly act in concert to raise blood pressure.

*Corresponding author. Tel: 216 74-274-088. Fax: 216 74-275-595. E-mail: mon_nasri@yahoo.fr; moncef.nasri@enis.rnu.tn.

Specific inhibitors of ACE have been shown to be useful as antihypertensive drugs. Three kinds of synthetic ACE inhibitors were designed; they are grouped by their ligand for the active site on ACE. Captopril, the major representative of his group, has a sulfydryl moiety, lisinopril and enalapril have a carboxyl moiety, and fosinopril has a phosphorus group (*3*). Although ACE inhibitory drugs have demonstrated their usefulness, they are not entirely without side effects, such as cough, lost of taste, renal impairment and angioneurotic edema (*4*). Therefore, research and development to find safer, innovative and economical ACE inhibitors is necessary for the prevention and remedy for hypertension.

A variety of ACE inhibitory peptides with various amino acids sequences have been purified and identified in hydrolysates from food proteins digested with different proteases such as milk protein (*5*), gelatin (*6*), wheat protein (*7*), sardinelle (*8*), sea cucumber (*9*), tuna (*10*), and tilapia (*11*). In contrast to the many ACE inhibitory peptides derived from vertebrate muscle, very few studies on ACE inhibitory peptides from invertebrate muscles have been conducted.

In this study, we investigated the ACE inhibitory activity of cuttlefish muscle protein hydrolysates obtained by various enzymatic treatments. Eleven new antihypertensive peptides were isolated from the hydrolysate obtained by treatment with crude protease extract from *Bacillus mojavensis* A21, and their amino

 Published on Web 02/24/2010 © 2010 American Chemical Society

acids sequences were determined. Furthermore, the inhibition pattern of the most active peptide on ACE was investigated and the stability was evaluated under simulated gastrointestinal digestion.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Angiotensin I-converting enzyme from rabbit lung and the ACE synthetic substrate hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL) were purchased from Sigma Chemicals Co (St. Louis, MO). Acetonitrile was of HPLC grade. Sephadex G-25 was purchased from Pharmacia (Uppsala, Sweden). Water was obtained from a Culligan system; the resistivity was approximately 18 MΩ. All other chemicals and reagents used were of analytical grade.

Materials. Cuttlefish (*Sepia officinalis*), in the size range of 8−10 cuttlefish/kg, was purchased from the fish market of Sfax city, Tunisia. The samples were packed in polyethylene bags, placed in ice with a sample/ice ratio of approximately 1:3 (w/w) and transported to the research laboratory within 30 min. The mantle was cleaned, deskinned and eviscerated and then stored in sealed plastic bags at −20 °C until used.

Proteolytic Enzymes. Alcalase 2.4L serine-protease from *Bacillus licheniformis* was supplied by Novozymes (Bagsvaerd, Denmark). Pepsin (10 U, from porcine stomach mucosa), chymotrypsin (5 U, from bovine pancreas) and trypsin (10 U, from bovine pancreas) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Crude enzyme preparations from *Aspergillus clavatus* ES1 (*12*), *Bacillus licheniformis* NH1 (*13*) and *Bacillus mojavensis* A21 (*14*) were prepared in our laboratory.

Preparation of Cuttlefish Muscle Protein Hydrolysates (CMPHs) Using Various Proteases. Cuttlefish (*S. officinalis*) muscle (500 g), in 1000 mL of distilled water, was minced, using a grinder (Moulinex Charlotte HV3, France), and then cooked at 90 °C for 20 min to inactivate endogenous enzymes. The cooked muscle sample was then homogenized in a Moulinex blender for about 2 min. The samples were adjusted to optimal pH and temperature for each enzyme: Alcalase (pH 8.0; 50 °C), crude enzymes from *B. licheniformis* NH1 and *B. mojavensis* A21 (pH 10.0; 50 °C) and crude enzyme from *A. clavatus* ES1 (pH 8.0; 40 °C). Then, the substrate proteins were digested with enzymes at a 3:1 (U/mg) enzyme/protein ratio for 4 h. Enzymes were used at the same activity levels to compare hydrolytic efficiencies. During the reaction, the pH of the mixture was maintained at the desired value by continuous addition of 4 N NaOH solution. The enzymatic hydrolysis was stopped by heating the solutions at 80 °C during 20 min. Protein hydrolysates were then centrifuged at 5000*g* for 20 min to separate soluble and insoluble fractions. Finally, the soluble fractions were freeze-dried using freeze-dryer (Bioblock Scientific Christ ALPHA 1-2, Illkirch-Cedex, France) and stored at −20 °C for further use.

Determination of the Degree of Hydrolysis. The degree of hydrolysis (DH), defined as the percent ratio of the number of peptide bonds broken (h) to the total number of peptide bonds per unit weight (h_{tot}), in each case, was calculated from the amount of base (NaOH) added to keep the pH constant during the hydrolysis (*15*) as given below.

$$\mathrm{DH}\ (\%) = \frac{h}{h_{\mathrm{tot}}} \times 100 = \frac{B \times \mathrm{Nb}}{\mathrm{MP}} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{\mathrm{tot}}} \times 100$$

where B is the amount of NaOH consumed (mL) to keep the pH constant during the reaction. Nb is the normality of the base, MP is the mass (g) of protein ($N \times 6.25$), and α is the average degree of dissociation of the α-NH_2 groups released during hydrolysis expressed as

$$\alpha = \frac{10^{\mathrm{pH}-\mathrm{pK}}}{1 + 10^{\mathrm{pH}-\mathrm{pK}}}$$

where pH and pK are the values at which the proteolysis was conducted. The total number of peptide bonds (h_{tot}) in a fish protein concentrate was assumed to be 8.6 mequiv/g (*15*).

Chemical Analysis. The moisture and ash content were determined according to the AOAC (*16*) standard methods 930.15 and 942.05, respectively. Total nitrogen content of cuttlefish protein hydrolysates was determined by using the Kjeldahl method. Crude protein was estimated by multiplying total nitrogen content by the factor of 6.25. Lipids were determined gravimetrically after Soxhlet extraction of dried samples with hexane. All measurements were performed in triplicate.

Determination of ACE Inhibition Activity. The ACE inhibition activity was measured as reported by Nakamura et al. (*17*). A sample solution (80 μL) containing different concentrations of protein hydrolysates was added to 200 μL containing 5 mM hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL), and then preincubated for 3 min at 37 °C. CMPHs and HHL were prepared in 100 mM borate buffer, pH 8.3, containing 300 mM NaCl. The reactions were then initiated by adding 20 μL of 0.1 U/mL ACE from rabbit lung prepared in the same buffer and incubated for 30 min at 37 °C. The enzyme reaction was terminated by the addition of 250 μL of 1.0 M HCl. The released hippuric acid (HA) was quantified by RP-HPLC on a Vydac C_{18} column connected to a system composed of a Waters TM 600 automated gradient controller pump module, a WaterWisp 717 automatic sampling device and a Waters 996 photodiode array detector. The sample was then eluted using an acetonitrile gradient from 0 to 28% and from 28 to 47% in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) (v/v) for 50 and 20 min, respectively. The eluate was followed at 228 nm. Spectral and chromatographic data were stored on a NEC image 446 computer. Millennium software was used to acquire, analyze and plot chromatographic data. The average value from three determinations at each concentration was used to calculate the ACE inhibition rate as follows:

$$\text{ACE inhibition}\ (\%) = \left[\frac{B-A}{B-C}\right] \times 100$$

where A is the absorbance of HA generated in the presence of ACE inhibitor component, B the absorbance of HA generated without ACE inhibitors and C is the absorbance of HA generated without ACE (corresponding to HHL autolysis in the course of enzymatic assay).

The IC_{50} value was defined as the concentration of hydrolysate (mg/mL) required to reduce the hippuric acid peak by 50% (indicating 50% inhibition of ACE).

Purification and Characterization of ACE-Inhibitory Peptides. The freeze-dried hydrolysate (1 g), with a DH of 16% obtained by treatment with alkaline proteases from *B. mojavensis* A21, was suspended in 5 mL of distilled water, and then loaded onto a Sephadex G-25 gel filtration column (5 cm × 57 cm), pre-equilibrated and eluted with distilled water. Fractions (4 mL each) were collected at a flow rate of 30 mL/h, and the absorbance was measured at 226 nm. Fractions associated with each peak showing ACE inhibitory activity were pooled and freeze-dried. Peptides in fraction P_6 from Sephadex G-25, which exhibited the highest ACE inhibitory activity, were dissolved in distiller water, filtered through 0.22 μm, and then separated by RP-HPLC on a Vydac C_{18} column (10 mm × 250 mm) (Grace-Vydac, USA). Peptides were eluted with eluent A (water containing 0.1% trifluoric acetic acid (TFA) for 20 min), then with a linear gradient of acetonitrile (0−50% in 35 min) containing 0.1% TFA at a flow rate of 1 mL/min. Online UV absorbance scans were performed between 200 and 300 nm at a rate of one spectrum per second with a resolution of 1.2 nm. Chromatographic analyses were completed with Millennium software. The ACE inhibitory activities of the eluted peaks were determined. The liquid chromatographic system consisted of a Waters 600E automated gradient controller pump module, a Waters Wisp 717 automatic sampling device and a Waters 996 photodiode array detector. Spectral and chromatographic data were stored on a NEC image 466 computer. Millennium software was used to plot, acquire and analyze chromatographic data.

Identification of the Amino Acid Sequence of ACE Inhibitory Peptides. The molecular mass and peptide sequencing were done on positive ion mode using electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and tandem mass spectrometry (MS/MS), respectively. ESI mass spectrometry was performed using a triple quadrupole instrument Applied Biosystems API 3000 (PE Sciex, Toronto, Canada) equipped with an electrospray ion source. The system is controlled by the Analyst Software 1.4, allowing the control of the spectrometer, the analysis and the processing data. Interpretations of MS/MS spectra were made with Bioanalyst software. The freeze-dried samples from RP-HPLC were dissolved in acetonitrile/water (20/80; v/v) containing 0.1% formic acid for the positive mode. The solution was injected (nebulized) uninterrupted, by a pump (model 22, Harvard Apparatus, South Natick, MA) with a flow rate of 5 μL/min. The potential of ionization was of 5000 V in positive

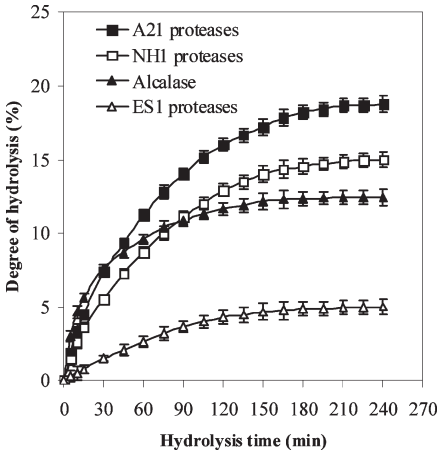


Figure 1. Hydrolysis curves of cuttlefish muscle proteins treated with different enzymes.

mode. At the time of the recording of the spectrum, 30 scans on average were added (MCA mode) for each spectrum. The gases used (nitrogen and air) were pure (up to 99%) and produced by a compressor Jun-Air 4000−40 M and a nitrogen generator Whatman model 75-72 (Whatman Inc., Haverhill, MA). Polypropylene glycol (PPG) was used for the calibration and the optimization of the machine. The peptide sequence was determined from the CID spectrum of the protonated analyze $[M + H]^+$ by MS/MS experiments. Peptide sequences were done using the bioanalyst software (Applied Biosystems, USA).

Stability of Ala-His-Ser-Tyr against Gastrointestinal Proteases. *In vitro* digestion of the potent purified ACE-inhibitory peptide (Ala-His-Ser-Tyr) was carried out according to the method of Kuba et al. (*18*). Peptide (0.2 mL, 1 mg/mL) was incubated with 0.05% pepsin (pH 2.0), chymotrypsin or trypsin (pH 8.0) for 3 h at 37 °C. In successive digestion test, the peptide was first incubated with pepsin for 3 h, evaporated in a centrifugal concentrator and then incubated for 3 h at 37 °C with both 0.025% (w/v) chymotrypsin and 0.025% (w/v) trypsin. The reactions were then heated for 5 min in boiling water to inactivate the enzyme. After enzymatic treatment, each sample was centrifuged and the supernatant was adjusted to pH = 8.3 and used for the ACE inhibitory activity determination.

Determination of ACE Inhibition Pattern. To clarify the inhibitory mechanism of the most potent peptide (Ala-His-Ser-Tyr) on ACE, different concentrations of the ACE inhibitory peptide were added to each reaction mixture according to the method of Wu and Ding (*19*), with slight modifications. The enzyme activities were measured with different concentrations of the substrate (HHL). ACE inhibitory pattern in the presence of the inhibitor was determined with Lineweaver−Burk plot (*20*).

Statistical Analysis. Statistical analyses were performed with Statgraphics ver. 5.1, professional edition (Manugistics Corp., USA) using ANOVA analysis. Differences were considered significant at $p < 0.05$. Correlation coefficient between degree of hydrolysis (DH) and ACE-inhibitory activity was performed by SPSS software using Pearson's correlation coefficient.

RESULTS AND DISCUSSION

Preparation of Cuttlefish Protein Hydrolysates Using Various Proteases. The specificity of the enzyme used for the proteolysis and process conditions greatly influenced the molecular weight and amino acid residue composition of cuttlefish protein hydrolysates and thus their ACE inhibitory activities (*21*). In the present study, to produce ACE inhibitory peptides, cuttlefish muscle was hydrolyzed with various enzymes: Alcalase, crude enzyme preparations from *B. mojavensis* A21, *B. licheniformis* NH1 and *A. clavatus* ES1. The proximate composition of the cuttlefish muscle showed that it had high protein content (80.67 ± 0.26%). The ash and lipid contents of the muscle were 9.91 ± 0.04 and 3.4 ± 0.1%, respectively.

Table 1. Degrees of Hydrolysis of Cuttlefish Muscle Proteins, ACE Inhibitory Activities and IC_{50} Values of CMPH Obtained with Various Protease Treatments

enzyme	DH (%)	ACE inhibn (%)	IC_{50} (mg/mL)
A21 proteases	18.7	70.00 ± 1.00	1.12 ± 0.07
NH1 proteases	15.0	49.32 ± 0.62	2.01 ± 0.21
Alcalase	12.5	51.47 ± 1.50	1.84 ± 0.11
ES1 proteases	5.0	22.57 ± 1.30	4.43 ± 0.36

The extent of protein degradation by proteolytic enzymes was estimated by assessing the DH. The hydrolysis curves of cuttlefish proteins with the different enzymes after 4 h of incubation are shown in **Figure 1**. The hydrolysis of cuttlefish proteins was characterized by a high rate of hydrolysis for the first 1 h. The rate of enzymatic hydrolysis was subsequently decreased, and then the enzymatic reactions reached the steady-state phase when no apparent hydrolysis took place.

The crude protease from *B. mojavensis* A21 was the most efficient (DH = 18.7%), followed by the crude enzyme from *B. licheniformis* NH1 (DH = 15%), while that of *A. clavatus* ES1 was the least efficient (DH = 5%). High hydrolysis degree obtained with crude proteases from NH1 and A21 strains could be due to the fact that these extracts contain multiple proteases which offer the ability to achieve higher degree of hydrolysis of cuttlefish proteins (*14*, *22*). However, in the case of *A. clavatus* ES1, Hajji et al. (*23*) reported the production of only one protease by this strain.

The shape of hydrolysis curves is similar to those previously published for hydrolysates from smooth hound (*24*), Atlantic salmon (*25*), silver carp (*26*) and sardinelle (*8*).

ACE Inhibitory Activity of Cuttlefish Muscle Protein Hydrolysates. ACE inhibitory activity of the four CMPHs is presented in **Table 1**. ACE inhibitory activity of hydrolysates at 2 mg/mL varied greatly from 22.6% to 70.0%. The difference between ACE inhibitory activities might be attributed to the different molecular weights and different amino acid composition of ACE inhibitory peptides present in the CMPHs.

The protein hydrolysate generated by the crude enzyme preparation from *A. clavatus* ES1 showed the weakest ACE inhibitory activity with an IC_{50} value of 4.43 ± 0.36 mg/mL, while that obtained by the crude enzyme preparation from *B. mojavensis* A21 exhibited the highest ACE inhibitory activity with an IC_{50} value of 1.12 ± 0.07 mg/mL. The obtained results clearly show that high ACE inhibitory activity was observed only with hydrolysates with high DH, demonstrating that low molecular weight peptides had more ACE inhibitory activity than high molecular weight peptides. This is in line with previous works reporting that low molecular weight peptides exhibited higher activity than high molecular weight peptides (*9*, *27*). In addition, the obtained results suggest that protein hydrolysate prepared by treatment with crude protease from A21 strain possibly contained more potent ACE inhibitory activity peptides.

The IC_{50} value of A21 cuttlefish protein hydrolysate is lower than those of hydrolysates from oyster, scallop, codfish skin, and codfish bone, which presented an IC_{50} greater than 10 mg/mL (*28*), whereas it is higher than those of β-conglycinin and glycinin hydrolysates (0.126 and 0.148 mg/mL, respectively) (*29*).

Effect of the Degree of Hydrolysis on ACE Inhibitory Activity. Since the extent of hydrolysis highly influences the recovery and the functionality of the proteins, it is imperative to control the hydrolysis of proteins. Thus, cuttlefish muscle proteins were hydrolyzed by the crude enzyme from *B. mojavensis* A21, and the degree of hydrolysis and the ACE inhibition activity were measured. As shown in **Figure 2**, no ACE-inhibitory activity was detected with the undigested cuttlefish muscle proteins, while

ACE inhibitory activity of hydrolysates increased with extended incubation time. Higher ACE inhibition ($p < 0.05$) activity (87.11 ± 0.92% at 2 mg/mL) was obtained with a DH of 16% (about 2 h) and further digestion resulted in a decrease in the inhibition level (**Figure 2**).

The degree of hydrolysis (DH) is an important indicator used to describe a protein hydrolysis reaction (*15*). Many studies have suggested the importance of DH relating to ACE inhibitory activity. In the present study, we found that ACE-inhibitory activity was positively correlated with DH value ($r = 0.8333$, $p < 0.001$) based on Pearson's correlation analysis (**Figure 3**), suggesting that, for cuttlefish muscle proteins, it is essential to reach a certain level of degree of hydrolysis to allow maximum release of active peptides from inactive protein precursors.

The above results indicated that the hydrolysate obtained by treatment with crude enzyme preparation from *B. mojavensis* A21

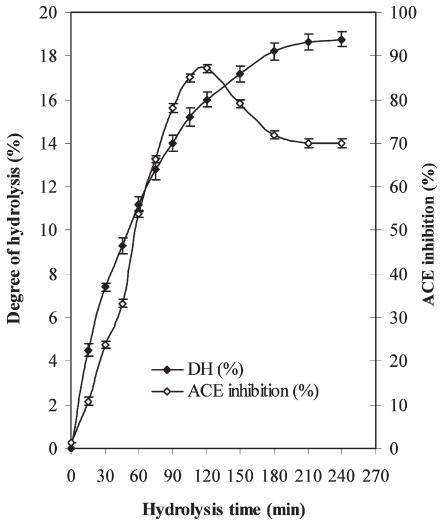


Figure 2. Comparison of ACE inhibitory activity and degree of hydrolysis of CMPH as a function of hydrolysis time.

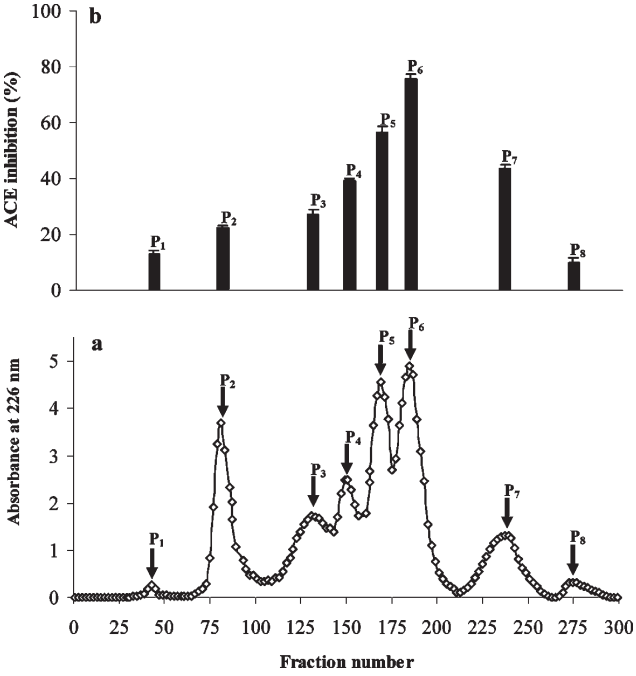


Figure 4. Elution profile of CMPH obtained with crude enzyme from *B. mojavensis* A21 separated by size exclusion chromatography on Sephadex G-25 (lower panel) and the ACE inhibitory activities of the separated fractions (P_1—P_8) (upper panel). Values presented are the means of triplicate analyses.

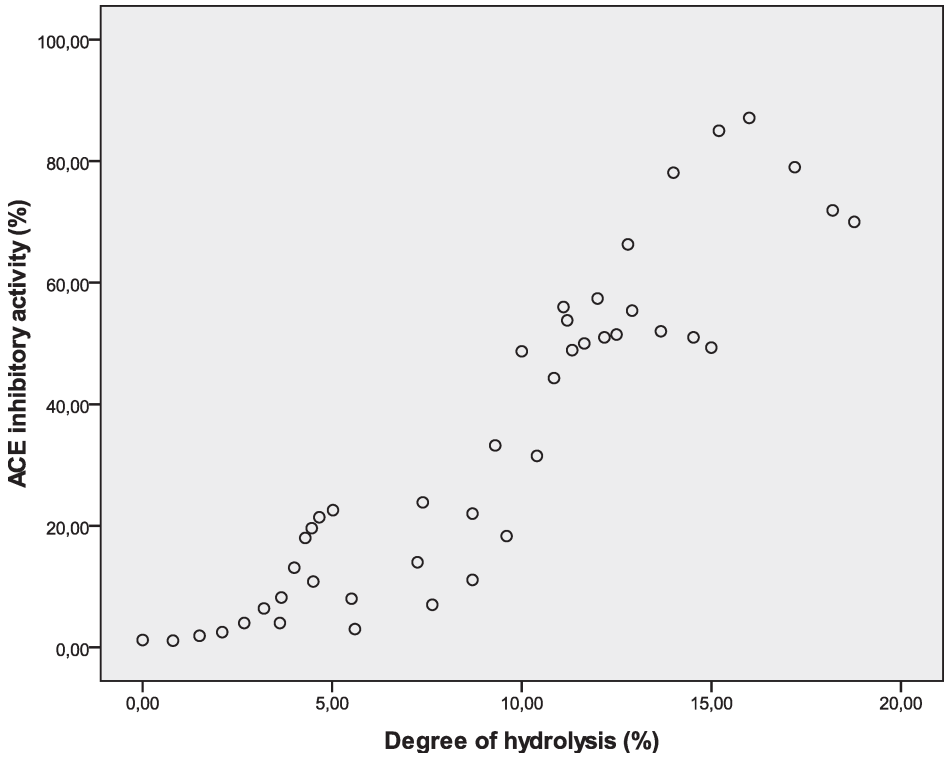


Figure 3. Relationship between degree of hydrolysis (DH) of cuttlefish muscle proteins treated with varied proteases and ACE-inhibitory activity based on Pearson's correlation analysis ($r = 0.8333$, $p < 0.001$).

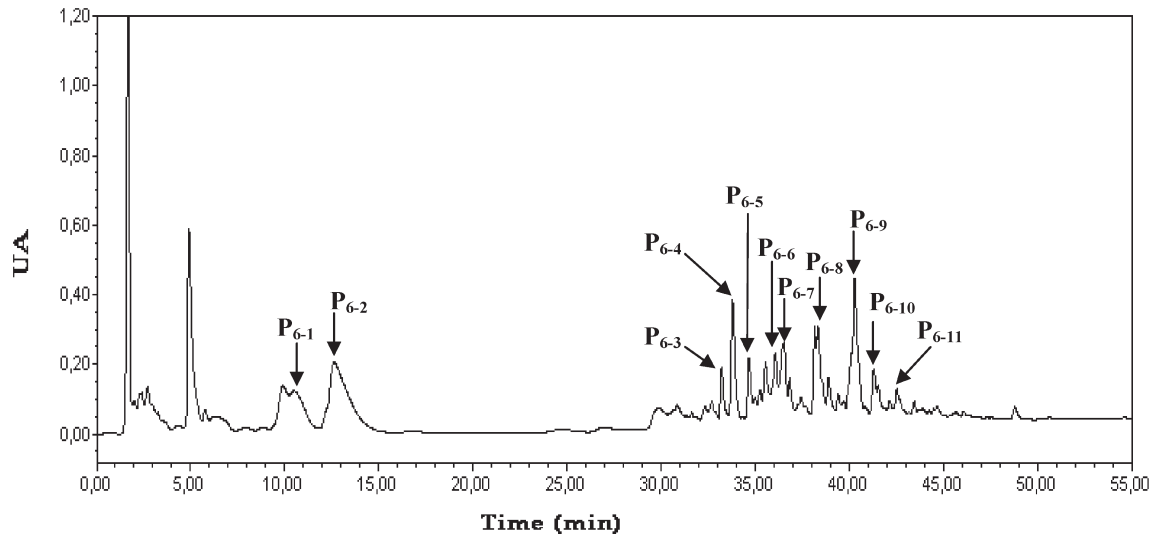


Figure 5. Purification of ACE inhibitory peptides in peak P_6 by reversed-phase HPLC chromatography on a Vydac C_{18} column (10 mm × 250 mm).

Table 2. Structure, Molecular Weight and IC_{50} Values of Peptides in Fraction P_6 from Gel Filtration Separated by RP-HPLC

fractions	mass $(M + H)^+$ in Da	sequence	IC_{50} value[a] (μM)
P_{6-1}	270.3	Gly-His-Gly	122.0
P_{6-2}	359.1	Gly-Asp-Ala-Pro	22.5
P_{6-3}	234.1	Ala-Gly-Ser	527.9
P_{6-4}	321.0	Ala-Gly-Ser-Ser	672.1
P_{6-5}	477.1	Ala-His-Ser-Tyr	11.6
P_{6-6}	331.2	Ala-Gly-Ser-Pro	37.2
P_{6-7}	520.1	Gly-Val-His-His-Ala	71.8
P_{6-8}	338.0	Asp-Phe-Gly	44.7
P_{6-9}	280.0	Phe-Gly-Gly	82.5
P_{6-10}	288.2	Ala-Val-Val	66.6
P_{6-11}	302.1	Ile-Ala-Val	153.4

[a] The IC_{50} value of each peptide is the mean of three experimental repeats.

possessed potent ACE inhibitory peptides. Therefore, this hydrolysate was selected for further study.

Isolation and Purification of ACE Inhibitory Peptides. The ACE inhibitory peptides, in cuttlefish muscle protein hydrolysates with a DH of 16%, treated with the *B. mojavensis* A21 proteases, were separated by gel filtration chromatography on a Sephadex G-25 column. As reported in **Figure 4a**, eight fractions were separated and designated as P_1-P_8. Each fraction was pooled and freeze-dried, and its ACE inhibitory activity was determined. All fractions (at 1 mg/mL) displayed ACE inhibitory activity as shown in **Figure 4b**. Of the eight fractions collected, fraction P_6 exhibited the highest level of ACE inhibitory activity (IC_{50} = 0.52 ± 0.03 mg/mL), followed by fraction P_5 (IC_{50} = 0.93 ± 0.07 mg/mL).

Fraction P_6 was further separated by RP-HPLC on a C_{18} column using a linear gradient of acetonitrile. As can be seen from the chromatographic profile at 214 nm, given in **Figure 5**, at least eleven subfractions designated $P_{6-1}-P_{6-11}$ were present in fraction P_6. These fractions were collected, and their ACE inhibitory activities were determined. Although ACE inhibitory activity was observed in all subfractions, fraction P_{6-5} exhibited the highest inhibitory activity (IC_{50} value 0.0055 mg/mL) followed by P_{6-2}, P_{6-6} and P_{6-8} with IC_{50} values of 0.008, 0.0123, and 0.015 mg/mL, respectively. The other fractions showed moderate or very low ACE inhibitory activity.

Identification of the ACE Inhibitory Peptides. Peptides in subfractions $P_{6-1}-P_{6-11}$ were analyzed by ESI-MS for molecular mass determination and by ESI-MS/MS for amino acid sequences. Eleven peptides were identified, and their IC_{50} values were determined (**Table 2**). These inhibitors are novel peptides with ACE inhibitory activity that had never been reported. The amino acid sequences of the three potent ACE inhibitors were Ala-His-Ser-Tyr, Gly-Asp-Ala-Pro and Ala-Gly-Ser-Pro, and their IC_{50} values were 11.6, 22.5, and 37.2 μM, respectively.

According to previous reports on the structure−activity relationships between different peptide inhibitors of ACE (*30*), binding to ACE is strongly influenced by the C-terminal amino acid residue. Gobbetti et al. (*31*) reported that peptides with Trp, Tyr, Phe, Pro or hydrophobic amino acids at the C-terminal were effective for ACE inhibitory activity. Several identified ACE inhibitory peptides have a proline residue in the C-terminal position, but this is neither sufficient nor essential to confer activity. Further, Cheung et al. (*32*) indicated that ACE prefers competitive inhibitors that contain hydrophobic amino acid residues such as Pro, Phe, and Tyr at the three positions from the C-terminal. In this study, two of the three potent ACE inhibitory activity peptides identified had Pro at C-terminal and the most potent inhibitory peptide had Tyr at the C-terminal position. On the other hand, several studies reported that hydrophobic amino acid residues were preferred at the N-terminal position. Among the eleven identified peptides, nine peptides had Ala, Gly or Ile at the N-terminal.

Interestingly, Ala-His-Ser-Tyr peptide with Tyr residue at C-terminal was found to possess the strong ACE-inhibitory activity with an IC_{50} value of 11.6 μM. The ACE inhibitory activity of the most potent inhibitor was higher than Ileu-Trp-Glu (IC_{50}, 315.3 μM) and Ileu-Ala-Glu (IC_{50}, 34.7 μM) peptides from the sea cucumber (*Acaudia molpadiodea*) hydrolysate (*9*), and Leu-Val-Gln-Gly-Ser (IC_{50}, 43.7 μM) from fermented soybean extract (*33*).

The peptides with moderate ACE inhibitory activity had a high content of branched and/or aromatic amino acids (Pro, Glu, Val, Phe and Tyr) in their peptide sequences such as Asp-Phe-Gly and Gly-Val-His-His-Ala peptides with IC_{50} values of 44.7 and 71.8 μM, respectively. Ala-Gly-Ser and Ala-Gly-Ser-Ser showed only weak ACE inhibitory activity. The presumed reason for this low level of activity inhibition was that these peptides were not sufficiently hydrophobic for ACE inhibition and contained Ser, a hydrophilic amino acid, at the C-terminal.

Table 3. *In vitro* Stability of Ala-His-Ser-Tyr to Digestive Proteases

enzyme	ACE inhibn (%)
control	100
pepsin	100
trypsin	99.2
chymotrypsin	98.9
pepsin + trypsin + chymotrypsin	98.1

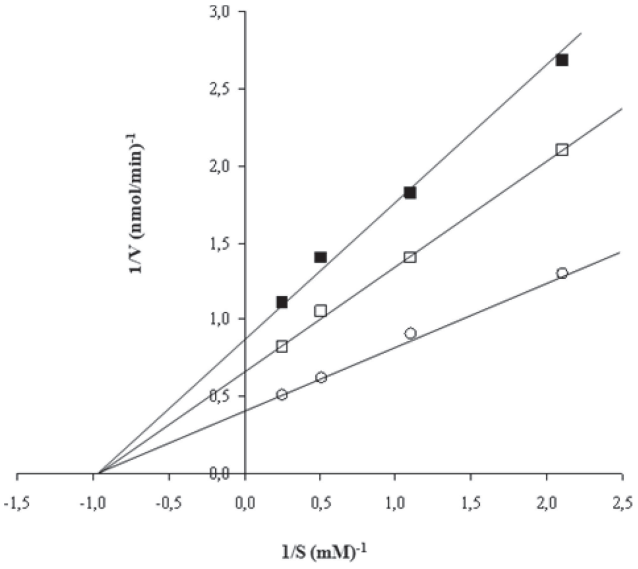


Figure 6. Lineweaver−Burk plot of the inhibition of ACE by the most potent purified peptide (Ala-His-Ser-Tyr) from cuttlefish muscle protein. ACE activity was measured in the absence or presence of inhibitory peptide (Ala-His-Ser-Tyr) as described in the text using HHL as the enzyme substrate (○, control; □, 25 μM; ■, 50 μM). 1/*V* and 1/*S* represent the reciprocal of velocity and substrate, respectively. Each point represents the mean value of three experiments.

Stability of Ala-His-Ser-Tyr against Gastrointestinal Protease. In order to exert an antihypertensive effect *in vivo*, the ACE inhibitory peptides must be absorbed in their intact form from intestine and further be resistant to plasma peptidase degradation to reach their target sites. Thus, to predict the antihypertensive effect *in vivo*, the stability of the most potent ACE inhibitory peptide, Ala-His-Ser-Tyr, against gastrointestinal proteases *in vitro*, was evaluated. As reported in **Table 3**, the peptide is stable, since incubation with gastrointestinal proteases did not change its activity ($p > 0.05$) (**Table 3**). Due to its digestion-resisting properties and long-lasting antihypertensive activity, this peptide may potentially be used as a functional food useful in prevention and/or treatment of hypertension.

Determination of ACE Inhibition Pattern of Ala-His-Ser-Tyr. The ACE inhibition pattern of the most potent ACE inhibitory peptide, Ala-His-Ser-Tyr, was investigated by Lineweaver−Burk plot (**Figure 6**). The kinetic study revealed that ACE inhibitor Ala-His-Ser-Tyr acts as a noncompetitive inhibitor. This indicates that the novel peptide cannot bind to the catalytic site of ACE and thus could not be hydrolyzed by the enzyme.

Although most of the reported peptides acted as competitive inhibitors for ACE, a few peptides inhibiting ACE activity in a noncompetitive manner have been reported, including Val-Gly-Cys-Tyr-Gly-Pro-Asn-Arg-Pro-Gln-Phe from algae protein waste (*34*), Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe from oyster (*Crassostrea talienwhanensis Crosse*) proteins (*35*), Phe-Gly-Ala-Ser-Thr-Arg-Gly-Ala from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein (*36*) and Ile-Phe-Leu and Trp-Leu from fermented soybean food (*18*). The inhibition site of the noncompetitive inhibitor on ACE was not specified, and the precise inhibition mechanism of ACE inhibitory peptide is also not yet clear.

Conclusion. ACE inhibitory peptides were selected from hydrolysates of continental proteins, and there were only a few reports on the identification of peptides from marine protein hydrolysates and in particular from invertebrate muscle. In the present study, cuttlefish muscle protein hydrolysates obtained by treatment with various proteases were found to possess ACE inhibitory activity. Among the four proteolytic preparations, crude enzyme from *B. mojavensis* A21, which contained multiple proteases, was the most suitable for the production of the hydrolysate with the highest ACE inhibitory activity.

By gel permeation chromatography on a Sephadex G-25, and reversed-phase HPLC, eleven ACE inhibitory peptides were purified from the muscle of cuttlefish hydrolysates with a DH of 16% and their sequences were identified by ESI-MS/MS and molecular weight analysis. The peptide Ala-His-Ser-Tyr displayed the highest ACE inhibitory activity with an IC_{50} of 11.6 μM. Further, this purified peptide maintained inhibitory activity even after incubation *in vitro* digestion with gastrointestinal proteases. The kinetic study revealed that the ACE inhibitor of the potent peptide acts as a noncompetitive inhibitor.

The obtained results show that cuttlefish muscle is a promising protein source for the production of ACE inhibitory peptides that could be utilized to develop functional foods for prevention of hypertension. Further work should be done to purify and identify ACE inhibitory peptides in the other fractions collected by gel filtration. In addition, potent ACE inhibitory peptides should be tested on spontaneously hypertensive rats to examine their properties and functions as antihypertensive compounds *in vivo*.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Dr. Mostafa Kouach and Dr. Gilbert Briand, Laboratoire d'Application de Spectrométrie de Masse, Service Commun de Physicochimie, Faculté de Médecine Lille II, France, for analysis of peptide sequences.

LITERATURE CITED

(1) Murray, B. A.; FitzGerald, R. J. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production. *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 773–791.

(2) Lavoie, J. L.; Sigmund, C. D. Minireview: overview of the renning-angiotensin system; an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* **2003**, *144*, 2179–2183.

(3) Cohen, M. L. Synthetic and fermentation-derived angiotensin converting enzyme inhibitors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1985**, *25*, 307–323.

(4) Cooper, W. O.; Hernandez-Diaz, S.; Arbogast, P. G.; Dudley, J. A. Major congenital malformations after first-trimester exposure to ACE inhibitors. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *354*, 2443–2453.

(5) Pihlanto, A.; Virtanen, T.; Korhonen, H. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *Int. Dairy J.* **2010**, *20*, 3–10.

(6) Zhao, Y.; Li, B.; Liu, Z.; Dong, S.; Zhao, X.; Zeng, M. Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate. *Process Biochem.* **2007**, *42*, 1586–1591.

(7) Jia, J.; Ma, H.; Zhao, W.; Wang, Z.; Tian, W.; Luo, L.; He, R. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chem.* **2010**, *119*, 336–342.

(8) Bougatef, A.; Nedjar-Arroume, N.; Ravallec-Plé, R.; Leroy, Y.; Guillochon, D.; Barkia, A.; Nasri, M. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine-proteases. *Food Chem.* **2008**, *111*, 350–356.

(9) Zhao, Y.; Li, B.; Dong, S.; Liu, Z.; Zhao, X.; Wang, J.; Zeng, M. A novel ACE inhibitory peptide isolated from *Acaudina molpadioidea* hydrolysate. *Peptides* **2009**, *30*, 1028–1033.
(10) Lee, S. H.; Qian, Z. J.; Kim, S. K. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem*. **2010**, *118*, 96–102.
(11) Raghavan, S.; Kristinsson, H. G. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. *Food Chem*. **2009**, *117*, 582–588.
(12) Hajji, M.; Kanoun, S.; Nasri, M.; Gharsallah, N. Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Process Biochem*. **2007**, *42*, 791–797.
(13) El Hadj-Ali, N.; Agrebi, R.; Ghorbel-Frikha, B.; Sellami-Kamoun, A.; Kanoun, S.; Nasri, M. Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. *Enzyme Microb*. *Technol*. **2007**, *40*, 513–523.
(14) Haddar, A.; Agrebi, R.; Bougatef, A.; Sellami-Kamoun, A.; Nasri, M. Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. *Bioresour*. *Technol*. **2009**, *100*, 3366–3373.
(15) Adler-Nissen, J. A review of food hydrolysis specific areas. In *Enzymic hydrolysis of food proteins*; Adler-Nissen, J., Ed.; Elsevier Applied Science Publishers: Copenhagen, Denmark, 1986; pp 57−109.
(16) AOAC. *Official methods of analysis*; AOAC: Arlington, VA, 1995, Secs. 930.15−942.05.
(17) Nakamura, Y.; Yamamoto, N.; Sakai, K.; Okubo, A.; Yamazaki, S.; Takano, T. Purification and characterization of angiotensin I-converting-enzyme inhibitors from Sour Milk. *J. Dairy Sci*. **1995**, *78*, 777–783.
(18) Kuba, M.; Tanaka, K.; Tawata, S.; Takeda, Y.; Yasuda, M. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from tofuyo fermented soybean food. *Biosci., Biotechnol., Biochem*. **2003**, *67*, 1278–1283.
(19) Wu, J.; Ding, X. Characterization of inhibition and stability of soy-protein derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Res. Int*. **2002**, *35*, 367–375.
(20) Lineweaver, H.; Burk, D. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc*. **1934**, *56*, 665–666.
(21) van der Ven, C.; Gruppen, H.; de Bont, D. B. A.; Voragen, A. G. J. Optimization of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology. *Int. Dairy J*. **2002**, *12*, 813–820.
(22) Hmidet, N.; El-Hadj Ali, N.; Haddar, A.; Kanoun, S.; Sellami-Kamoun, A.; Nasri, M. Alkaline proteases and thermostable α-amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as laundry detergent additive. *Biochem. Bioeng. J*. **2009**, *47*, 71–79.
(23) Hajji, M.; Rebai, A.; Garsallah, N.; Nasri, M. Optimisation of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis Jalapa* tuber powder using statistical experimental design. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **2008**, *79*, 915–923.
(24) Bougatef, A.; Hajji, M.; Balti, R.; Lassoued, I.; Triki-Ellouz, Y.; Nasri, m. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chem*. **2009**, *114*, 1198–1205.
(25) Kristinsson, H. G.; Rasco, B. A. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *J. Agric. Food Chem*. **2000**, *48*, 657–666.
(26) Dong, S.; Zeng, M.; Wang, D.; Liu, Z.; Zhao, Y.; Yang, H. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chem*. **2008**, *107*, 1485–1493.
(27) Jung, W. K.; Kim, S. K. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem*. **2006**, *94*, 26–32.
(28) He, H. L.; Chen, X. L.; Wu, H.; Sun, C. Y.; Zhang, Y. Z.; Zhou, B. C. High throughput and rapid screening of marine protein hydrolysates enriched in peptides with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity by capillary electrophoresis. *Bioresour. Technol*. **2007**, *98*, 3499–505.
(29) Kuba, M.; Tana, C.; Tawata, S.; Yasuda, M. Production of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein with *Monascus purpureus* acid proteinase. *Process Biochem*. **2005**, *40*, 2191–2196.
(30) Turner, A. J.; Hooper, N. M. The angiotensin-I-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci*. **1992**, *23*, 177–183.
(31) Gobbetti, M.; Ferranti, P.; Smacchi, E.; Goffredi, F.; Addeo, F. Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. cremoris FT4. *Appl. Environ. Microbiol*. **2000**, *9*, 3898–3904.
(32) Cheung, H. S.; Wang, F. L.; Ondetti, M. A.; Sabo, E. F.; Cushman, D. W. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J. Biol. Chem*. **1980**, *255*, 401–407.
(33) Rho, S. J.; Lee, J. S.; Chung, Y. I.; Kim, Y. K.; Lee, H. G. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from fermented soybean extract. *Process Biochem*. **2009**, *44*, 490–493.
(34) Sheih, I. C.; Fang, T. J.; Wu, T. K. Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. *Food Chem*. **2009**, *115*, 279–284.
(35) Wang, J.; Hu, J.; Cui, J.; Xuefang, B.; Dua, Y.; Miyaguchi, Y.; Lin, B. Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem*. **2008**, *111*, 302–308.
(36) Je, J. Y.; Park, P. J.; Kwon, J. Y.; Kim, S. K. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *J. Agric. Food Chem*. **2004**, *52*, 7842–7845.

Received for review December 5, 2009. Revised manuscript received February 8, 2010. Accepted February 11, 2010. This work was funded by the Ministry of Higher Education, Scientific Research and Technology, Tunisia.

ANNEXE 2

PEPTIDES 29 (2008) 969–977

available at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/peptides

Bovine hemoglobin: An attractive source of antibacterial peptides

Naïma Nedjar-Arroume [a,*], *Véronique Dubois-Delval* [a], *Estelle Yaba Adje* [a], *Jonathan Traisnel* [a], *François Krier* [a], *Patrice Mary* [a], *Mostafa Kouach* [b], *Gilbert Briand* [b], *Didier Guillochon* [a]

[a] *Laboratoire de Procédés Biologiques Génie Enzymatique et Microbien, IUT"A", Polytech'Lille, Lille I, BP 179, 59653 Villeneuve d'Ascq Cedex, France*

[b] *Laboratoire d'Application de Spectrométrie de Masse, Service Commun de Physicochimie, Faculté de Médecine H. Warembourg, Pôle Recherche, Place de Verdun, Lille II, France*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 November 2007
Received in revised form
11 January 2008
Accepted 17 January 2008
Published on line 31 January 2008

Keywords:
Bovine hemoglobin
Antibacterial peptides
Pepsin
Hydrolysate
Active peptides

ABSTRACT

A peptic hemoglobin hydrolysate was fractioned by a semi-preparative reversed-phase HPLC and some fractions have an antibacterial activity against four bacteria strains: *Micrococcus luteus* A270, *Listeria innocua*, *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*. These fractions were analyzed by ESI/MS and ESI/MS/MS, in order to characterize the peptides in these fractions. Each fraction contains at least three peptides and some fractions contain five peptides. All these fractions were purified several times by HPLC to obtain pure peptides. Thirty antibacterial peptides were identified. From the isolated antibacterial peptides, 24 peptides were derived from the α chains of hemoglobin and 6 peptides were derived from the β chains of hemoglobin. The lowest concentration of these peptides (minimum inhibitory concentration (MIC)) necessary to completely inhibit the growth of four bacteria strain was determined. The cell population of all of the tested bacteria species decreased by at least 97% after a 24-h incubation with any of the peptides at the minimum inhibitory concentration.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

In view of the emergence of resistant pathogenic bacteria, the discovery of new antimicrobial molecules having a mechanism of action different from that of traditional antibiotics is of considerable interest. In the 1970s, peptides presenting an antimicrobial activity were discovered in amphibians, insects and plants [4,9,11]. These discoveries generated a growing interest to isolate and identify other antimicrobial peptides. Since then, many antimicrobial peptides resulting from various species have been discovered [12,13,16].

Antimicrobial peptides were classified into two categories: those obtained from protein hydrolysis and newly called cryptides [33] and those obtained by ribosomal synthesis. The latter constitutes a significant part of innate immunity. These antimicrobial peptides constitute the first line of defense of the body [7,19,23]. Some of these antimicrobial peptides are not obtained by synthesis but by the proteolytic degradation of some proteins present within the organism.

During the 1990s, several peptides having antimicrobial activities were generated in vitro in protein hydrolysates. First, in 1991, Tomita et al. [32] highlighted the inhibiting effects of a

* *Corresponding author at*: Laboratoire de Procédés Biologiques Génie Enzymatique et Microbien, IUT"A", USTL, Polytech'Lille, Lille I, BP 179, 59653 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.
E-mail address: Naima.Arroume@univ-lille1.fr (N. Nedjar-Arroume).
0196-9781/$ – see front matter © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.peptides.2008.01.011

peptic hydrolysate of lactoferrin towards Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeasts and filamentous fungi. The antimicrobial activity of this peptic hydrolysate of lactoferrin is due to the presence of the peptide, lactoferricin, isolated by Bellamy et al. [2]. The hydrolysis of casein generated antimicrobial peptides. From the αs2-casein, Zucht et al. [35] isolated casocidin I (165–203). In 1999, Recio and Visser [31] identified two other antimicrobial peptides corresponding to fragments 183–207 and 164–179, after peptic hydrolysis. Lahov and Regelson [17] isolated the peptide isracidin, corresponding to the fragment 1–23 of s1-casein. Two antimicrobial peptides were also obtained from the κ-casein. The first peptide was isolated and identified by Malkoski et al. [22] within a hydrolysate obtained by the digestion with chymosin and endoproteinase Glu-C. This peptide named kappacin and corresponding to fragment 138–158, has an activity towards pathogenic germs of the mouth. The second peptide whose sequence corresponds to fragment 6–117, was isolated by Liepke et al. [20] from peptic hydrolysis. Two whey proteins, the α-lactalbumin and the β-lactoglobulin, also treated by proteolytic hydrolysis produced several peptides exhibiting an antimicrobial activity. Pellegrini et al. [27] isolated three peptides: LTD1 (α 1–5), LTD2 (α 17–31/109–114), and LDC (α 61–68/75–80) mainly active towards Gram-positive bacteria by tryptic and chymotrypsic hydrolysis from α-lactalbumin and in 2001, after tryptic digestion of the β-lactoglobulin, they isolated four peptides (15–20, 25–40, 78–83, and 92–100) having an antimicrobial activity towards Gram-positive bacteria [28].

Several authors reported obtaining antimicrobial peptides by enzymatic hydrolysis of proteins other than milk proteins. Ibrahim et al. [14] isolated a peptide (109–200) having an antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* K12 by acid hydrolysis spared from the hen ovotransferrin. Then in 2001, they also isolated a peptide (98–112) having antimicrobial properties towards Gram-positive and Gram-negative bacteria [15] after hydrolysis by clostripain from the lysozyme from hen egg white.

In 1999, Fogaça et al. [10] isolated an active peptide towards Gram-positive bacteria and mushrooms from the hemolymph of a tick parasitizing bovines (*Boophilus microplus*). The sequence of this peptide corresponded to fragment 33–61 of the α chain of bovine hemoglobin but the same peptide could not be obtained by enzymatic hydrolysis. Bovine hemoglobin is known to be a source of peptides exhibiting biological activities [15]. Several biologically active peptides could be obtained during the peptic hydrolysis of bovine hemoglobin: a heme-solubilizing peptide: β 1–30 [18], a peptide carrier of photosensitizing agents: α 110–125 [3], opioid peptides: LVV hemorphin-7 (β 31–40), VV hemorphin-7 (β 32–40) [29], VV hemorphin-4 (β 32–37) [21] or valorphin (β 32–38) [8].

Parish et al. [26] obtained four β fragments presenting antimicrobial activities against Gram-positive and Gram-negative bacteria after hydrolysis of the human hemoglobin by cyanogen bromide. Froidevaux et al. [11], for the first time, isolated an antimicrobial peptide, peptide α 1–23, active towards *Micrococcus luteus* A270, by enzymatic hydrolysis of bovine hemoglobin. Recently, in our laboratory, we isolated five antimicrobial peptides which correspond to peptides α 107–136 [6], α 107–141, α 107–133, α 137–141 and β 126–145 [24] from the peptic hydrolysate of hemoglobin.

In this paper, we report isolation and characterization of 24 new antibacterial peptides from bovine hemoglobin during peptic digestion at low degree of hydrolysis.

2. Materials and methods

2.1. Materials

All common chemicals and solvents were of analytical grade from commercial sources. Bovine hemoglobin and pig pepsin were purchased from Sigma Chemicals. Acetonitrile was of HPLC grade. Water was obtained from a Millipore MilliQ system; the resistance was about 18 MΩ. All aqueous HPLC eluents were bubbled with Waters In Line Degasser.

2.2. Hydrolysate preparations

Hemoglobin solution (100 ml) at 1% (w/v) was digested by pig pepsin (EC 3.4.23.1) (40,000 Anson units; Sigma Chemicals) at 23 °C in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.5, in the presence of urea (5.3 M). The enzymatic hydrolysis was stopped by addition of disodium tetraborate (0.32 M, pH 12.7) up to a final pH of 10. The enzymatic hydrolysis of hemoglobin was performed at 3% degree of hydrolysis (DHc) according to the trinitrobenzene sulphonate method [1].

2.3. HPLC analysis

The liquid chromatographic system consisted of a Waters 600E automated gradient controller pump module, a Waters Wisp 717 automatic sampling device and a Waters 996 photodiode array detector. Spectral and chromatographic data were stored on a NEC Image 466 computer. Millennium software was used to plot, acquire and analyze chromatographic data.

All of the chromatographic processes were performed on a Vydac C_4 column (250 mm × 10 mm). The mobile phase was water/trifluoroacetic acid (1000:1, v/v) as eluent A and acetonitrile/water/trifluoroacetic acid (600:400:1, v/v) as eluent B. The flow rate was 5 ml/min. Samples were filtered through 0.22 μm filters and then injected. The gradient applied was 0–67% (v/v) B over 30 min then 67–87% (v/v) B over 35 min. On-line UV absorbance scans were performed between 200 and 300 nm at a rate of 1 spectrum/s with a resolution of 1.2 nm. Chromatographic analyses were completed with Millennium software [34].

2.4. Mass spectrometry analysis

MS and MS/MS measurements were performed in positive ion mode using electrospray ionization (ESI) and ESI/MS/MS, respectively. ESI mass spectrometry was performed using a triple quadrupole instrument, Applied Biosystems API 3000 (PE Sciex, Toronto, Canada).

The system is controlled by the Analyst Software 1.4, allowing the control of the spectrometer, the analysis and the data processing. Interpretations of spectra MS–MS were made with the Bioanalyst software. The freeze–dried samples were dissolved in a solvent acetonitrile/water (20/80, v/v) containing formic acid 0.1% for the positive mode. The solution was

injected (nebulized) uninterrupted, by a pump (Model 22, Harward Apparatus, South Natick, USA) with a flow rate of 5 μl/min. The potential of ionization was of 5000 V (volt) in positive mode. At the time of the recording of the spectrum, 30 scans on an average were added (MCA mode) for each spectrum.

The gases used (nitrogen) were pure (up to 99%) and produced by a compressor Jun-Air 4000–40 M and a nitrogen generator Whatman model 75-72 (Whatman Inc., Haverhill, MA, USA). Polypropylene glycol (PPG) was used for the calibration and the optimization of the machine.

2.5. *Bacteria and antimicrobial assays*

The antibacterial activity was determined by the method of Parish et al. [26].

Four bacterial species were used as test micro-organisms for the determination of antibacterial activity: two Gram-negative (*E. coli* and *Salmonella enteridis)* and two Gram-positive (*M. luteus* A270 and *Listeria innocua*). The bacterial strains used as indicator bacterial species were isolated from food products in our laboratory, except *M. luteus* A270.

The antibacterial activity was measured as the diameter of clear zone of growth inhibition by comparison to a positive control which was chloramphenicol, and to a negative control: sodium phosphate buffer in Petri plates [6].

The minimum inhibitory concentration (MIC) of the peptide was determined by liquid growth inhibition assay in a microtiter plate assay system [11]. MIC is the lowest concentration of the peptide that completely inhibited the strain growth after 24 h of incubation. The mode of action of the peptide was also determined. One hundred microliters of cell suspension were distributed in a microtiter plate well and 100 μl of the peptide were added. Cells were enumerated on nutrient agar medium before and after 24 h of incubation at 30 or 37 °C.

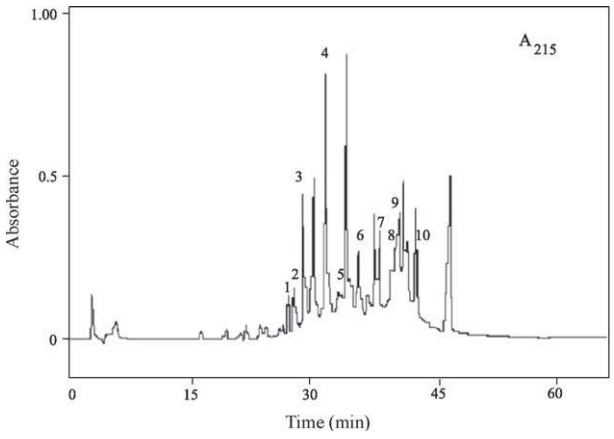


Fig. 1 – HPLC chromatogram of the denatured hemoglobin hydrolysate. Peptic hydrolysis of hemoglobin was followed at 3% of corrected degree of hydrolysis and at 23 °C in 0.1 M sodium acetate buffer at pH 4.5. This hydrolysate was analyzed by RP-HPLC on a C_4 column (250 mm × 10 mm). The mobile phase was water/trifluoroacetic acid (1000:1, v/v) as eluent A and acetonitrile/water/trifluoroacetic acid (600:400:1, v/v) as eluent B. The flow rate was 5 ml/min. The gradient applied was 0–67% (v/v) B over 30 min then 67–87% (v/v) B over 35 min.

3. Results

3.1. *Purification of the antibacterial fractions by HPLC*

Previously [6], the peptic hydrolysis of hemoglobin was followed by different degrees of hydrolysis and we showed

Table 1 – The active fractions against these bacterial species were analyzed by ESI/MS and ESI/MS/MS

Fractions	Mass $(M+H)^+$ (Da)	Peptides
1	796	β 140–145
	451	β 81–84
	909	α 99–106
2	2728	α 1–28
	2657	α 1–27
	1305	β 91–101
	1746	α 84–98
3	2841	α 1–29
	1650	α 109–124
	1650	α 110–125
	1240	α 36–45
	1240	α 37–46
	1380	β 1–13
4	1812	β 14–30
	3258	α 1–32
	2038	α 110–128
5	4292	β 44–83
	4292	β 45–84
	3488	α 34–66
6	4802	β 40–83
	4802	β 41–84
	3540	α 67–98
	3635	α 33–66
	1734	α 33–46
	1587	α 33–45
	1587	α 34–46
7	2753	β 121–145
	2196	β 126–145
	3177	β 1–30
8	6086	β 31–84
	5274	α 34–83
	6655	α 36–97
	6655	α 37–98
	5435	α 47–98
9	1820	β 31–44
	2838	α 107–133
	7151	α 33–98
	5422	α 33–83
	7004	α 33–97
	7004	α 34–98
10	3788	α 107–141
	3556	β 114–145
	2104	β 31–47

The measurements were performed in positive ion mode.

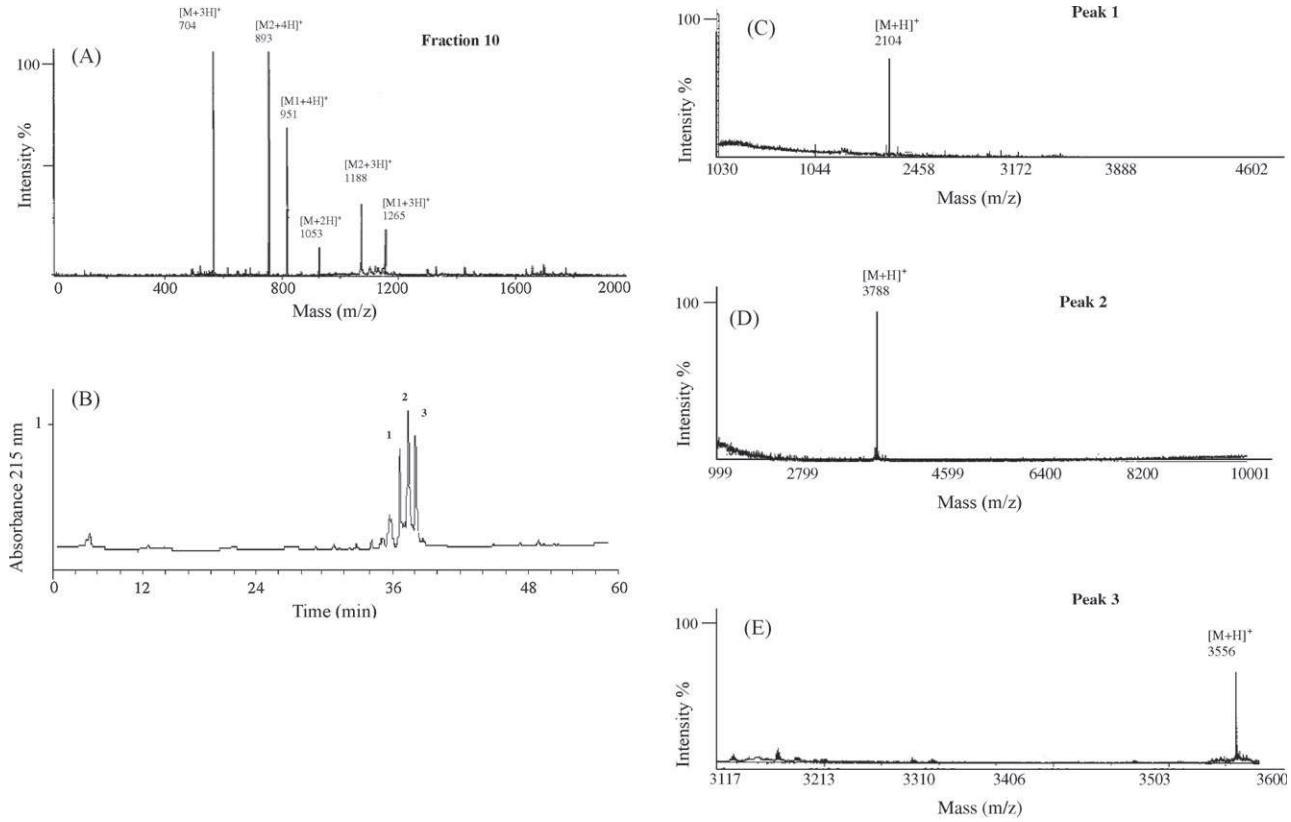


Fig. 2 – Purification and identification of fraction 10 by HPLC and MS. (A): MS of fraction 10, (B): HPLC chromatogram of fraction 10, (C): MS of peak 1 (β 31–47), (D): MS of peak 2 (α 107–141) and (E): MS of peak 3 (β 114–145).

that for 3% degree of hydrolysis, a maximum of intermediate peptides of medium size were obtained. As numerous antibacterial peptides were composed of a large amino acid sequence [11], a peptic hydrolysis of hemoglobin was therefore performed at this degree of hydrolysis. Recently [24], this hemoglobin hydrolysate was separated by a semi-preparative reversed-phase HPLC and 26 peptide fractions were used for researching antibacterial activities towards *M. luteus* A270, *L. innocua*, *E. coli* and *S. enteritidis*.

The active fractions against these bacterial species were analyzed by ESI/MS and ESI/MS/MS, in order to characterize the peptides in these fractions. Some fractions contained only one peptide and were then pure. It is the case of the α 1–23 [11], α 107–136 [6], α 107–141, α 137–141, α 133–141, and β 126–145 [24].

Other active fractions contained several peptides. These fractions are numbered from 1 to 10 in Fig. 1. These fractions were analyzed by ESI/MS and ESI/MS/MS, in order to characterize the peptides in these fractions (Table 1). Each of the 10 fractions contained at least three peptides and some fractions contained five peptides. All these fractions were purified several times by HPLC to obtain pure peptides. As example, Fig. 2 presents the MS and the HPLC chromatogram of fraction 10. This fraction contained three peptides of different mass (3787, 3555 and 2103). The purification of this fraction showed three well-separated peptides and the mass of each fraction was determined. The same procedure was used with the nine other fractions. Forty-three purified peptides were obtained and enough peptide was purified in order to check the antibacterial activity.

3.2. *Obtaining antibacterial peptides*

The antibacterial activity of each pure peptide was tested towards *M. luteus* A270, *L. innocua*, *E. coli* and *S. enteritidis*. The antibacterial activity of each peptide was carried out according to the double-layer technique of Parish et al., described in Section 2 [26]. After 24 h incubation of the bacterial strains with the peptide at 37 °C, the antimicrobial activity of the peptide was detected by the appearance of a zone of growth inhibition around the well containing the strain and the peptide. The validation of the test was made by a high number of tests carried out and by the use of blanks: an antibiotic, tetracycline at a concentration of 0.1 mg/ml and the sodium phosphate buffer 10 mM pH 7.5.

Thirty peptides showed an antibacterial activity against these bacterial species (Table 2). Among these peptides, two active peptides (β 126–145 and α 107–141) were already published [24].

Fraction 1 contains two active peptides: β 140–145 and α 99–106. Fraction 2 contains three active peptides: α 1–28, α 1–27 and α 84–98. Four antibacterial peptides α 1–29, α 36–45, α 37–46 and β 1–13 were obtained in fraction 3. Only one active peptide was obtained starting from fractions 4 and 5. These peptides are, respectively α 1–32 and α 34–66. Four peptides present an antibacterial activity in the fraction 6: α 33–66, α 33–46, α 33–45

and α 34–46. Three active peptides were obtained in fractions 7 and 8: β 121–145, β 126–145 [24] and β 1–30 from the fraction 7 and α 34–83, α 36–97 and α 37–98 from the fraction 8. β 1–30 was already reported as a peptide solubilizator of the hem [18]. Fraction 9 contains five antibacterial peptides: α 107–133, α 33–98, α 33–83, α 33–97 and α 34–98. Two active peptides were obtained from fraction 10: α 107–141 [24], and β 114–145.

3.3. *Determination of minimum inhibitory concentration of antibacterial peptides*

The MIC of all peptides (except for two peptides α 99–106 and α 84–98 where their quantity is low) was determined on *M. luteus* A270, *L. innocua*, *E. coli* and *S. enteritidis* (Table 3).

According to the obtained values of MIC, the peptides can be classified into two groups C_1 and C_2. Peptides of group C_2 present lower MIC than peptides of group C_1 (MIC values of group $C_2 < 20$ μM). Therefore, there are 19 peptides that belong to the group C_1 and 11 peptides that belong to the group C_2.

With all the peptides, at a concentration corresponding to the MIC, and any bacterial species, cell population decreased by at least 97% after 24 h incubation.

4. Discussion

Hydrolysis of bovine hemoglobin by pepsin allowed obtaining 30 antibacterial peptides. Twenty-four active peptides were located on the α chains of hemoglobin (Fig. 3) and six antibacterial peptides were located on the β chain of hemoglobin (Fig. 4). These active peptides can be classified into three families in the α chains of hemoglobin (α_1, α_2 and α_3) and into two families in the β chains (β_1 and β_2). Family α_1 derived from peptide α 1–32, family α_2 derived from peptide α 33–98 and family α_3 derived from peptide α 107–141. Families β_1 and β_2 are derived from peptides β 1–30 and β 114–145, respectively.

Different mathematical models from the Network protein sequence analysis Internet server of the pole bio-informatique lyonnais (http://pbil.ibcp.fr) were used to study these pure antibacterial peptides structural characteristics.

Table 4 presents the structural properties of the 30 antibacterial peptides. All active peptides have a positive charge at pH 7 and can be classified into two groups S_1 and S_2 in regard to these structure whatever the chains of bovine hemoglobin. The first group S_1 has some characteristics of the reported antibacterial peptides [6,30]. These peptides contain over a score of amino acid residues with an overall positive charge, a substantial portion of hydrophobic residues and a high percentage of α-helical structure.

The second group S_2 is different. The peptides are small (<15 amino acids), positively charged, with no or small portion of hydrophobic residues, and do not present a secondary structure (random coil structure). Proposing secondary structure for peptides smaller than 15 residues is highly controversial but it can be supposed that positively charged antibacterial peptides with a random coil structure in aqueous solution could be structured in contact with biological membrane [5,25]. This group has probably a mechanism of action different from that generally described for antibacterial peptides: adsorption by electrostatic interaction on the membrane and by the hydrophobic part, insertion of the structured peptide in the membrane which involves pores formation.

By comparing Tables 3 and 4, we can see that the most active peptides (group C_2) in Table 3 are the same peptides than peptides of the group S_2 in Table 4. Then, two groups of antibacterial peptides can be established in regard to their activity (MIC) and their structure (α-helix or random coil): C_1S_1 and C_2S_2.

Table 2 – Antibacterial activity of all peptide fractions obtained from the total hemoglobin hydrolysate

Peptides	Bacteria strains			
	Salmonella enteritidis	*Escherichia coli*	*Listeria innocua*	*Micrococcus luteus*
β 140–145	+	+	+	+
β 81–84	–	–	–	–
α 99–106	+	+	+	+
α 1–28	+	+	+	+
α 1–27	+	+	+	+
β 91–101	–	–	–	–
α 84–98	+	+	+	+
α 1–29	+	+	+	+
α 109–124	–	–	–	–
α 110–125	–	–	–	–
α 36–45	+	+	+	+
α 37–46	+	+	+	+
β 1–13	+	+	+	+
β 14–30	–	–	–	–
α 1–32	+	+	+	+
α 110–128	–	–	–	–
β 44–83	–	–	–	–
β 45–84	–	–	–	–
α 34–66	+	+	+	+
β 40–83	–	–	–	–
β 41–84	–	–	–	–
α 67–98	–	–	–	–
α 33–66	+	+	+	+
α 33–46	+	+	+	+
α 33–45	+	+	+	+
α 34–46	+	+	+	+
β 121–145	+	+	+	+
β 126–145	+	+	+	+
β 1–30	+	+	+	+
β 31–84	–	–	–	–
α 34–83	+	+	+	+
α 36–97	+	+	+	+
α 37–98	+	+	+	+
α 47–98	–	–	–	–
β 31–44	–	–	–	–
α 107–133	+	+	+	+
α 33–98	+	+	+	+
α 33–83	+	+	+	+
α 33–97	+	+	+	+
α 34–98	+	+	+	+
α 107–141	+	+	+	+
β 114–145	+	+	+	+
β 31–47	–	–	–	–

Table 3 – MIC values (μM) of the pure antibacterial peptides

Peptides	Groups	MIC (μM)			
		Salmonella enteritidis	*Escherichia coli*	*Listeria innocua*	*Micrococcus luteus*
α 1–32	C_1	38	154	38	90
α 1–29	C_1	27	54	27	54
α 1–28	C_1	27	54	27	54
α 1–27	C_1	38	54	27	38
α 1–23	C_1	27	54	54	100
α 33–98	C_1	90	90	49	90
α 33–97	C_1	90	90	49	90
α 34–98	C_1	90	90	49	90
α 36–97	C_1	87	87	49	49
α 37–98	C_1	87	87	49	49
α 33–83	C_1	45	80	80	45
α 34–83	C_1	45	80	80	45
α 33–66	C_2	5	1	1	9
α 34–66	C_2	5	9	1	5
α 33–46	C_2	9	9	1	5
α 33–45	C_2	5	9	1	5
α34–46	C_2	5	9	1	5
α 36–45	C_2	9	9	1	1
α37–46	C_2	9	9	1	1
α 107–141	C_1	87	87	43	87
α 107–136	C_1	76	76	38	76
α 107–133	C_1	37	73	37	9
α 133–141	C_2	8	8	2	15
α 137–141	C_2	5	9	1	9
β 114–145	C_1	73	73	85	85
β 121–145	C_1	73	73	73	85
β 126–145	C_1	35	71	71	71
β 140–145	C_2	9	2	10	9
β 1–30	C_1	45	45	45	45
β 1–13	C_2	6	4	6	4

The minimum inhibitory concentration (MIC) of the peptide was determined in a microtiter plate assay system after 24 h incubation at 30 or 37 °C.

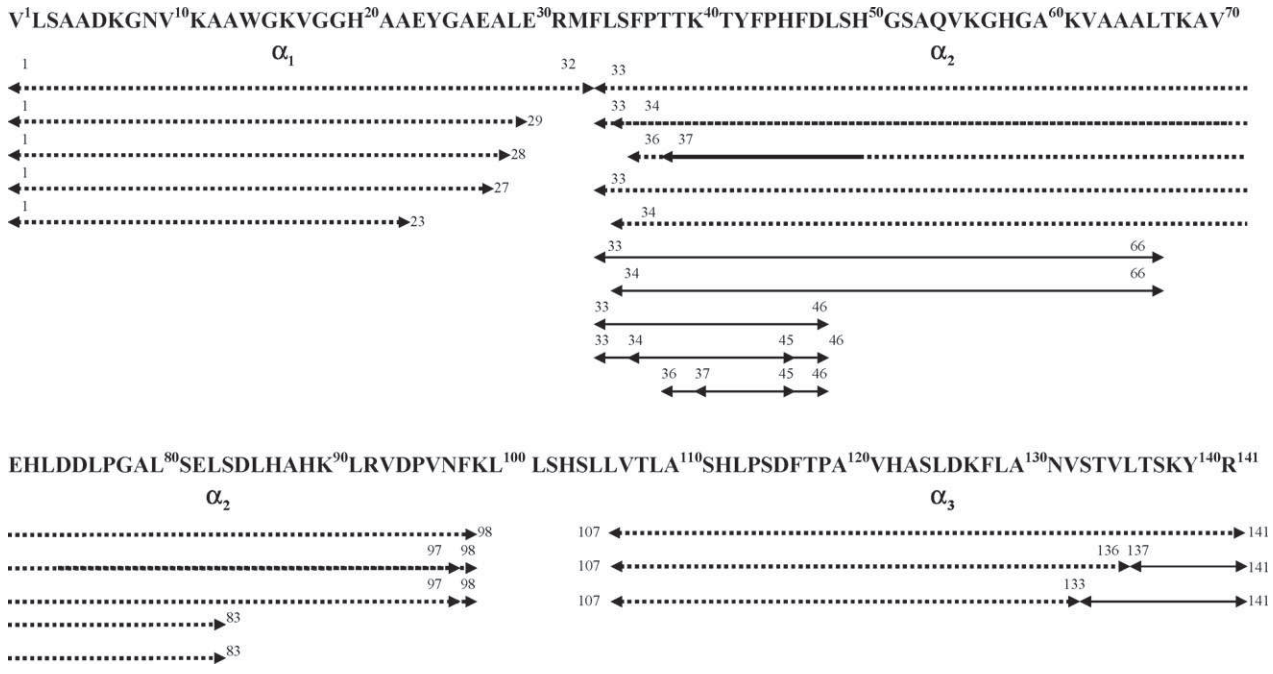


Fig. 3 – Identification of the active peptides on the α chain of bovine hemoglobin. (◂····▸): antibacterial peptide groups S_1 and C_1. (◂——▸): antibacterial peptide groups S_2 and C_2.

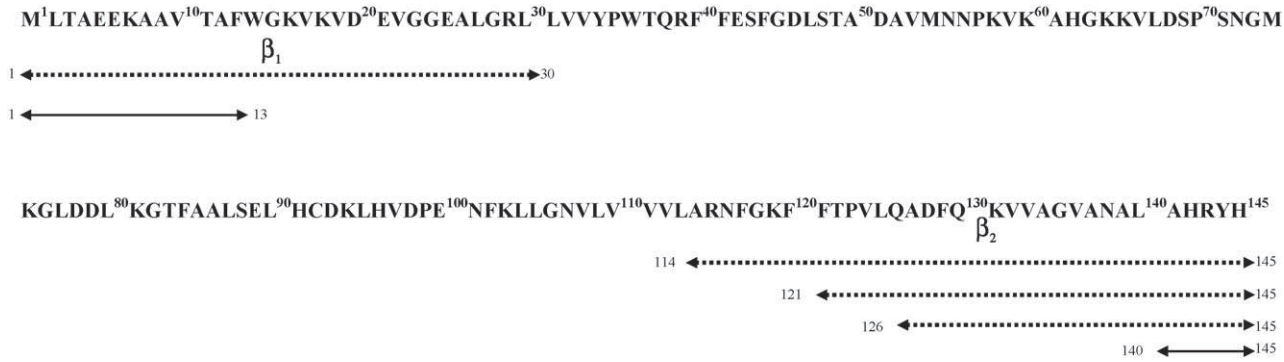


Fig. 4 – Identification of the active peptides on the β chain of bovine hemoglobin. (◂····▸): antibacterial peptides group S_1 and C_{1v}. (◂——▸): antibacterial peptides group S_2 and C_2.

Table 4 – Structural characteristics of the pure antibacterial peptides

Peptides	Mass (Da)	Number of amino acids	Percentage of hydrophobic residues (%)	Charge at pH 7	Prediction of secondary structure	Groups
α 1–32	3257	32	46	+1	58% α helix	S_1
α 1–29	2840	29	48	+1	58% α helix	S_1
α 1–28	2727	28	46	+1	50% α helix	S_1
α 1–27	2656	27	44	+1	50% α helix	S_1
α 1–23	2236	23	47	+2	47% α helix	S_1
α 33–98	7150	66	40	+4	50% α helix	S_1
α 33–97	7003	65	38	+4	49% α helix	S_1
α 34–98	7003	65	38	+4	49% α helix	S_1
α 36–97	6654	62	37	+4	52% α helix	S_1
α 37–98	6654	62	37	+4	52% α helix	S_1
α 33–83	5421	51	40	+3	49% α helix	S_1
α 34–83	5273	50	38	+3	50% α helix	S_1
α 33–66	3634	34	41	+5	63% random coil	S_2
α 34–66	3487	33	39	+5	61% random coil	S_2
α 33–46	1733	14	35	+2	72%random coil	S_2
α 33–45	1586	13	30	+2	74% random coil	S_2
α 34–46	1586	13	30	+2	74% random coil	S_2
α 36–45	1239	10	20	+2	75% random coil	S_2
α 37–46	1239	10	20	+2	75% random coil	S_2
α 107–141	3787	35	42	+3	47% α helix	S_1
α 107–136	3151	30	50	+1	54% α helix	S_1
α 107–133	2839	27	40	+3	48% α helix	S_1
α 133–141	1054	9	22	+2	59% random coil	S_2
α 137–141	654	5	0	+2	93% random coil	S_2
β 114–145	3555	32	50	+5	72% α helix	S_1
β 121–145	2752	25	52	+3	79% α helix	S_1
β 126–145	2195	20	50	+3	70% α helix	S_1
β 140–145	768	6	33	+3	33% random coil	S_2
β 1–30	3177	30	47	+4	42% α helix	S_1
β 1–13	1380	13	54	+1	15% random coil	S_2

The structural characteristics were obtained from the Network protein sequence analysis Internet server of the pole bio-informatique lyonnais (http://pbil.ibcp.fr).

Surprisingly, these results show that the most active peptides are also the shortest ones and do not have the classical characteristics of the antibacterial peptides. Perhaps these peptides act by a mechanism closer to the antibacterial activity of parabens than the activity of amphipathic peptides by involving their terminal tyrosyl group [6].

5. Conclusion

Peptic digestion of bovine hemoglobin at low degree allowed obtaining 30 antibacterial peptides. Twenty-four active peptides were located in the α chains and were classified into

three families. Six active peptides were located in the β chains and were classified into two families. These active peptides can be classified into two distinct groups in regard of their activity and their structure. Most of these antibacterial peptides were intermediate peptides and were generally isolated from a very complex peptidic hydrolysate which contains more than 100 peptides. Some of these peptides have no hemolytic activity [6,11,24], but toxicity control experiments have to be performed. Thus, if they are not toxic, so many antibacterial peptides, derived from bovine hemoglobin, would be interesting as preservatives for storage and distribution of meat-based products. This is in accordance with the current context of food safety and food protection by means of natural products.

Acknowledgement

The authors thank Christine Vanuxem from University of Lille I for assisting in the review of this manuscript. This work was supported by FEDER (Fonds Europeen de DEveloppement Regional).

REFERENCES

[1] Adler-Nissen J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysats by tribenzenesulfonic acid. J Agric Food Chem 1979;27:1256–62.
[2] Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Kawase K, Shimamura S, Tomita M. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. Biochim Biophys 1992;1121:130–6.
[3] Cempel N, Aubry JM, Piot JM, Guillochon D. Isolation from bovine haemoglobin of a peptid that might be used as a potential hydrophobic photosensitizer carrier. Biotechnol Appl Biochem 1995;21:287–94.
[4] Csordas A, Michl H. Isolation and structure of a haemolytic polypeptide from the defensive secretion of European Bombina species. Monatsh Chem 1970;101:182–9.
[5] Corbier C, Krier F, Mulliert G, Vitoux B, Revol-Junelles AM. Biological activities and structural properties of the atypical bacteriocins Mesenterocin 52B and Leucocin B-TA33a. Appl Environ Microbiol 2001;67:1418–22.
[6] Daoud R, Dubois V, Bors-Dodita L, Nedjar-Arroume N, Krier F, Chihib N-E, et al. New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin. Peptides 2005;26:713–9.
[7] Devine DA. Antimicrobial peptides in defence of the oral and respiratory tracts. Mol Immunol 2003;40:431–43.
[8] Erchegyi J, Kastin AJ, Zadina JE, Qiu XD. Isolation of a heptapeptide Val–Val–Tyr–Pro–Trp–Thr–Gln (valorphin) with some opiate activity. Int J Pept Protein Res 1992;39:477–84.
[9] Fernandez de Caleya R, Gonzalez-Pascual B, Garcia-Olmedo F, Carbonero P. Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins in vitro. Appl Microbiol 1972;23: 998–1000.
[10] Fogaça AC, Da Silva PI, Teresa JrM, Miranda M, Bianchi AG, Miranda A, et al. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. J Biol Chem 1999;274:25330–4.
[11] Froidevaux R, Krier F, Nedjar-Arroume N, Vercaigne-Marko D, Kosciarz E, Ruckebusch C, et al. Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. FEBS Lett 2001;491:159–63.
[12] Habermann E. Bee and wasp venoms. Science 1972;177: 314–22.
[13] Hancock REW, Chapple DS. Peptide antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1317–23.
[14] Ibrahim HR, Iwamori E, Sugimoto Y, Aoki T. Identification of a distinct antibacterial domain within the N-lobe of ovotransferrin. Biochim Biophys Acta 1998;1401:289–303.
[15] Ibrahim HR, Thomas U, Pellegrini A. A helix–loop–helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action. J Biol Chem 2001;276:43767–74.
[16] Izadpanah A, Gallo RL. Antimicrobial peptides. J Am Acad Dermatol 2005;52:381–90.
[17] Lahov E, Regelson W. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. Food Chem Toxicol 1996;34:131–45.
[18] Lebrun F, Bazus A, Dhulster P, Guillochon D. Solubility of heme in heme-iron enriched bovine haemoglobin hydrolysates. J Agric Food Chem 1998;46:5017–25.
[19] Levy O. Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes. J Leukoc Biol 2004;76:909–25.
[20] Liepke C, Zucht HD, Forssmann WG, Stanoker L. Purification of novel peptide antibiotics from human milk. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2001;752:369–77.
[21] Lignot B, Froidevaux R, Nedjar-Arroume N, Guillochon D. Solvent effect on kinetics of appearance of neokyotorphin VVh4 and a bradykinin-potentiating peptide in the course of peptic hydrolysis of bovine haemoglobin. Biotechnol Appl Biochem 1999;30:201–7.
[22] Malkoski M, Dashper SG, O'Brien-Simpson NM, Talbo GH, Macris M, Cross KJ, et al. Kappacin a novel antibacterial peptide from bovine milk. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:2309–15.
[23] Marshall SH, Arenas G. Antimicrobial peptides: a natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. Electron J Biotechnol 2003;6: 271–84.
[24] Nedjar-Arroume N, Dubois-Delval V, Miloudi K, Daoud R, Krier F, Kouach M, et al. Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. Peptides 2006;27:2082–9.
[25] Nicolas P, Mor A. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. Annu Rev Microbiol 1995;49:277–304.
[26] Parish CA, Jiang H, Tokiwa Y, Berova N, Nakanishi K, McCabe D, et al. Broad-spectrum antimicrobial activity of hemoglobin. Bioorg Med Chem 2001;9:377–82.
[27] Pellegrini A, Thomas U, Bramaz N, Hunziker P, Von Fellenberg R. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine α lactalbumin molecule. Biochim Biophys Acta 1999;1426:439–48.
[28] Pellegrini A, Dettling C, Thomas U, Hunziker P. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine α-lactoglobulin. Biochim Biophys Acta 2001;1526:131–40.
[29] Piot JM, Zhao QY, Guillochon D, Ricart G, Thomas D. Isolation and characterisation of two opioid peptides from a bovine hemoglobin peptic hydrolysate. Biochem Biophys Res Commun 1992;189:101–10.
[30] Powers JPS, Hancock REW. The relationship between peptide structure and bacterial activity. Peptides 2003;24:1681–91.
[31] Recio I, Visser S. Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine α_{S2}-casein. Biochim Biophys Acta 1999;1428:314–26.
[32] Tomita M, Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K. Potent antibacterial peptides

generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. J Dairy Sci 1991;74:4137–42.
[33] Ueki N, Someya K, Matsuo Y, Wakamatsu K, Mukai H. Cryptides: functional cryptic peptides hidden in protein structures. Biopolymers 2007;88:190–8.
[34] Zhao QY, Piot JM, Gautier V, Cottenceau G. Peptic peptide mapping by HPLC, on line with photodiode array detection, of a haemoglobin hydrolysate produced at pilot-plant scale from an ultrafiltration process. Appl Microbiol Biotechnol 1996;45:778–84.
[35] Zucht H-D, Raida M, Adermann K, Mägert H-J, Forssmann W-G. Casocidin-I: a casein-α_{S2} derived peptide exhibits antibacterial activity. FEBS Lett 1995;372:185–8.

ANNEXE 3

Eur Food Res Technol (2010) 231:127–135
DOI 10.1007/s00217-010-1260-4

ORIGINAL PAPER

Evaluation of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates generated by gastrointestinal proteases: identification of the most potent active peptide

Ali Bougatef · Rafik Balti · Naïma Nedjar-Arroume · Rozenn Ravallec · Estelle Yaba Adjé · Nabil Souissi · Imen Lassoued · Didier Guillochon · Moncef Nasri

Received: 27 January 2010 / Revised: 18 February 2010 / Accepted: 27 February 2010 / Published online: 18 March 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract In this study, smooth hound protein hydrolysates (SHPHs), obtained by treatment with various gastrointestinal proteases, were analyzed for their angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities. Protein hydrolysates were obtained by treatment with crude alkaline enzyme extract, low molecular weight (LMW) alkaline protease, trypsin-like protease and pepsin from *Mustelus mustelus*, and bovine trypsin. All hydrolysates exhibited inhibitory activity toward ACE. Hydrolysate generated with alkaline protease extract displayed the highest ACE inhibitory activity, and the higher inhibition activity (82.6% at 2 mg/mL) was obtained with a hydrolysis degree of 18.8%. This hydrolysate was then fractionated by size exclusion chromatography on a Sephadex G-25 into five major fractions (P_1–P_5). ACE inhibitory activities of all fractions were assayed, and P_3 was found to display a high ACE inhibitory activity (62.24% at 1 mg/mL). P_3 was then fractionated by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and ten fractions of ACE inhibitors were found (F_1–F_{10}). Sub-fraction F_3 showed the strongest ACE inhibitory activity, being able to suppress more than 60% of initial enzyme activity at a concentration of 100 μg/mL. The amino acid sequence of peptide F_3 was determined by ESI/MS and ESI–MS/MS as Ala-Gly-Ser, and the IC_{50} value for ACE inhibitory activity was 0.13 ± 0.03 mg/mL. Further, purified peptide F_3 maintained inhibitory activity even after in vitro digestion with gastrointestinal proteases in order to demonstrate gastrointestinal stability digestion to enable oral application. These results indicate that smooth hound protein hydrolysate possesses potent antihypertensive activity.

Keywords Smooth hound muscle · *M. mustelus* · Intestine crude extract · Enzymatic treatment · ACE inhibitory activities · Protein hydrolysates

Abbreviations

SHPH	Smooth hound protein hydrolysate
ACE	Angiotensin-converting enzyme
LMW	Low molecular weight
DH	Degree of hydrolysis

Introduction

High blood pressure has been considered a risk factor for developing cardiovascular diseases (arteriosclerosis, stroke and myocardial infarction) and end-stage renal disease [1]. Angiotensin I-converting enzyme (ACE, dipeptidyl carboxy peptidase, EC 3.4.15.1) plays an important physiological role in the regulation of blood pressure by virtue of the rennin angiotensin system [2, 3]. It is a multifunctional zinc-containing enzyme, located in different tissues. ACE converts the inactive decapeptide, angiotensin I to the potent vasopressor octapeptide, angiotensin II and inactivates bradykinin [2].

Inhibition of ACE is considered to be a useful therapeutic approach in the treatment of high blood pressure.

A. Bougatef (✉) · R. Balti · N. Souissi · I. Lassoued · M. Nasri
Laboratoire de Génie Enzymatique et de Microbiologie,
Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, BP "1173",
3038 Sfax, Tunisia
e-mail: ali.bougatef79@gmail.com

N. Nedjar-Arroume · R. Ravallec · E. Y. Adjé · D. Guillochon
Laboratoire de Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien, IUT A Lille I, BP 179,
59653 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Several effective oral ACE inhibitors have been developed, namely, captopril, enalapril, and lisinopril and all are currently used as clinical antihypertensive drugs [4]. Although synthetic ACE inhibitors are effective as antihypertensive drugs, they cause adverse side effects such as coughing, allergic reactions, taste disturbances, and skin rashes. Therefore, research and development to find safer, innovative, and economical ACE inhibitors is necessary for the prevention and remedy for hypertension.

Structure–activity correlation among different peptide inhibitors of ACE indicates that binding to ACE is strongly influenced by the C-terminal tripeptide sequence of the substrate. ACE appears to prefer substrates or competitive inhibitors that mainly have hydrophobic (aromatic or branched side chains) amino acid residues at the three C-terminal positions. ACE inhibition studies with Trp, Tyr, Phe, or Pro residues were most effective in enhancing substrate binding [5]. Nevertheless, the structure–activity relationship of ACE inhibitory peptides has not yet been established, and very different hypotensive sequences have been derived from a large number of food proteins [6]. It is postulated that the mechanism of ACE inhibition involves inhibitor interaction with an anionic binding site that is distinct from the catalytic site.

Since the discovery of ACE inhibitors in snake venom [7], several reports have been published on the ACE inhibitory activity of peptides from food proteins, like casein [8], rapeseed [9], mushroom [10], whey protein [11], porcine muscle [12], bovine skin gelatin [13], soybean [14], sake and sake lees [15], and fish proteins [16, 17].

Proteases such as pepsin, chymotrypsin, and trypsin are frequently used in hydrolysis to produce ACE inhibitory peptides [18–20]. Microbial alkaline proteases are also utilized in the production of ACE inhibitors from food proteins such as sardine (*Sardina pilchardus*) [21] and rapeseed [9]. However, there are a small number of reports on the use of digestive enzymes from fish in the producing bioactive peptides [22, 23].

The smooth hound *Mustelus mustelus* is the most abundant hound shark in the Mediterranean Sea. It is found in the eastern Atlantic from the British Isles to South Africa, including the Mediterranean Sea. This species is found throughout the Tunisian coasts, including Sfax. Smooth hound is relatively important in the fish-catches of Tunisia and is utilized for human consumption. *M. mustelus* is generally available all year long, and the production was about 192 tons in 2007.

In a previous paper, we have shown that digestive proteases from smooth hound were very well suited for the generation of hydrolysates enriched in antioxidative peptides, from muscle protein of the same species [22]. In the present study, we have attempted to isolate and identify inhibitory peptide from smooth hound muscle protein hydrolysate as powerful displaying ACE inhibitory.

Materials and methods

Smooth hound sample preparation

Smooth hound (*M. mustelus*) was purchased from the fish market of Sfax City, Tunisia. Muscle and internal organs (stomach and intestines) were separated, rinsed with cold distilled water, then immediately frozen and stored at −20 °C until used.

Enzymes and chemicals

Angiotensin I-converting enzyme (ACE) from rabbit lung and the ACE synthetic substrate hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL) were purchased from Sigma Chemicals Co (St Louis, MO, USA). Acetonitrile was of HPLC grade. Sephadex G-25 was purchased from Pharmacia (Uppsala, Sweden). Water was obtained from a Culligan system; the resistivity was approximately 18 MΩ. Other chemicals and reagents used were of analytical grade.

The enzymes used for the production of protein hydrolysates were the following: pepsin from *M. mustelus* stomach [24]; low molecular weight (LMW) alkaline protease [25], trypsin-like protease [26] and crude enzyme extract from *M. mustelus* intestines, and bovine trypsin (purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)).

Preparation of crude protease extract from smooth hound intestines

Intestines from *M. mustelus* (150 g) were homogenized for 1 min with 300 mL of extraction buffer (10 mM Tris–HCl, pH 8.0). The homogenate was centrifuged at 8,500 *g* for 30 min at 4 °C. The pellet was discarded and the supernatant was collected and referred to as crude alkaline protease extract (Fig. 1). Alkaline protease activity in the crude extract was measured by the method of Kembhavi et al. [27] using casein as a substrate. One unit of protease activity was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 μg of tyrosine per min under the experimental conditions used. Pepsin, low molecular weight protease, and trypsin-like protease were purified as reported by Bougatef et al. [24–26].

Production of smooth hound muscle protein hydrolysates (SHPHs) using various proteases

The production of protein hydrolysates was carried out as reported by Bougatef et al. [22]. The scheme for the production of protein hydrolysates is given in Fig. 1.

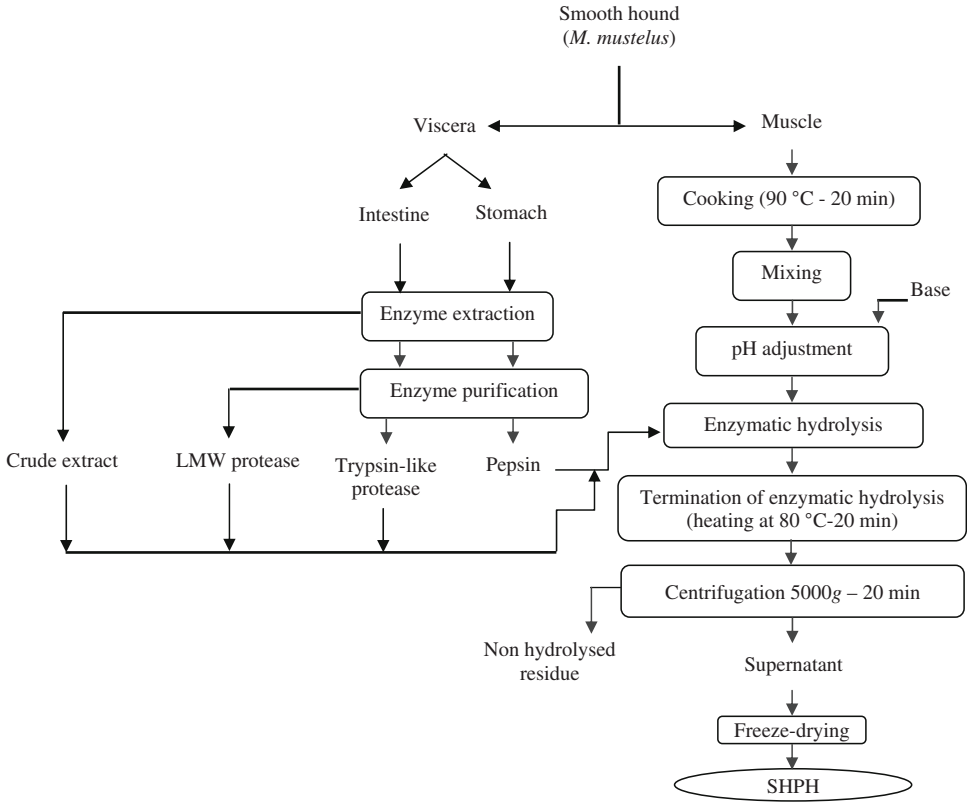


Fig. 1 Flow diagram for the production process of smooth hound protein hydrolysates (SHPHs) by gastrointestinal proteases

The degree of hydrolysis (DH) was determined as reported by Adler-Nilsen [28]. For the hydrolysate produced by pepsin treatment, DH was determined as described by Hoyle and Merritt [29].

Determination of the ACE inhibition activity

The ACE inhibition activity was assayed as reported by Nakamura et al. [30]. For each assay, 80 μL of SHPH at different concentrations was added to 200 μL of 5 mM hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL), and then pre-incubated for 3 min at 37 °C. SHPH and HHL were prepared in 100 mM borate buffer, pH 8.3, containing 300 mM NaCl. The reaction was then initiated by adding 20 μL of 0.1 U/mL ACE from rabbit lung prepared in the same buffer and incubated for 30 min at 37 °C. The enzyme reaction was stopped by the addition of 250 μL of 0.1 M HCl. The released hippuric acid (HA) was quantified by RP-HPLC on a Vydac C_{18} column connected to a system composed of a Waters TM 600 automated gradient controller pump module, a WaterWisp 717 automatic sampling device, and a Waters 996 photodiode array detector. The sample was then eluted using an acetonitrile gradient from 0 to 28% and from 28 to 47% in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) (v/v) for 50 and 20 min, respectively. The elution profile was monitored at 228 nm. Spectral and chromatographic data were stored on a NEC image 446 computer. Millennium software was used to acquire, analyze, and plot chromatographic data. The average value from three determinations at each concentration was used to calculate the ACE inhibition rate as follows:

$$\text{ACE inhibition } (\%) = \left[\frac{B - A}{B - C}\right] \times 100$$

where A is the absorbance of HA generated in the presence of ACE inhibitor component, B is the absorbance of HA generated without ACE inhibitors, and C is the absorbance of HA generated without ACE (corresponding to HHL autolysis in the course of enzymatic assay).

The IC_{50} value was defined as the concentration of hydrolysate (mg/mL) required to reduce the hippuric acid peak by 50% (indicating 50% inhibition of ACE).

Fractionation of SHPH obtained by treatment with crude alkaline proteases by Sephadex G-25 gel filtration

The freeze-dried hydrolysate (1 g), with a DH of 18.8%, was suspended in 20 mL of distilled water, then loaded onto a Sephadex G-25 gel filtration (5 cm × 54 cm), pre-equilibrated and eluted with distilled water. Fractions (5 mL each) were collected at a flow rate of 60 mL/h, and the absorbance was measured at 226 nm. Fractions

associated with each peak showing ACE inhibitory activity were pooled and freeze-dried.

Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC)

The fraction P3 from Sephadex G-25, which exhibited the highest ACE inhibitory activity, was further separated by RP-HPLC on a Vydac C_{18} column (10 mm × 250 mm) (Grace-Vydac, USA). The liquid chromatographic system consisted of a Waters 600E automated gradient controller pump module, a Waters Wisp 717 automatic sampling device, and a Waters 996 photodiode array detector. Spectral and chromatographic data were stored on a NEC image 466 computer. Millennium software was used to plot, acquire, and analyze chromatographic data. The mobile phase was water/trifluoroacetic acid (1000:1, v/v) as eluent A and acetonitrile/trifluoroacetic acid (1000:1, v/v) as eluent B. Samples were filtered through 0.22 μm filters, and then applied on the C_{18} column and eluted by eluent A for 15 min then with a linear gradient of acetonitrile in 45 min. The flow rate was 1 mL/min. Online UV absorbance scans were performed between 200 and 300 nm at a rate of one spectrum per second with a resolution of 1.2 nm. Chromatographic analyses were completed with Millennium software.

Mass spectrometry analysis

MS and MS/MS measurements were performed in positive ion mode using Electrospray ionization (ESI) and ESI/MS/MS, respectively. ESI mass spectrometry was performed using a triple quadrupole instrument Applied Biosystems API 3000 (PE Sciex, Toronto, Canada). The system is controlled by the Analyst Software 1.4, allowing the control of the spectrometer, the analysis and the processing data. Interpretations of spectra MS–MS were made with the Bioanalyst software. The freeze-dried samples were dissolved in a solvent acetonitrile/water (20/80 v/v) containing formic acid 0.1% for the positive mode. The solution was injected (nebulized) uninterrupted, using a pump (Model 22, Harward Apparatus, South Natick, USA) with a flow rate of 5 μL/min. The potential of ionization was of 5,000 V in positive mode. At the time of the recording of the spectrum, 30 scans on average were added (MCA mode) for each spectrum. The gases used (nitrogen and air) were pure (up to 99%) and produced by a compressor Jun-Air 4000-40 M and a nitrogen generator Whatman model 75-72 (Whatman Inc, Haverhill, MA, USA). The polypropylene glycol (PPG) was used for the calibration and the optimization of the machine. The peptide sequence was determined from the CID spectrum of the protonated analyze $[M+H]^+$ by MS/MS experiments.

Digestion stability study

The stability of the ACE inhibitory activity of the purified peptide from fraction F_3 against gastrointestinal proteases was assessed in vitro. Samples (2 mg/mL) were individually incubated with pepsin (pH 2.0), or trypsin (pH 8.0) for 3 h at 37 °C. In successive digestion test, the sample was first incubated with trypsin for 3 h, heat treated for 5 min in boiling water to inactivate the enzyme, and then incubated 3 h at 37 °C with chymotrypsin. The reactions were then heated for 5 min in boiling water to terminate the reactions. The digests were used for measuring the ACE inhibitory activities.

Determination of ACE inhibition pattern

To clarify the inhibitory mechanism of the most potent peptide (Ala-Gly-Ser) on ACE, different concentrations of the ACE inhibitory peptide were added to each reaction mixture according to the method of Wu and Ding [31], with slight modifications. The enzyme activities were measured with different concentrations of the substrate (HHL). ACE inhibitory pattern in the presence of the inhibitor was determined with Lineweaver–Burk plot.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with Statgraphics ver. 5.1, professional edition (Manugistics Corp., USA) using ANOVA analysis. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

Production of SHPH using gastrointestinal proteases

The hydrolysis of proteins, which is measured in terms of degree of hydrolysis (DH), is an important parameter in determining size dependent functional properties of protein hydrolysates preparations [32]. DH affects the size and hence the amino acid composition of the peptides, which can affect the taste of protein hydrolysate by producing bitter peptides at high DH [32]. Change in amino acid composition as affected by DH could also modulate the biological activity of the peptides formed during hydrolysis.

ACE inhibitory peptides can be produced by solvent extraction, enzyme hydrolysis, and microbial fermentation of food proteins. The most common way to produce ACE inhibitory peptides is through enzymatic hydrolysis of food proteins. The specificity of the proteolytic enzyme and process conditions influence the peptide composition of hydrolysates and thus their ACE inhibitory activities [33].

In the present study, intestine crude enzyme extract, LMW alkaline protease, trypsin-like protease and pepsin from smooth hound viscera, and bovine trypsin were used for the production of protein hydrolysates. The crude alkaline protease extract was most efficient, whereas pepsin was least efficient. After 4 h of hydrolysis, the DH reached about 20.3, 15.4, 12.0, 10.1, and 9.2% with crude alkaline protease extract, LMW protease, trypsin-like protease, bovine trypsin, and pepsin, respectively [22].

ACE inhibitory activities of SHPH obtained with various proteases

The hydrolysates obtained after 4-h incubation with gastrointestinal proteases were then assayed for ACE inhibitory activity. All hydrolysates, at 2 mg/mL, showed ACE inhibitory activities at different level (data not shown). The highest ACE inhibitory activity (67.27%) was observed with intestinal crude enzyme hydrolysate followed by LMW protease hydrolysate (52.34%). Pepsin hydrolysate exhibited the lowest ACE inhibitory activity (45.12%).

The IC_{50} values for ACE inhibition of all hydrolysates varied between 0.85 and 3.55 mg/mL (Fig. 2). The IC_{50} value of SHPH (0.85 ± 0.02 mg/mL) obtained with intestinal crude protease extract was lower than those of hydrolysates from oyster, scallop, codfish skin, and herring skin whose presented an IC_{50} greater than 10 mg/mL [34], whereas it is higher than those from bonito ($IC_{50} = 0.029$ mg/mL) [35], salmon ($IC_{50} = 0.038$ mg/mL) [36], and sardine ($IC_{50} = 0.082$ mg/mL) [37]. This can be attributed to the impact of the enzyme's specificity which is a key factor influencing both the characteristics of hydrolysates and the nature and composition of peptides produced. Proteolysis can operate either sequentially, releasing one peptide at a time, or through the formation of intermediates that are further hydrolyzed to smaller peptides as proteolysis progresses, which is often termed "the zipper mechanisms" [38]. Depending on the specificity of the enzyme, environmental conditions, protein source, and the extent of hydrolysis, a wide variety of peptides size will be generated. Resulting protein hydrolysate will possess peculiar properties according to the new peptides generated.

These results indicated that the crude alkaline protease extract from *M. mustelus* intestines would be effective in producing ACE inhibitory peptides.

Effect of the degree of hydrolysis on ACE inhibitory activity

The degree of hydrolysis is a measure of the extent of hydrolysis degradation of a protein, and it is the most widely used indicator for comparison among different

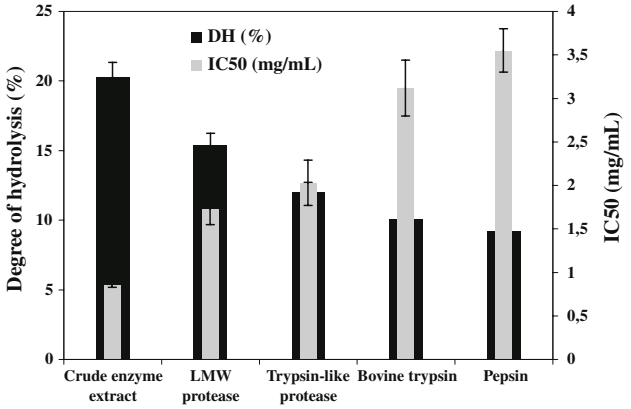


Fig. 2 Degrees of hydrolysis of smooth hound muscle proteins and IC_{50} values of SHPH obtained with various proteases treatment. Reaction conditions are illustrated in Table 1. The reaction conditions were as follows: reaction volume, 500 mL; [substrate], 50% (w/v); pH 8.0; temperature 50 °C; and E/S 0.27% (w/w, protein)

protein hydrolysates. During hydrolysis, a wide variety of larger, medium than smaller peptides are generated, depending on enzyme specificity. In order to study the effect of the DH on the generation of ACE inhibitory activity, smooth hound muscle proteins were hydrolyzed by the crude protease extract from the intestines of *M. mustelus*, and the degree of hydrolysis and the ACE inhibition activity were determined. Figure 3 shows ACE

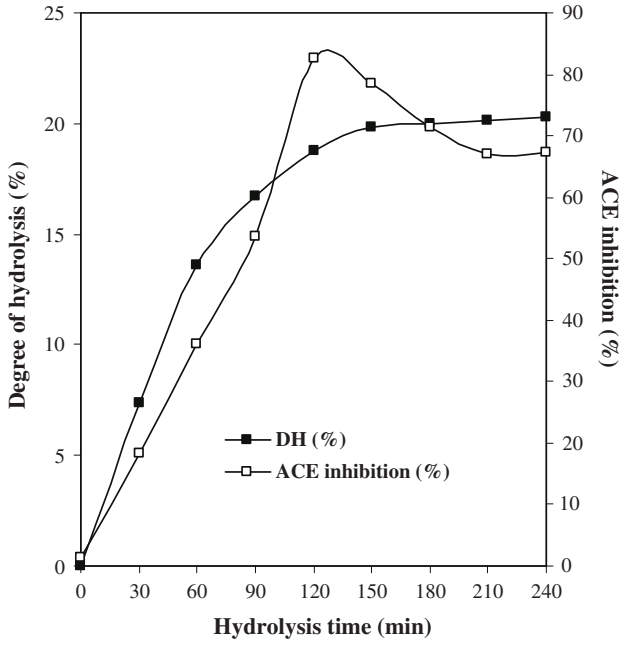


Fig. 3 Generation of ACE inhibitory activity during the enzymatic hydrolysis of smooth hound muscle proteins with crude alkaline protease extract. The reaction conditions were as follows: reaction volume, 500 mL; [substrate], 50% (w/v); pH 8.0; temperature 50 °C; and E/S 0.27% (w/w, protein)

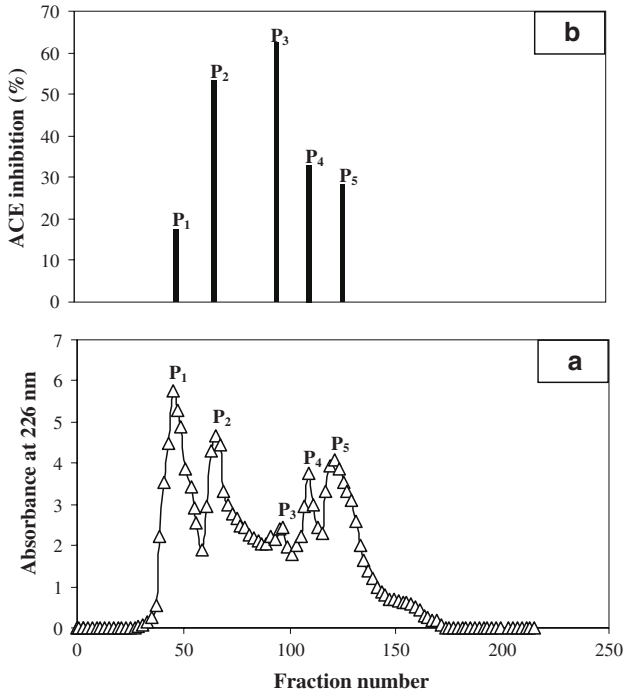


Fig. 4 Elution profile of SHPH obtained with alkaline protease extract separated by size exclusion chromatography on Sephadex G-25 (**a**) and the ACE inhibitory activities of the separated fractions (P_1–P_5) (**b**). The column (5 cm × 54 cm) was equilibrated and eluted with distilled water at a flow rate of 30 mL/h. Values presented are the mean of triplicate analyses

inhibitory activity of released smooth hound peptides along the enzymatic hydrolysis. This profile shows clearly that hydrolysis was necessary in order to release ACE inhibitory peptides. However, undigested smooth hound muscle proteins (DH: 0%) exhibited very low ACE inhibitory activity (about 1.5% at 2 mg/mL). Further, Fig. 3 shows that the ACE inhibitory activity was correlated with the DH of hydrolysis. Higher ACE inhibition ($p < 0.05$) activity (82.6% at 2 mg/mL) was obtained with a DH of 18.8% (after 120 min incubation). Further digestion up to a DH value of 18.8% resulted in a decrease in the ACE inhibitory activity. The obtained results clearly show that hydrolysis was required to release ACE inhibitory peptides from an inactive form within the sequence of smooth hound muscle proteins.

Fractionation of the protein hydrolysate obtained by treatment with alkaline proteases from *M. mustelus* intestines by gel filtration G-25

The hydrolysate, with a DH of 18.8%, obtained by treatment with crude alkaline protease extract, which displayed the highest ACE inhibitory activity, was then fractionated by gel filtration chromatography on a Sephadex G-25 column. Five fractions were separated and designated as

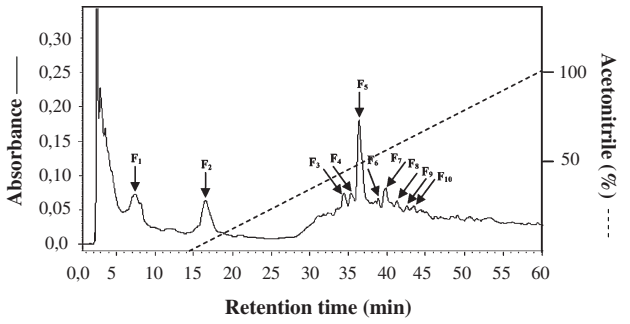


Fig. 5 RP-HPLC elution profile pattern on a Vydac C_{18} column (10 mm × 250 mm) of the fraction P_3

P_1–P_5 (Fig. 4a). Fractions were pooled, freeze-dried, and the inhibition against ACE was determined. All fractions displayed ACE inhibitory activity, as shown in Fig. 4b. Fraction P_3 exhibited the highest level of ACE inhibitory activity (62.24 ± 2.21% at 1 mg/mL) followed by fraction P_2 (53.14 ± 1.82%).

The IC_{50} value of P_3 was determined with logarithmic linearization [39] to be 0.33 mg/mL. These results indicated that ACE inhibitory peptides are present in the SHPH. Compared with several reports on various protein hydrolysates, which showed IC_{50} for ACE inhibitory activities in the range of 0.18–246.70 mg/mL [40, 41], the SHPH had moderate ACE inhibitory activity.

Table 1 Hydrolysis conditions of smooth hound muscle proteins

Enzyme	Source	Optimum conditions	
		Temperature (°C)	pH
Crude enzyme extract	*M. mustelus* intestine	50	8.0
LMW protease	*M. mustelus* intestine	40	8.0
Trypsin-like protease	*M. mustelus* intestine	37	8.0
Pepsin	*M. mustelus* stomach	37	2.0
Bovine trypsin	Bovine pancreas	37	8.0

Table 2 IC_{50} values of fractions from RP-HPLC

Fractions	IC_{50} value (mg/mL)
F1	0.613 ± 0.086
F2	0.754 ± 0.093
F3	0.130 ± 0.030
F4	0.324 ± 0.041
F5	0.257 ± 0.012
F6	0.463 ± 0.022
F7	0.522 ± 0.031
F8	0.613 ± 0.052
F9	0.270 ± 0.061
F10	0.783 ± 0.023

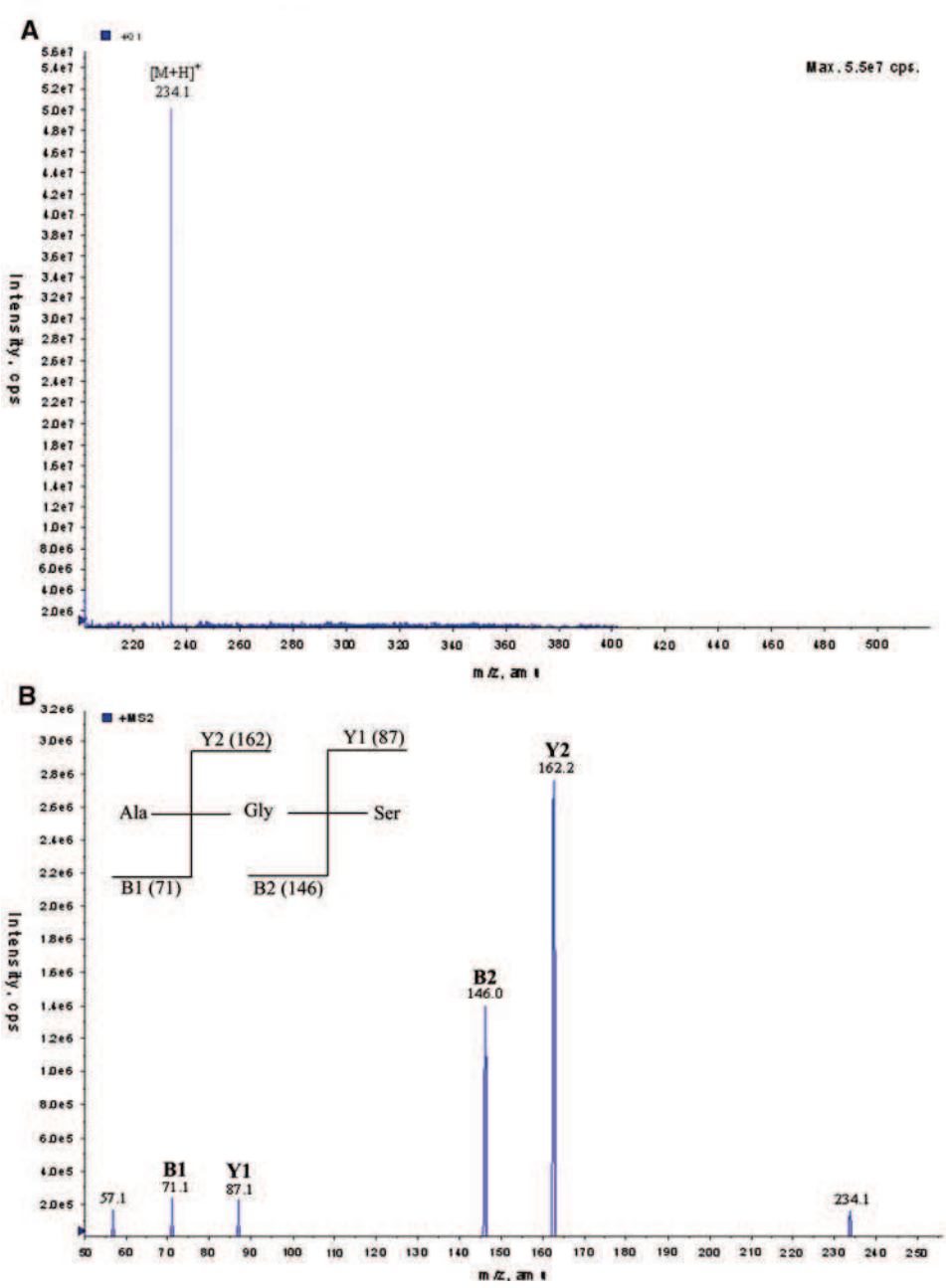


Fig. 6 **a** ESI/MS spectrum of the active fraction F3. The ion at m/z 234 designated as a molecular cation $(M+H)^+$, Ala-Gly-Ser. **b** ESI/MS/MS spectrum of the active fraction F3. CID spectrum of $(M+H)^+$ ion of peptide Ala-Gly-Ser. MS and MS/MS measurements were performed in positive ion mode using Electrospray ionization (ESI) and ESI/MS/MS, respectively

RP-HPLC analysis and identification of F_3 peptide

The active fraction P_3, which displayed the highest level of ACE inhibitory activity, was further purified by RP-HPLC on a C_{18} column using a linear gradient of acetonitrile. As can be seen from the chromatographic profile at 214 nm, given in Fig. 5, at least ten major fractions (F_1–F_{10}) were present in fraction P_3. These fractions were collected, and their ACE inhibitory activities were determined. All fractions showed ACE inhibitory activity, and sub-fraction F_3 possessed the highest activity (more than 60% at 100 μg/mL) (Table 2).

The active fraction F_3 was analyzed by ESI/MS and ESI/MS/MS, in order to characterize the peptide in this fraction (Fig. 6a, b). The Fig. 6a shows that this active fraction contained only one peptide. The accurate relative molecular mass of the peptide of one mass unit for the attached proton is 234 Da. The Fig. 6b shows the CID spectrum of the $(M + H)^+$ ion and displays notation of fragment ions of the peptide according to this CID spectrum. According to the fragmentation of this peptide by ESI/MS/MS (Fig. 6b), we determined the sequence of the peptide as Ala-Gly-Ser. This peptide has not yet been found in other protein hydrolysates with ACE inhibitory activity. The

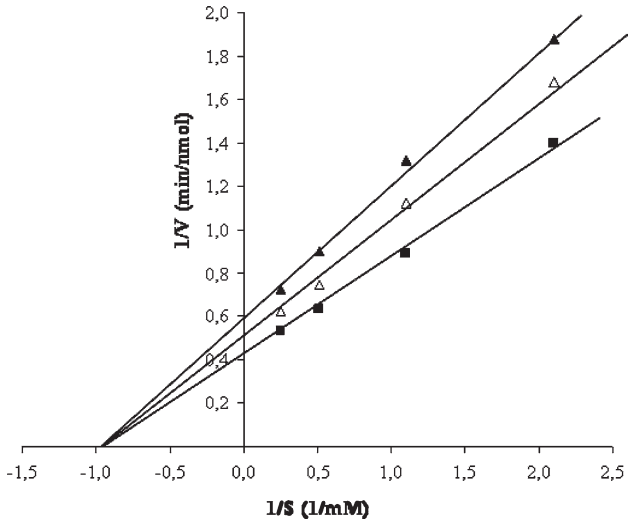


Fig. 7 Lineweaver-Burk plots of the inhibition of ACE by the most potent purified peptide (Ala-Gly-Ser) from smooth hound muscle protein. ACE inhibitory activity was determined in the absence or presence of Ala-Gly-Ser as described in the text using HHL as the enzyme substrate (*filled square*, control; *open triangle*, 100 μM; *filled triangle*, 200 μM). 1/V and 1/S represents the reciprocal of velocity and substrate, respectively. Each point represents the mean value of three experiments

IC_{50} value of the purified peptide was 0.13 ± 0.03 mg/mL (Table 2).

According to previous studies on ACE inhibitory peptides, hydrophobic amino acids in the N-terminal region of the active peptide plays important roles in binding the ACE active site, and leucine and valine residues are the amino acids most frequently observed in other ACE inhibitory peptides [42, 43]. More recently, Wu et al. [44] proposed models for ACE inhibitory peptides through computational analysis of published data. According to their proposal, the most favorable tripeptide sequences consists of hydrophobic amino acid residues at the N-terminus, positively charged amino acids at the middle position, and aromatic amino acids at the C-terminus. The ACE inhibitory peptide identified here, Ala-Gly-Ser, differs from the common structural motif. The peptide had Ala at the N-terminal position, which might contribute to ACE binding. However, it contained Ser, a hydrophilic amino acid, at the C-terminal.

The structure–activity correlations between the various ACE inhibitory peptides remain ambiguous. An increasing number of sequences reported in recent years have revealed a variety of structures with inhibitory activity, and some common structure patterns have evolved. According to previous reports on the structure–activity relationships between different peptide inhibitors of ACE [45], binding to ACE is strongly influenced by the C-terminal amino acid residue. Gobbetti et al. [46] reported that peptides with Trp, Tyr, Phe, Pro, or hydrophobic amino acids at the C-terminal were effective for ACE inhibitory activity. Several identified ACE inhibitory peptides have a proline residue in the C-terminal position, but this is neither sufficient nor essential to confer activity. Further, Cheung et al. [5] indicated that ACE prefers competitive inhibitors that contain hydrophobic amino acid residues such as Pro, Phe, and Tyr at the three positions from the C-terminal.

Digestive stability of the purified peptide

In order to exert an antihypertensive effect in vivo, the ACE inhibitory peptides must be absorbed in their intact form from intestine and further be resistant to plasma peptidases degradation to reach their target sites. To investigate the resistance of the purified peptide against gastrointestinal proteases, the digestion stability was evaluated, by incubating the purified peptide with different proteases and testing the residual ACE inhibitory activity. The ACE inhibitory activity of the peptide was not affected by in vitro incubation with gastrointestinal proteases (data not shown). This result suggests that the purified peptide may be resistant to digestion in the gastrointestinal tract. These findings are in accordance with that reported by Yu et al. [19] showing the stability of globin hydrolysate against gastrointestinal proteases.

Determination of ACE inhibition pattern of Ala-Gy-Ser

The ACE inhibition pattern of the most potent ACE inhibitory peptide, Ala-Gly-Ser, was investigated by Lineweaver–Burk plot (Fig. 7). The kinetic study revealed that ACE inhibitor Ala-Gly-Ser acts as a non-competitive inhibitor. This indicates that the novel peptide cannot bind to catalytic site of ACE and thus could not be hydrolyzed by the enzyme.

Although most of the reported peptides acted as competitive inhibitors for ACE, a few peptides inhibited ACE activity in a non-competitive manner have been reported, including the following: Val-Gly-Cys-Tyr-Gly-Pro-Asn-Arg-Pro-Gln-Phe from algae protein waste [47], Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe from Oyster (*Crassostrea talienwhanensis Crosse*) proteins [48], Phe-Gly-Ala-Ser-Thr-Arg-Gly-Ala from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein [49] and Ile-Phe-Leu and Trp-Leu from fermented soybean food [14]. The inhibition site of the non-competitive inhibitor on ACE was not specified, and the precise inhibition mechanism of ACE inhibitory peptide is also not yet clear.

Conclusion

In this study, hydrolysates from smooth hound muscle protein obtained by treatment with various proteolytic

preparations were analyzed for their ACE inhibitory activity.

The obtained results show that smooth hound muscle is a promising protein source for the production of ACE inhibitory peptides that could be utilized to develop functional foods for prevention of hypertension. Further works should be done to characterize potent ACE inhibitory peptides from SHPH and to determine their antihypertensive activity in vivo.

Acknowledgment This work was funded by Ministry of Higher Education and Scientific Research-Tunisia.

References

1. Scheidegger KJ, Butler S, Witztum JL (1997) J Biochem Chem 272:21609–21615
2. Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW (1982) Annu Rev Biochem 51:283–288
3. Fujita H, Yokoyama K, Yoshikawa M (2000) J Food Sci 65:564–569
4. Kuster DJ, Marshall GR (2005) J Comput Aided Mol Des 19:609–615
5. Meisel H, Goepfert A, Guenther S (1997) Milchwissenschaft 52:307–311
6. Cheung HS, Wang FL, Miguel AO, Emily FS, David WC (1980) J. Biol Chem 255:401–407
7. Ferreira SH, Bartelt DC, Greene LJ (1970) Biochemistry 9:2583–2593
8. Silva SV, Malcata FX (2005) Int Dairy J 15:1–15
9. Marczak ED, Usui A, Fujita H, Yang Y, Yokoo M, Lipkowski AW et al (2003) Peptides 24:791–798
10. Lee DH, Kim JH, Park JS, Choi YJ, Lee JS (2004) Peptides 25:621–627
11. Vermeirssen VA (2004) Biochimie 86:231–239
12. Arihara K, Nakashima Y, Mukai T, Ishikawa S, Itoh M (2001) Meat Sci 57:319–324
13. Kim SK, Byun HG, Park PJ, Shahidi F (2001) J Agric Food Chem 49:2992–2997
14. Kuba M, Tana C, Tawata S, Yasuda M (2005) Process Biochem 40:2191–2196
15. Saito Y, Wanezaki K, Kawato A, Imayasu S (1994) Biosci Biotechnol Biochem 58:1767–1771
16. Fahmi A, Morimura S, Guo HS, Shigematsu T, Kida K, Uemurac Y (2004) Process Biochem 39:1195–1200
17. Bougatef A, Nedjar-Arroume N, Ravallec-Plé R, Leroy Y, Guillochon D, Barkia A, Nasri M (2008) Food Chem 111:350–356
18. Hyun CK, Shin HK (2000) Process Biochem 36:65–71
19. Yu Y, Hu J, Bai X, Du Y, Lin B (2006) Process Biochem 41:1589–1593
20. Costa EL, Gontijo JAR, Netto FM (2007) Int Dairy J 17:632–640
21. Matsui T, Matsufuji H, Seki E, Osajima K, Nakashima M, Osajima Y (1993) Biosci Biotechnol Biochem 57:922–925
22. Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Ellouz Y, Nasri M (2009) Food Chem 114:1198–1205
23. Khantaphant S, Benjakul S (2008) Comp Biochem Physiol 151B:410–419
24. Bougatef A, Balti R, Ben Zaied S, Souissi N, Nasri M (2008) Food Chem 107:774–784
25. Bougatef A, Jellouli K, Balti R, Haddar A, Triki-Ellouz Y, Barkia A, Nasri M (2008) In: Koeffer EN (ed) Progress in food chemistry. Nova Science, pp 183–199. ISBN: 978-1-60456-303-0
26. Bougatef A, Balti R, Jellouli K, Triki-Ellouz Y, Nasri M (2008) In Nasri M (ed) Recent research developments in food by-products technology and biotechnology. Research signpost, pp 1–19. ISBN: 978-81-308-0259-6
27. Kembhavi AA, Kulkarni A, Pant A (1993) Appl Biochem Biotechnol 38:83–92
28. Adler-Nissen J (1986) In: Adler-Nissen J (eds) Enzymic hydrolysis of food proteins. Elsevier, Copenhagen, pp 57–109
29. Hoyle NT, Merritt JH (1994) J Food Sci 59:76–79
30. Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, Okubo A, Yamazaki S, Takano T (1995) J Dairy Sci 78:777–783
31. Wu J, Ding X (2002) Food Res Int 35:367–375
32. Kristinsson HG, Rasco BA (2000) J. Agric Food Chem 48:657–666
33. van der Ven C, Gruppen H, de Bont DBA, Voragen AG (2002) J Int. Dairy J 12:813–820
34. He HL, Chen XL, Wu H, Sun CY, Zhang YZ, Zhou BC (2007) Bioresour Technol 98:3499–3505
35. Yokoyama K, Chiba H, Yoshikawa K, Chiba H, Yoshikawa M (1992) Biosci Biotech Biochem 56:1541–1545
36. Ono S, Hosokawa M, Miyashita K, Takahashi K (2005) Int J Food Sci Technol 41:383–386
37. Matsufuji H, Matsui T, Seki E, Osajima K, Nakashima M, Osajima Y (1994) Biosci Biotech Biochem 58:2244–2245
38. Panyam D, Kilara A (1996) Trends Food Sci. Technol. 7:120–125
39. Jérôme T, Laurent M, Jean-Luc G (2002) FEBS Lett 531:369–374
40. Lee JR, Kwon DY, Shin HK, Yang CB (1999) Food Sci Biotechnol 8:172–178
41. Mullally MM, Meisel H, FitzGerald RJ (1997) FEBS Lett 402:99–101
42. Meisel H (1997) Biopolymers 43:119–128
43. Wu J, Ding X (2001) J Agric Food Chem 49:501–506
44. Wu J, Aluko RE, Nakai S (2006) J Agric Food Chem 54:732–738
45. Turner AJ, Hooper NM (1992) Trends Pharmacol Sci 23:177–183
46. Gobbetti M, Ferranti P, Smacchi E, Goffredi F, Addeo F (2000) Appl Environ Microbiol 9:3898–3904
47. Sheih IC, Fang TJ, Wu TK (2009) Food Chem 115:279–284
48. Wang J, Hu J, Cui J, Xuefang B, Dua Y, Miyaguchi Y, Lin B (2008) Food Chem 111:302–308
49. Je JY, Park PJ, Kwon JY, Kim SKA (2004) J. Agric Food Chem 52:7842–7845

Résumé

L'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine peut être considérée comme une voie importante d'obtention de peptides antimicrobiens face à l'émergence des résistances bactériennes aux divers antibiotiques. Des alcools connus comme des solvants structurants ont été utilisés afin d'aboutir à une hydrolyse ménagée de l'hémoglobine par la pepsine. Le méthanol, l'éthanol, le propanol, le butanol ou le trifluoroéthanol ont été utilisés en vue de préserver ou d'induire de nouvelles modifications structurales de l'hémoglobine. L'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine en milieu hydroalcoolique a aboutit à un mélange peptidique moins complexe majoritairement composé de peptides intermédiaires à activité antimicrobienne.

L'étude des variations structurales a été réalisée par dichroïsme circulaire, spectrofluorimétrie et spectrophotométrie UV-visible.

L'utilisation de 10% de TFE a permis l'obtention d'un hydrolysat moins complexe riche en peptides intermédiaires hydrophobes mais à concentration faible. La présence de 40% de méthanol, 30% d'éthanol, 20% de propanol ou de 10% de butanol a amélioré cette concentration. Ces alcools ont rendu plus spécifique l'activité de l'enzyme par une augmentation de l'hydrolyse préférentiellement en position C-terminale des leucines. Ils ont également rendu accessible le cœur hydrophobe de l'hémoglobine permettant ainsi d'obtenir une nouvelle famille peptidique: la famille α 67-106. Cette famille a montré une activité antimicrobienne vis-à-vis de quatre souches bactériennes (CMI: 35,2-187,1 µM) et une activité antihypertensive potentielle par sa capacité d'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (CI_{50}: 42,55-1095 µM).

Mots clés : hydrolyse pepsique, hémoglobine bovine, structures, alcools, peptides antimicrobiens.

Abstract

In view of the emergence of resistant bacteria, hydrolysis of bovine hemoglobin by pepsin can be considered as an important way for the obtaining of antimicrobial peptides. Known alcohols as structural solvents were used to lead to a limited hydrolysis of bovine hemoglobin. Methanol, ethanol, propanol, butanol, or trifluoroethanol were used in order to preserve or induce further structural changes of hemoglobin. Peptic hydrolysis of hemoglobin in hydroalcoholic solution has permitted to obtain less complex hydrolysate mainly composed of intermediate antimicrobial peptides.

Structural changes of proteins were investigated using spectroscopic methods, such as, UV-visible spectophotometry, fluorescence spectroscopy and circular dichroïsm.

Use of 10% TFE was allowed to less complex hydrolysate, containing intermediate hydrophobic peptides. Neverless, concentration of these peptides was low. Use of 40% methanol, 30% ethanol, 20% propanol or 10% butanol has improved this concentration. These alcohols have induced and increased more specific activity of pepsin, located preferentially in C-terminal position of leucine. They have also made available the hydrophobic core of hemoglobin allowing to a new peptide family: 67-106 α family.

This family showed antimicrobial activity against four bacterial strains (MIC: 35.2-187.1 µM) and displayed at the same time ACE inhibitory activity (IC_{50}: 42.55-1095 µM).

Keywords: Peptic hydrolysis, bovine hemoglobin, structures, alcohols, antimicrobial peptides