



UNIVERSITE LILLE 1-SCIENCES ET TECHNOLOGIES

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

(ED-SMRE)



UNIVERSITE DE MONASTIR-Institut Supérieur de Biotechnologie Monastir

Ecole Doctorale des Sciences Biologiques, Biotechnologies et Santé



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

Option : Ingénierie des fonctions biologiques

Préparée au Laboratoire des Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien –
UPRES EA 1026

Polytech'Lille, France

L'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine pure ou dans le cruor bovin (un coproduit d'abattoir)

Modélisation des cinétiques d'apparition des peptides antibactériens obtenus et étude de leur valorisation

Par **Karima HEDHILI**

Directeurs de thèse : Pr Naiima NEDJAR et Pr Khaled HANI

Co-encadrants : Dr.Peggy Vauchel et Dr.Krasimir Dimitrov

Soutenue le 16 Septembre 2014 devant Jury composée de :

Naïma NEDJAR, Professeur, Laboratoire ProBioGEM, IUT « A » Lille 1, France

Khaled HANI, Professeur, Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine Ibn El Jazzar Sousse, Tunisie

Krasimir DIMITROV, Maître de Conférences HDR, Laboratoire ProBioGEM, Polytech'Lille 1, France

Peggy VAUCHEL, Maître de Conférences, Laboratoire ProBioGEM, Polytech'Lille 1, France

Pascal DEGRAEVE, Professeur, Département de Génie Biologique, Université Lyon 1, France

Ali BOUGATEF, Maître de Conférences HDR, Institut Supérieur de Biotechnologie de Sfax, Tunisie

Hamdi BOUSSETTA, Professeur, Institut Supérieur Agronomique de Chott Mariem, Tunisie

Stephanie BORDENAVE-JUCHEREAU, Maître de Conférences HDR LIENSS, Université La Rochelle

Pascal DHULSTER, Professeur Directeur du Laboratoire ProBioGEM, Polytech'Lille 1, France

Directrice

Directeur

Invité

Invitée

Rapporteur

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Président

Ce travail a été effectué au Laboratoire des Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien de l'Université de Lille 1.

Dans le Cadre d'une thèse en Cotutelle entre l'Université de Monastir, Tunisie et l'Université de Lille 1, Sous la direction de Professeur Naïma NEDJAR et de Professeur Khaled HANI.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le **Pr. Pascal DHULSTER**, Directeur du Laboratoire ProBioGEM d'avoir accepté de m'accueillir dans ce laboratoire. Merci très sincèrement pour cette grande aide scientifique et de m'avoir permis de travailler dans d'aussi bonnes conditions.

Je tiens à exprimer tout particulièrement ma reconnaissance à mes directeurs de thèse, **Pr. Naïma NEDJAR** et **Pr. Khaled HANI** pour l'encadrement scientifique et la confiance accordée. Les nombreuses discussions que nous avons eues ainsi que leur disponibilité et leurs conseils sont pour beaucoup dans le résultat final de ce travail. Leur compétence, leur rigueur scientifique et leur clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront des moteurs de mon travail de chercheur.

Merci à vous, **Pr. Pascal DEGRAEVE**, Département de Génie Biologique, Université Lyon1, **Pr. Hamdi BOUSSETTA**, Institut Supérieur Agronomique de Chott Mariem, Tunisie et **Dr. Ali BOUGATEF**, Maître de Conférences HDR, Institut Supérieur de Biotechnologie de Sfax, Tunisie, 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 **Pr. Pascal DHULSTER**, directeur du laboratoire ProBioGEM et à **Dr. Stéphanie BORDENAVE-JUCHEREAU**, maître de conférences HDR, du laboratoire Littoral Environnement et Sociétés, à l'université de la Rochelle, d'avoir bien voulu examiner cette thèse.

Un très grand merci à mes codirecteurs de thèse : **Dr. Krasimir DIMITROV**, Maître de Conférences HDR, Laboratoire ProBioGEM, Polytech'Lille 1 et **Dr. Peggy VAUCHEL**, Maître de Conférences, Laboratoire ProBioGEM, Polytech'Lille 1. Merci pour votre disponibilité, pour tous vos conseils et votre soutien.

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 toute ma gratitude à tous mes ami(e)s et à toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail.

Mes remerciements vont aussi à l'endroit de tous mes amis du laboratoire. Je pense particulièrement aux techniciens du laboratoire. Je pense à tous les doctorants, post doctorants et ATER. Merci pour tous ces moments très agréables vécus, pour cette grande aventure humaine. Merci à tous pour votre soutien et votre aide. Un grand merci à tous les stagiaires du laboratoire, pour leur aide technique.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille, et en particulier à mes parents et mes sœurs.

Table des matières

Liste des figures	- 1 -
Liste des tableaux	- 4 -
Liste des photos	- 6 -
INTRODUCTION GÉNÉRALE	- 7 -
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	- 11 -
I- Structure de l'hémoglobine bovine	- 12 -
I-1- Structure de la globine.....	- 12 -
➤ Structure primaire de la globine	- 12 -
➤ Structure secondaire de la globine	- 13 -
➤ Structure tertiaire de la globine.....	- 14 -
➤ Structure quaternaire de la globine.....	- 14 -
I-2- Structure de l'hème	- 15 -
II- Structure et mécanisme d'action de la pepsine porcine [EC3.4.23.1]	- 17 -
II-1- Structure de la pepsine	- 17 -
II-2- Activité enzymatique de la pepsine	- 18 -
II-3- Mécanisme d'action de la pepsine	- 18 -
III- Structure et mode d'action des peptides antimicrobiens	- 19 -
III-1- Structure des peptides antimicrobiens.....	- 20 -
➤ Les peptides en hélice α amphiphiles	- 20 -
➤ Les peptides riches en ponts disulfures	- 21 -
➤ Les peptides riches en acides aminés particuliers	- 21 -
➤ Les petits peptides à structure « Random coil ».....	- 21 -
III-2- Caractéristiques des peptides antimicrobiens.....	- 22 -
➤ La charge	- 22 -
➤ La conformation.....	- 23 -
➤ L'hydrophobie	- 23 -
➤ L'amphipacité.....	- 24 -
III-3- Modes d'action des peptides antimicrobiens.....	- 25 -
III-3-1- Mécanismes d'action des peptides perméabilisant les membranes.....	- 26 -
III-3-2-Mecanisme agissant au niveau intracellulaire.....	- 34 -
IV- Obtention de peptides antibactériens par hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine.....	- 35 -
V- Valorisation de molécules actives en emballage intelligent	- 42 -
V-1- Généralités sur les emballages actifs.....	- 42 -

V-2- Cas d'utilisation des emballages antimicrobiens.....	- 43 -
V-3- Matériaux utilisés pour l'emballage actif	- 45 -
VI- Modélisation cinétique de l'hydrolyse enzymatique des protéines agroalimentaires	- 46 -
VI-1- Généralités sur les modèles cinétiques	- 46 -
VI-2- Modèles comportementaux (empiriques) de la protéolyse.....	- 48 -
VI-3- Modèles phénoménologiques de la protéolyse	- 49 -
MATÉRIELS ET MÉTHODES	- 51 -
I- Hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine bovine	- 52 -
I-1- Dosage de l'hémoglobine	- 52 -
➤ Principe de la méthode de Drabkin	- 52 -
➤ Mode opératoire.....	- 53 -
I-2- Dénaturation de l'hémoglobine par l'urée	- 53 -
I-2-1- Préparation des solutions d'hémoglobine dénaturée 2% pH2.....	- 53 -
I-2-2- Préparation des solutions d'hémoglobine dénaturée 1% pH4, 5.....	- 53 -
I-3- Dosage de l'activité enzymatique de pepsine	- 54 -
I-4- Hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 synthétisé	- 54 -
I-5- Hydrolyse de l'hémoglobine bovine purifiée ou à partir du cruor	- 55 -
II- Analyse des hydrolysats pepsiques de l'hémoglobine bovine.....	- 55 -
II-1- La Chromatographie Liquide Haute Performance en phase inverse (CLHP)	- 55 -
II-2- Identification des peptides par spectrométrie de masse	- 57 -
II-3- Couplage LC- ESI- MS	- 58 -
III- Détermination de l'activité antibactérienne	- 58 -
III-1- Évaluation qualitative de l'activité antibactérienne	- 58 -
III-2- Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI.....	- 59 -
IV- Modélisation de l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32.....	- 60 -
IV-1- Hypothèses de modélisation pour la suite de l'étude	- 61 -
IV-2- Détermination des paramètres de la cinétique.....	- 62 -
IV-3- Le solveur Microsoft d'Excel	- 62 -
V- Dosage des ions potassium extracellulaires	- 64 -
V-1- Préparation de la suspension bactérienne de <i>Listeria innocua</i>	- 64 -
V-2- Prélèvement des échantillons	- 64 -
V-3- La spectrophotométrie d'absorption atomique	- 65 -
V-4- Préparation de la gamme d'étalonnage du potassium	- 66 -

VI- Préparation des films polyéthylène basse densité traités par le plasma froid et fonctionnalisés par les peptides antibactériens	67 -
VII- Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des films fonctionnalisés par les peptides antibactériens.....	68 -
VII-1- Test qualitatif de l'activité antimicrobienne des films fonctionnalisés par les peptides antibactériens.....	68 -
VII-2- Test quantitatif de l'activité antimicrobienne des films fonctionnalisés par les peptides antibactériens.....	69 -
VII-2- 1- Dénombrement de la suspension bactérienne préparée sans film (témoin).....	69 -
VII-2- 2- Dénombrement de la suspension bactérienne préparée après ajout des films traités aux peptides antibactériens.....	70 -
RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	71 -
<u>CHAPITRE 1 : MÉCANISME ET MODÉLISATION DE LA CINÉTIQUE DE L'HYDROLYSE PEPSIQUE DU PEPTIDE ANTIBACTÉRIEN α 1-32 SYNTHÉTISÉ</u>	72 -
I- Identification et caractérisation des peptides issus de l'hydrolyse du peptide α 1-32 synthétisé ...	74 -
II- Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la famille des peptides antibactériens issus de l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 synthétisé	80 -
III- Modélisation de la cinétique de l'hydrolyse enzymatique du peptide α 1-32 synthétisé.....	82 -
III-1- Effet de la température sur la cinétique d'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 synthétisé ...	89 -
III-2- Effet du pH sur la cinétique d'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 synthétisé.....	90 -
III-3- Effet du rapport enzyme/substrat sur la cinétique d'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 synthétisé	93 -
III-4- Validation du modèle de la cinétique d'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 synthétisé	95 -
Conclusion	97 -
<u>CHAPITRE 2: GÉNÉRALISATION DU MODÈLE MATHÉMATIQUE SUR LA CINÉTIQUE DE DEUX FAMILLES DE PEPTIDES ANTIBACTÉRIENS ISSUS DE L'HYDROLYSE PEPSIQUE DE L'HÉMOGLOBINE ET DU CRUOR BOVINS.....</u>	98 -
I- Hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine purifiée ou à partir du cruor	99 -
II- Identification et caractérisation des peptides des familles de antibactériens α 1-32 et α 107-141 issus de l'hémoglobine et du cruor bovins.....	103 -
II-1- Identification et caractérisation des peptides de la famille α 1-32 issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine.....	104 -
II-2- Identification et caractérisation des peptides de la famille α 107-141 issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine	107 -
III- Détermination de l'activité antibactérienne des familles des peptides antibactériens α 1-32 et α 107-141 issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine ou du cruor bovins	109 -

IV- Modélisation de la cinétique enzymatique du peptide α 1-32 issu de l'hydrolyse de l'hémoglobine ou du cruor bovins	- 110 -
IV-1- Détermination du schéma réactionnel de l'hydrolyse du peptide α 1-32 à partir de l'hémoglobine et du cruor bovines	- 110 -
IV-2-Modélisation de la cinétique enzymatique d'hydrolyse du peptide α 1-32 issu de l'hémoglobine bovine.....	- 113 -
IV-2-1- Effet de la température sur la cinétique de l'hydrolyse du peptide α 1-32 issu de l'hémoglobine et du cruor bovins	- 117 -
IV-2-2- Effet du pH sur la cinétique de l'hydrolyse du peptide α 1-32 issu de l'hémoglobine et du cruor bovins.....	- 123 -
VI-2-3- Effet du rapport enzyme/substrat sur la cinétique d'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 issu de l'hémoglobine et du cruor bovins	- 128 -
IV-2-4- Validation du modèle de la cinétique enzymatique d'hydrolyse du peptide α 1-32 issu de l'hémoglobine et du cruor bovins	- 129 -
V- Modélisation de la cinétique d'hydrolyse de la famille α 107-141 issu de l'hydrolyse de l'hémoglobine et du cruor bovins	- 132 -
V-1- Détermination du schéma réactionnel de la famille α 107-141 issu de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine.....	- 132 -
V-2- Modèle cinétique de l'hydrolyse de la famille des peptides dérivés du peptide α 107-141 issu de l'hémoglobine ou du cruor bovins	- 133 -
V-2-1- Effet de la température sur la cinétique d'hydrolyse du peptide α 107-141.....	- 139 -
V-2-2- Effet du pH sur la cinétique de l'hydrolyse du peptide α 107-141 issu de l'hydrolyse par la pepsine de l'hémoglobine bovine	- 141 -
V-2-3- Effet du rapport enzyme/substrat sur la cinétique d'hydrolyse pepsique du peptide α 107-141 issu de l'hémoglobine ou du cruor bovins	- 143 -
V-2-4- Validation du modèle de la cinétique enzymatique d'hydrolyse du peptide α 107-141 issu de l'hémoglobine bovine.....	- 144 -
Conclusion	- 146 -
CHAPITRE 3 : ÉTUDE STRUCTURE-FONCTION DES PEPTIDES ANTIBACTÉRIENS α 1-32 ET α 137-141 ISSUS DE L'HYDROLYSE PEPSIQUE DE L'HÉMOGLOBINE BOVINE ET LEUR VALORISATION EN EMBALLAGE ACTIF.....	- 147 -
I- Compréhension de mécanismes d'action et caractérisation de la relation structure fonction des peptides antibactériens α 1-32 et α 137-141 issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine..	- 148 -
I-1- Étude de la structure et des propriétés des peptides antibactériens α 1-32 et α 137-141 issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine.....	- 150 -
I-2- Étude de l'hydrosolubilité et la liposolubilité des peptides antibactériens α 1-32 et α 137-141 issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine.....	- 152 -

I-3- Étude de l'activité antibactérienne des peptides issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine.....	153 -
I-4- Détermination de la partie active du peptide α 137-141	154 -
II- Étude de la perméabilisation de la paroi bactérienne du <i>Listeria innocua</i>	155 -
II-1- Étude du rôle du glucose dans le transport intermembranaire du potassium.....	155 -
II-2- Étude de l'effet des peptides antibactériens α 1-32 et α 137-141 issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine sur le transport intermembranaire du potassium chez <i>Listéria innocua</i>	156 -
II-3- Rôle des fonctions N-terminale et C-terminale dans l'activité antibactérienne du peptide α 137-141 issu de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine	158 -
III- Valorisation des peptides antibactériens en emballage actif.....	161 -
III-1- Évaluation qualitative de l'activité antibactérienne du film polyéthylène basse densité fonctionnalisé par les peptides antibactériens α 1-32 ou α 137-141	161 -
III-2- Évaluation quantitative de l'activité antibactérienne du film polyéthylène basse densité fonctionnalisé par les peptides antibactériens α 1-32 ou α 137-141	163 -
Conclusion	164 -
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	166 -
References bibliographiques.....	171 -
LISTE DES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.....	189 -
ANNEXES.....	191 -

Liste des figures

Figure 1: Structure quaternaire de l'hémoglobine et la disposition spatiale de ses différentes sous unités. (Sylvia S. Mader, Inquiry Into Life, 8th edition.)	- 12 -
Figure 2: Structure primaire de la chaîne α (a) et la chaîne β (b) de l'hémoglobine	- 13 -
Figure 3: Structure secondaire de la chaîne α (a) en hélice (b) spatiale	- 13 -
Figure 4: Structure secondaire de la chaîne β (a) en hélice (b) spatiale	- 14 -
Figure 5: Structure tertiaire de la chaîne α (a) et la chaîne β (b) de l'hémoglobine	- 14 -
Figure 6: Représentation schématique d'un hème composé d'une porphyrine contenant un atome de fer ainsi que ces cinq coordinations.....	- 15 -
Figure 7: Structure de la désoxyhémoglobine (a) et (b) l'oxyhémoglobine.....	- 16 -
Figure 8: Structure quaternaire de la pepsine porcine	- 17 -
Figure 9: Nomenclature de Schechter et Berger (1967)	- 19 -
Figure 10: Modèles d'interaction peptide/membrane «Barrel stave» (a), «Pores toroïdaux» (b) et «Capet»(c) (Brogden, 2005).....	- 28 -
Figure 11: Modèle en "douve de tonneaux" (Etienne, 2004).....	- 29 -
Figure 12: Modèle des "pores toroïdaux"(Etienne, 2004).....	- 30 -
Figure 13: Modèle en tapis (Etienne, 2004)	- 31 -
Figure 14: Modèle de Shai-Matsuzaki-Yang (Zasloff, 2002)	- 32 -
Figure 15: Mécanisme hypothétique d'apprêtement et de pénétration d'un peptide antimicrobien : Coarse grain molecular dynamics (Lopez et al., 2006).....	- 33 -
Figure 16: Mode d'action intracellulaire des peptides antimicrobiens (Brogden, 2005).....	- 35 -
Figure 17: Cartographie peptidique de l'hydrolysate pepsique de l'hémoglobine bovine en milieu aqueux (Nedjar-Arroume et al., 2006; Nedjar-Arroume et al., 2008).....	- 38 -
Figure 18: Cartographie peptidique de l'hydrolysate pepsique de l'hémoglobine bovine en milieu hydroalcoolique (Yaba Adje et al., 2011a)	- 40 -
Figure 19 : démarche mise en œuvre pour l'élaboration un modèle mathématique décrivant une hydrolyse enzymatique.....	- 61 -
Figure 20: Boîte de dialogue du système solveur Microsoft Excel	- 63 -
Figure 21: Principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre d'absorption atomique	- 66 -
Figure 22: Courbe d'étalonnage de la solution de KCl	- 67 -
Figure 23: Profil RP-CLHP de la cinétique d'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 à pH 4,5; E/S=100 et à 15°C (A=215nm)	- 74 -
Figure 24: Schéma réactionnel de l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32.....	- 79 -
Figure 25: Évolution des concentrations (expérimentale et le modèle) de peptides générés pendant l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 (a) à 15°C, (b) à 23°C et (c) à 37°C	- 86 -
Figure 26: Évolution des concentrations (expérimentale et le modèle) de peptides générés pendant l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 (a) à 15°C, (b) à 23°C et (c) à 37°C	- 87 -
Figure 27: Linéarisation de l'équation d'Arrhenius	- 89 -
Figure 28: Évolution des concentrations (expérimentale et le modèle) de peptides générés pendant hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 (a) à pH 3,5; (b) à pH 4,5 et (c) à pH5,5 (T=23°C et E/S=1/100)-	91 -
Figure 29: Comparaison des cinétiques prédites et expérimentales de peptides générés pendant hydrolyse du peptide α 1-32 à 30°C (E/S=1/100 et pH 4,5).....	- 96 -

Figure 30: Comparaison des cinétiques prédites et expérimentales de peptides générés pendant hydrolyse du peptide α 1-32 à pH 5 (E/S=1/100 et à 23°C).....	- 96 -
Figure 31: Évolution des concentrations (expérimentale et le modèle) de peptides générés pendant hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 (a) à E/S=1/50; (b) à E/S=1/100 et (c) à E/S=1/200 (T=23°C et pH 4,5).....	- 94 -
Figure 32: Profil CLHP (a, b et c) de la cinétique d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine 1% (p/v) par la pepsine à pH 4,5 et à 23°C en conditions dénaturantes (A=215nm).....	- 102 -
Figure 33: Profil CLHP de l'hydrolysats pepsique d'hémoglobine bovine 1% en conditions dénaturantes à 23°C dans le tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5.....	- 104 -
Figure 34: Identification des peptides de la famille α 1-32 par spectrométrie de masse (LC-ESI-MS). : α 1-32 (a), α 1-29 (b), α 1-28 (c), α 1-27 (d), α 1-23 (e), α 3-23(f), α 5-23(g), α 1-14(h), α 3-14(i) et α 5-14(j).....	- 106 -
Figure 35: Schéma réactionnel de l'évolution des peptides au cours d'hydrolyse pepsique de la chaîne α de l'hémoglobine.....	- 112 -
Figure 36: Évolution de la concentration des peptides de la famille α 1-32 générés au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine (modèle : lignes continues et expérimental : points) à différentes températures (a) à 15°C, (b) à 23°C et (c) à 37°C.....	- 121 -
Figure 37 :Évolution de la concentration des peptides de la famille α 1-32 générés au cours de l'hydrolyse pepsique du cruor bovin (modèle : lignes continues et expérimental : points) à différentes températures (a) à 15°C, (b) à 23°C et (c) à 37°C.....	- 122 -
Figure 38: Évolution de la concentration des peptides de la famille α 1-32 générés au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine (modèle : lignes continues et expérimental : points) à différent pH (a) pH 3,5, (b) à pH 4,5 et (c) à pH 5,5.....	- 124 -
Figure 39 : Évolution de la concentration des peptides de la famille α 1-32 générés au cours de l'hydrolyse pepsique du cruor bovin (modèle : lignes continues et expérimental : points) à différent pH (a) pH 3,5, (b) à pH 4,5 et (c) à pH 5,5.....	- 125 -
Figure 40: Comparaison des cinétiques prédites (lignes) et expérimentales (motifs) à une température de 30°C des peptides générés à partir du peptide α 1-32 au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine (E/S=1/11, pH=4,5).....	- 130 -
Figure 41: Comparaison des cinétiques prédites (lignes) et expérimentales (motifs) à un pH 5 des peptides générés à partir du peptide α 1-32 au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine (E/S=1/11, T = 23°C).....	- 131 -
Figure 42: Comparaison des cinétiques prédites (lignes) et expérimentales (motifs) à une température de 30°C des peptides générés à partir du peptide α 1-32 au cours de l'hydrolyse du cruor bovin (E/S=1/11, pH=4,5).....	- 131 -
Figure 43: Comparaison des cinétiques prédites (lignes) et expérimentales (motifs) à un pH 5 des peptides générés à partir du peptide α 1-32 au cours de l'hydrolyse du cruor bovin (E/S=1/11, T=23°C).....	- 132 -
Figure 44: Schéma réactionnel de l'hydrolyse du peptide α 107-141.....	- 133 -
Figure 45:Évolution de la concentration des peptides de la famille α 107-141 générés au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine (modèle: lignes continues et expérimental: points) à différentes températures (a) 15°C; (b) 23°C et (c) 37°C.....	- 140 -
Figure 46: Évolution de la concentration des peptides de la famille α 107-141 générés au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine (modèle : lignes continues et expérimental : points) à différent pH (a) pH 3,5 (b); à pH 4,5 et (c) à pH 5,5.....	- 142 -

Figure 47: Comparaison des cinétiques prédites (lignes) et expérimentales (motifs) à une température de 30°C (a) (E/S= 1/11, pH=4,5) et un pH 5 (b) (E/S=1/11, T=23°C) des peptides générés à partir du peptide α 107-141 au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovin..... - 145 -

Figure 48: Structure tridimensionnelle du peptide α 1-32 (www.acdlabs.com)..... - 151 -

Figure 49: Structure tridimensionnelle du peptide (a) α 137-141 et ses dérivés (b) α 138-141 (SKYR) et (c) α 139-141 (KYR) (www.acdlabs.com) - 152 -

Figure 50: Évolution de la concentration extracellulaire de l'ion K⁺ dans une suspension cellulaire concentrée de *Listeria innocua* avec et sans glucose (5g.L⁻¹), les cellules sont incubées à 30°C ... - 156 -

Figure 51: Évolution de la concentration extracellulaire des ions potassium dans une suspension cellulaire de *Listeria innocua* - 157 -

Figure 52:Évolution de la concentration des ions K⁺ extracellulaires en présence du peptide α 137-141 avec la fonction C-terminale ou N-terminale bloquée et le N et le C-terminale bloquées - 159 -

Liste des tableaux

Tableau 1 : Peptides antibactériens issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine.....	- 41 -
Tableau 2: Quelques modèles empiriques simulant l'hydrolyse enzymatique (Margot et <i>al.</i> , 1997)-	49 -
Tableau 3: Préparation de la gamme d'étalonnage du potassium	- 66 -
Tableau 4: Récapitulatif des conditions des gaz utilisés	- 68 -
Tableau 5: Masse moléculaire relative et temps de rétention de chaque peptide dérivé du peptide α 1-32	- 78 -
Tableau 6: Caractéristiques structurales des peptides antibactériens purs issus de l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 (http://pbil.ibcp.fr).....	- 80 -
Tableau 7: Valeurs de CMI (μ M) de peptides antibactériens de la famille α 1-32 (CMI étant la concentration la plus faible du peptide qui inhibe totalement la croissance des espèces bactériennes après 24 h d'incubation à 37°C).....	- 81 -
Tableau 8: Équations de la concentration au cours du temps des peptides obtenus par l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 synthétisé.....	- 84 -
Tableau 9 : Valeurs des constantes apparentes de vitesse et paramètres de l'équation d'Arrhenius en fonction de la température (pH=4,5 et E/S=1/100)	- 88 -
Tableau 10: Valeurs des constantes apparentes de vitesse et paramètres de l'équation de la dépendance des constantes apparentes de vitesse en fonction du pH (T=23°C, E/S=1/100).....	- 92 -
Tableau 11: Valeurs des constantes apparentes de vitesse à différents rapports E/S	- 95 -
Tableau 12: Masses molaires, temps de retentions et séquences en acide aminé des peptides de la famille α 107-141	- 107 -
Tableau 13: Caractéristiques structurales des peptides de la famille α 107-141	- 108 -
Tableau 14 : CMI (μ M) de peptides antibactériens de la famille α 1-32 issus de l'hémoglobine bovine -	109 -
Tableau 15: CMI (μ M) de peptides antibactériens de la famille α 107-141 issus de l'hémoglobine bovine	- 110 -
Tableau 16: Equations de la concentration au cours du temps des peptides antibactériens de la famille du peptide α 1-32 issus de l'hémoglobine bovine.....	- 114 -
Tableau 17: Rapport entre la constante k_1 (constante de formation du peptide α 1-23 à partir du peptide α 1-32) et les autres constantes apparentes à différentes températures	- 117 -
Tableau 18: Rapport entre la constante k_1 (constante de formation du peptide α 1-23 à partir du peptide α 1-32) et les autres constantes apparentes à différents pH.....	- 117 -
Tableau 19: Valeurs des constantes apparentes de vitesse et paramètres de l'équation d'Arrhenius en fonction de la température du peptide α 1-32 issu de l'hémoglobine et du cruor bovins (pH 4,5 et E/S=1/11)	- 119 -
Tableau 20: Valeurs des constantes apparentes de la vitesse et paramètres de l'équation de la droite du pH en fonction des constantes du peptide α 1-32 issu de l'hémoglobine et du cruor bovins.....	- 127 -
Tableau 21: Valeurs des constantes apparentes de vitesse à différents rapports E/S	- 129 -
Tableau 22 : Equations de la concentration au cours du temps des peptides de la famille du peptide α 107-141 obtenus par l'hydrolyse pepsique l'hémoglobine bovine	- 135 -
Tableau 23: Valeurs des constantes apparentes de vitesse et paramètres de l'équation d'Arrhenius en fonction de la température du peptide α 107-141 issu de l'hémoglobine bovine	- 138 -
Tableau 24: Valeurs des constantes apparentes de vitesse et paramètres de l'équation de la droite en fonction du pH du peptide α 107-141 issu de l'hémoglobine bovine	- 139 -
Tableau 25 : Valeurs des constantes apparentes de vitesse à différents rapports E/S	- 143 -

Tableau 26: Valeurs calculées de log P	- 153 -
Tableau 27: CMI en μM des peptides antibactériens contre quatre souches bactériennes : <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> et <i>Micrococcus luteus</i>	- 154 -
Tableau 28: Activité du peptide α 137-141 modifié contre les quatre souches bactériennes <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> et <i>Micrococcus luteus</i>	- 155 -
Tableau 29: Cinétique de l'activité antibactérienne du film polyéthylène basse densité fonctionnalisé par les peptides antibactériens α 1-32 et α 137-141 en milieu liquide sur <i>L.innocua</i>	- 163 -

Liste des photos

Photo 1 : Chromatographie Liquide Haute Performance analytique

Photo 2 : Activité des films fonctionnalisés par les peptides α 1-32 (a) et α 137-141 (b) sur *L.innocua* (à gauche) et *S. enteridis* (à droite)

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les abattoirs sont une source importante de pollution en raison des rejets fortement chargés qu'elles génèrent, posant ainsi un réel problème sur le plan écologique et environnemental. En 2012, plus de 2,87 millions de tonnes de sous-produits d'origine animale ont été générés par les abattoirs et traités ou revalorisés (S.I.F.C.O : Syndicat des Industries Françaises des Coproduits Animaux).

Parmi ces rejets, certains éléments tels que le sang bovin peuvent faire l'objet d'une valorisation. En effet, le cruor est une source riche en protéines avec plus de 90% d'hémoglobine, une protéine contenant des séquences peptidiques à activité biologique qui peuvent être utilisées comme des ingrédients fonctionnels et/ou biologiques à diverses fins : dans l'agro-alimentaire, dans l'alimentation pour bétail, dans l'industrie pharmaceutique...

Contrairement à la plupart des co-produits animaux, le sang a connu un grand succès commercial à la fois par rapport à sa collecte et sa transformation (Gómez-Juárez et *al.*, 1999). Du fait de sa richesse en protéines, on considère parfois le sang comme une « viande liquide ». En effet, le sang peut être déshydraté par un procédé d'atomisation et utilisé directement comme ingrédient, ou peut être concentré par coagulation. Le plasma est en général séparé des hématies par centrifugation. Les protéines peuvent être purifiées et concentrées par des techniques membranaires (Dailloux et *al.*, 2002).

L'hydrolyse enzymatique intervient dans ce contexte comme une réponse intéressante et exploitable au niveau industriel. En effet, l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine engendre des peptides présentant des activités biologiques diverses. L'hydrolyse enzymatique de cette protéine a montré beaucoup d'avantages et de nombreux peptides de diverses propriétés intéressantes qui sont obtenus au cours de son hydrolyse. On peut citer : les peptides à activité opioïde (Glämsta et *al.*, 1991; Lantz et *al.*, 1991; Piot et *al.*, 1992; Zhao et *al.*, 1994), les peptides à activité inhibitrice de l'ECA (enzymes de conversion de l'angiotensine) identifiés par Mito et *al.* en 1996 et les peptides antibactériens isolés au sein du laboratoire ProBioGEM par Froidevaux et *al.* en 2001, Daoud et *al.* en 2005, Nedjar-Arroume et *al.* en 2006 et 2008 et Yaba Adje et *al.* 2011a,b. Le déterminant antibactérien minimal responsable de l'activité antibactérienne de ces peptides a été déterminé pour la chaîne α (KYR) et la chaîne β (RYH) de l'hémoglobine bovine par Catiau et *al.* 2011a,b.

Toutefois, l'hydrolyse enzymatique d'une protéine fait intervenir des réactions composites avec de nombreuses réactions parallèles et séquentielles qui se traduisent par des cinétiques et

des mélanges peptidiques complexes. Les peptides actifs se trouvent généralement parmi les populations de peptides transitoires dont la séquence et la concentration sont sous contrôle cinétique. Ceci justifie l'importance des études cinétiques et de leurs modélisations pour optimiser et favoriser l'obtention des peptides présentant une activité biologique prononcée.

La croissance microbienne sur les surfaces alimentaires est une cause majeure de la détérioration des aliments et la contamination bactérienne de produits laitiers, de la viande ou de plats cuisinés. Des tentatives ont été faites pour améliorer la sécurité et de retarder la détérioration en utilisant des agents antimicrobiens (Torres et *al.*, 1985). Il sera donc intéressant d'incorporer des peptides antibactériens isolés de l'hydrolysat de l'hémoglobine bovine en emballage actif.

L'objectif principal de cette thèse est de maîtriser l'hydrolyse pepsique de deux familles de peptides antibactériens issus de l'hémoglobine et du cruor bovins en étudiant leurs cinétiques et de déterminer un modèle mathématique capable de prédire la concentration de chaque peptide d'intérêt de ces deux familles en fonction du temps d'hydrolyse mais aussi de la température, du pH et du rapport enzyme/substrat (E/S). Les peptides d'intérêt étant antibactériens, cette thèse étudie donc la relation structure-fonction de ces peptides afin de comprendre leurs modes d'action en contact d'une bactérie cible et la possibilité de les incorporer dans un emballage actif.

Après un rappel bibliographique sur l'hémoglobine, les peptides antibactériens, la modélisation de la cinétique enzymatique et sur l'emballage actif ; les résultats de cette étude seront présentés en trois chapitres.

Dans le premier chapitre, nous proposons d'étudier l'activité antibactérienne et la cinétique enzymatique de la famille de peptides antibactériens issus de l'hydrolyse enzymatique d'un peptide synthétisé, correspondant au fragment α 1-32 de l'hémoglobine bovine, et de déterminer un premier modèle simple capable de définir les conditions optimales pour favoriser la production d'un peptide spécifique présentant une activité biologique intéressante en tenant compte de la variation de la température, du pH et du rapport enzyme/substrat (E/S).

La généralisation du modèle ainsi déterminé sur l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine sera abordée dans le deuxième chapitre, en l'appliquant sur deux familles de peptides

antibactériens α 1-32 et α 107-141 issus directement de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine ou du cruor bovins.

Dans le troisième chapitre, nous tenterons de comprendre la relation structure-fonction des peptides antibactériens, dont la cinétique était maîtrisée et modélisée, en mettant en évidence l'effet de ces peptides sur la perméabilisation de la paroi bactérienne et enfin dans ce dernier chapitre, nous étudierons également la valorisation de ces peptides antibactériens en emballage actif.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Les peptides antibactériens isolés dans notre travail ont été obtenus par hydrolyse pepsique d'une protéine modèle : L'hémoglobine bovine.

I- Structure de l'hémoglobine bovine

Hémoglobine est une hétéroprotéine de masse moléculaire 64 500Da, elle a une structure globuleuse formée de 4 sous unités, chaque sous unité ou monomère comporte une partie protéique : la globine et un groupement prosthétique non protéique : l'hème.

C'est le constituant spécifique de l'hématie dont la fonction est de transporter l'oxygène des poumons vers les tissus du corps et le gaz carbonique des tissus vers les poumons. La figure 1 représente la structure quaternaire de l'hémoglobine et la disposition spatiale de ses différentes sous unités.

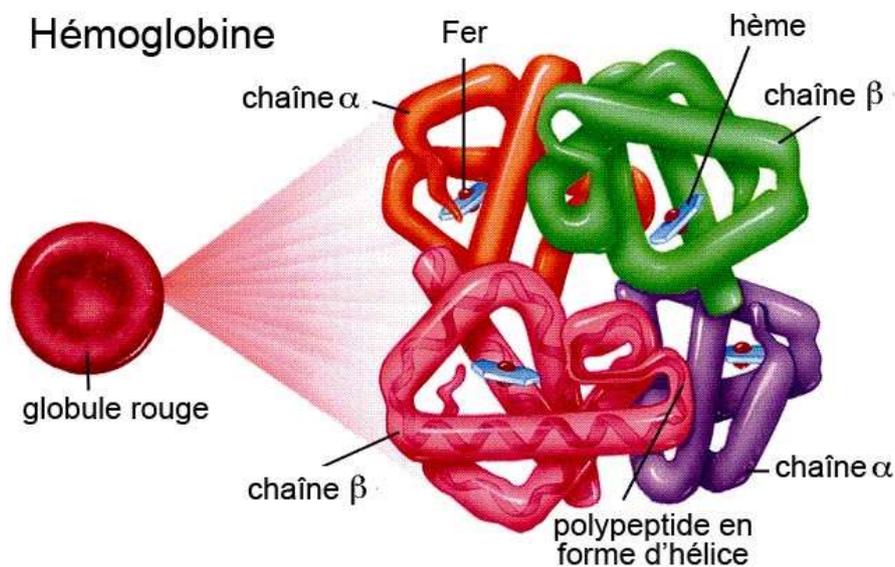


Figure 1: Structure quaternaire de l'hémoglobine et la disposition spatiale de ses différentes sous unités. (Sylvia S. Mader, Inquiry Into Life, 8th edition.)

I-1- Structure de la globine

La globine est une protéine tétramérique constituée de 4 sous unités protéiques semblables deux à deux (2 protomères α et 2 protomères β). Chaque protomère a une structure globulaire compacte ménageant une poche dans laquelle vient se nicher une molécule d'hème.

➤ Structure primaire de la globine

La chaîne de la globine, formée selon le modèle protéique, est constituée de la succession d'acides aminés dans un ordre déterminé génétiquement. Les 4 chaînes de globine sont

différentes par la nature et la séquence d'acides aminés. La chaîne de globine alpha est composée de 141 acides aminés (Sasakawa, 1961) avec un poids moléculaire de 15053,1 Da et un point isoélectrique théorique de 8,19. La chaîne de bêta-globine est composée de 145 acides aminés avec un poids moléculaire de 15954,3 Da et un point isoélectrique théorique de 7,02. Les séquences d'acides aminés, liées entre celles par des liaisons covalentes, des deux chaînes polypeptidiques α (a) et β (b) sont représentées par la figure 2.

V¹LSAADKGNV¹⁰KAAWGKVG²⁰GH²⁰AAEYGA³⁰EAL³⁰ERMFLSF⁴⁰PTTK⁴⁰TYFP⁴⁰HF⁴⁰DL⁴⁰S
H⁵⁰GSAQVKG⁶⁰HGA⁶⁰KVAAALTKAV⁷⁰EHLDDLPGAL⁸⁰SELSDLHAHK⁹⁰LRVDPVN
FKL¹⁰⁰LSHSL¹¹⁰LVTLA¹¹⁰SHLPSDFTPA¹²⁰VHASLDKFLA¹³⁰NVSTVLTSKY¹⁴⁰R

(a)

M¹LTAEEKAAV¹⁰TAFWGKVKVD²⁰EVGGEALGRL³⁰LVVYPWTQRF⁴⁰FESFGDLST
A⁵⁰DAVMNPNPKVK⁶⁰AHGK⁷⁰KVLDSP⁷⁰SNGMKGLDDL⁸⁰KGTF⁹⁰AA⁹⁰SEL⁹⁰HCDKLHV
DPE¹⁰⁰NFKLLGNVLV¹¹⁰VVLARNFGKF¹²⁰FTPVLQADFQ¹³⁰KVVAGVANAL¹⁴⁰AHRY

H

(b)

Figure 2: Structure primaire de la chaîne α (a) et la chaîne β (b) de l'hémoglobine

➤ **Structure secondaire de la globine**

La structure secondaire de la globine est due à la spiralisation de la chaîne et la formation de ponts hydrogènes, chaque chaîne comprend des segments hélicoïdaux séparés de segments rectilignes. La structure secondaire de la chaîne α (a) en hélice (b) spatiale est présentée par la figure 3 et celle de la chaîne β (a) en hélice (b) spéciale est présentée par la figure 4.

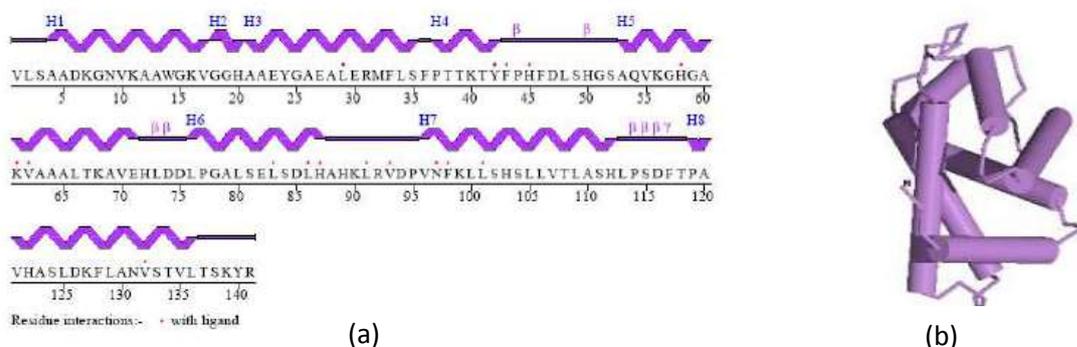


Figure 3: Structure secondaire de la chaîne α (a) en hélice (b) spatiale

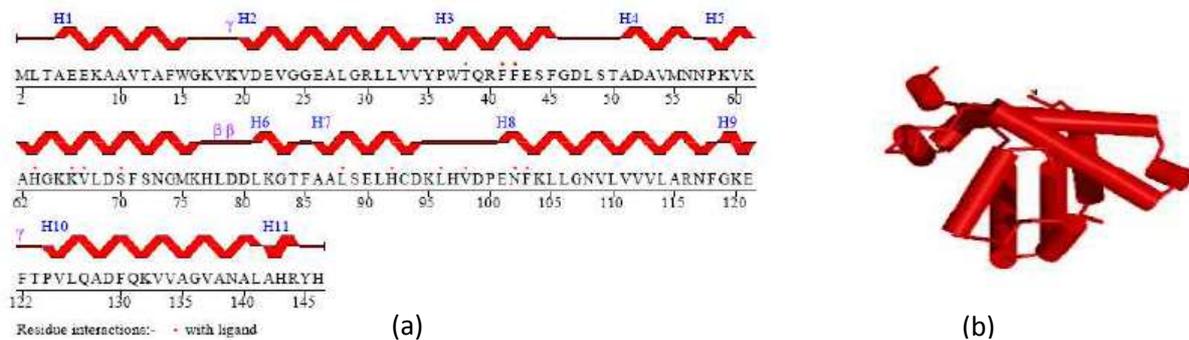


Figure 4: Structure secondaire de la chaîne β (a) en hélice (b) spatiale

➤ **Structure tertiaire de la globine**

Des liaisons physicochimiques entraînent un pelotonnement de la molécule, l'ensemble réalise dans l'espace une structure globulaire ; ménageant une cavité où se loge l'hème ; et une autre pour recevoir la tyrosine. Bien que les chaînes alpha et bêta aient des séquences différentes, elles présentent des structures tertiaires assez similaires, comme le montre la figure 5.

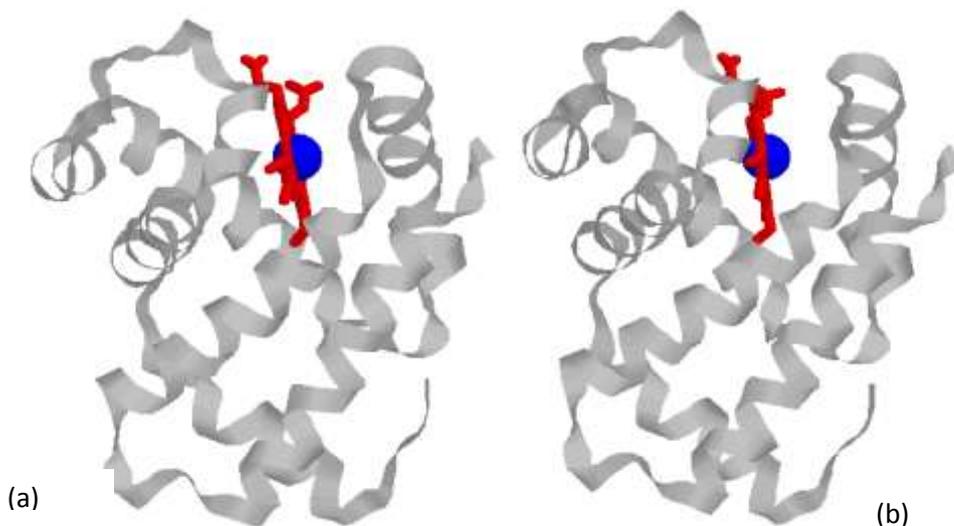


Figure 5: Structure tertiaire de la chaîne α (a) et la chaîne β (b) de l'hémoglobine (<http://acces.ens-lyon.fr/biotic/gpe/dossiers/drepanocytose/html/hbstr.htm>)

➤ **Structure quaternaire de la globine**

Les 4 monomères identiques 2 à 2 se réunissent pour former la globine. Les 2 dimères constitués de chaînes différentes sont unis par des liaisons faibles et non rigides, les chaînes d'un même dimère ont des liaisons plus fortes, au centre de la molécule existe une cavité où se loge l'acide 2,3-diphosphoglycérique (DPG), un phosphate organique très anionique qui se lie à la déoxyhémoglobine, mais non à sa forme oxygénée, en diminuant donc l'affinité pour

l'oxygène d'hémoglobine. Il est essentiel pour permettre à l'hémoglobine de décharger son oxygène dans les tissus capillaires.

La globine selon son affinité pour l'O₂ existe sous 2 formes :

- «Tendue» réduite : Les dimères sont alors réunis par 8 ponts salins renforcés par le 2,3 DPG ayant une faible affinité pour l'O₂.
- «Relaxe» : par rupture des ponts salins et éjection du 2,3 DPG permettant une affinité maximale pour l'O₂.

I-2- Structure de l'hème

L'hème une protoporphyrine avec quatre noyaux pyrroles, reliés les uns aux autres par des ponts méthènes (-CH≡) et substitués par des groupements méthyles (4), propionates (2), et vinyls (2) caractéristiques du type IX comme le présente la figure 6.

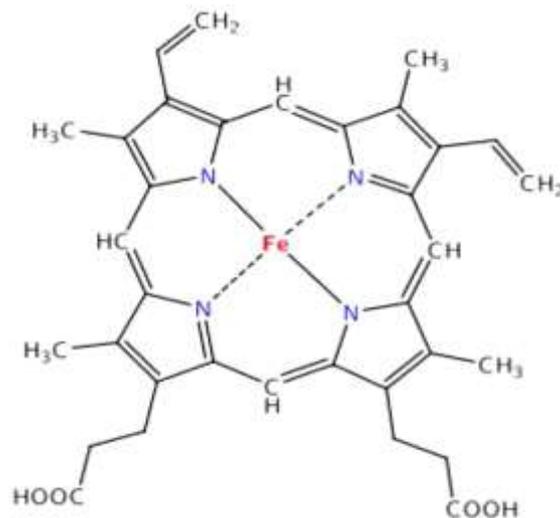


Figure 6: Représentation schématique d'un hème composé d'une porphyrine contenant un atome de fer ainsi que ces cinq liaisons de coordination

Il comporte, au milieu, un atome de fer divalent Fe²⁺ (fer ferreux). Le fer a cinq coordinations stables : quatre avec les atomes d'azote des noyaux pyrrole de l'hème et une avec l'atome d'azote d'un résidu histidine de la globine. La sixième valence fixe l'oxygène de façon réversible : c'est la forme oxygénée (oxyhémoglobine).

Après oxygénation, le fer se trouve coordonné au centre d'un octaèdre. L'oxygénation modifie l'état électronique du complexe Fe (II)-hème, comme l'indique le changement de couleur du sang sur la figure 7.

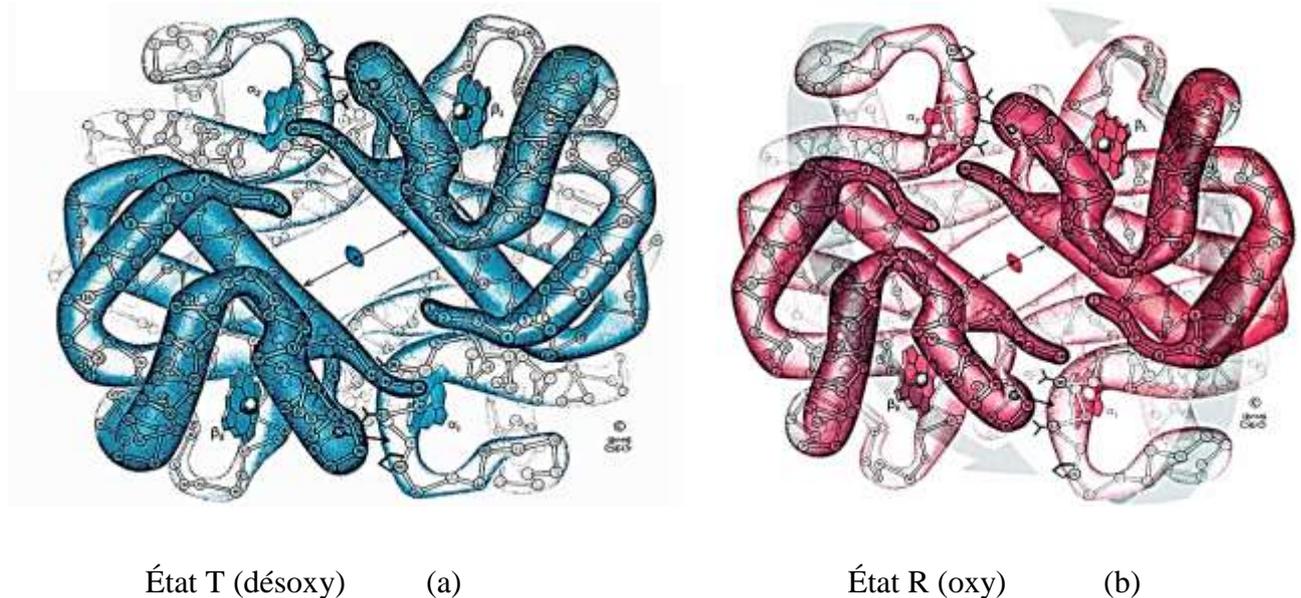


Figure 7: Structure de la désoxyhémoglobine (a) et (b) l'oxyhémoglobine

Il existe deux formes d'hémoglobine : l'oxyhémoglobine, qui est saturée avec des molécules d'oxygène et la désoxyhémoglobine, qui est désaturée avec les molécules d'oxygène. L'oxyhémoglobine a une plus grande affinité pour l'oxygène et la désoxyhémoglobine a une plus grande affinité pour le CO_2 . Par conséquent, l'oxygène se lie à l'oxyhémoglobine dans les poumons et est ensuite transporté par le courant sanguin jusqu'à ce qu'il atteigne les tissus. Là, l'oxygène est libéré de l'hémoglobine, qui transporte ensuite à la mitochondrie où il est utilisé pour la respiration aérobie. En échange, la désoxyhémoglobine, se lie à 2 protons et 2 molécules de CO_2 et les transporte vers les poumons, où le CO_2 est libéré par exhalation (Perutz, 1978).

La structure de la molécule d'hémoglobine se modifie au cours de la fixation et de la libération de l'oxygène grâce à son caractère allostérique : la fixation d'une molécule d'oxygène favorise la fixation de molécules additionnelles. Les contacts entre les différentes sous-unités de globine sont essentiels pour maintenir la stabilité de la molécule et garantir le caractère coopératif de la fonction oxyphorique. L'affinité pour l'oxygène varie en fonction du pH, de la température, de la teneur en CO_2 et d'anions comme le 2,3 diphosphoglycérate

dont la fixation au centre de la molécule d'hémoglobine diminue considérablement l'affinité de celle-ci pour l'oxygène.

L'hème est responsable de la coloration en rouge de ces deux molécules, justifiant leur nom de chromoprotéines. Le fer contenu dans l'hémoglobine est également responsable de la couleur rouge caractéristique du sang.

II- Structure et mécanisme d'action de la pepsine porcine [EC3.4.23.1]

La pepsine est une endoprotéase à aspartate sécrétée par les cellules gastriques de l'estomac des mammifères sous forme d'un précurseur inactif, le pepsinogène. Une fois qu'il est sécrété dans les conditions acides de la lumière de l'estomac, le pepsinogène est clivé, donnant la pepsine active.

II-1- Structure de la pepsine

La pepsine porcine d'une masse moléculaire de 34 600 Da, est bilobée, et composée de deux domaines analogues : N-terminal et C-terminal. Chacun de ces deux domaines est constitué de deux feuillets β et de deux courtes hélices α . Le résidu peptidique 1 à 175 forme le lobe N-terminal, et le résidu 176 à 326 constitue le lobe C-terminal. Les deux lobes sont reliés par un feuillet β à six brins antiparallèles. La pepsine comporte également trois ponts disulfures répartis comme ci-suit $Cys^{45}-Cys^{50}$, $Cys^{206}-Cys^{210}$, $Cys^{282}-Cys^{249}$ (Sepulveda et *al.*, 1975). La structure quaternaire de la pepsine porcine est présentée par la figure 8.

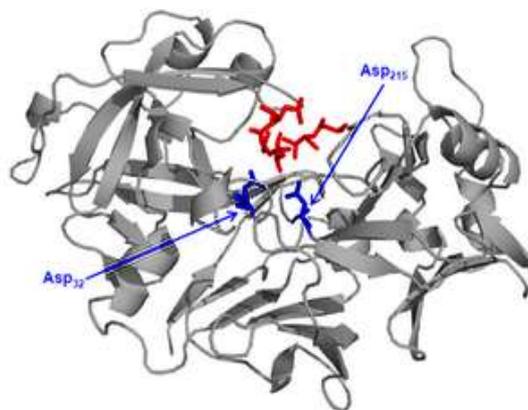


Figure 8: Structure quaternaire de la pepsine porcine

II-2- Activité enzymatique de la pepsine

La pepsine est une enzyme du suc gastrique. Elle est synthétisée sous forme de pepsinogène (proenzyme inactive) puis stockée dans les vésicules enzymatiques des cellules principales, d'où elle est excrétée au moment de la digestion. L'activation du pepsinogène en pepsine est le résultat d'une hydrolyse acide dans le milieu acide de l'estomac. Le pepsinogène subit l'hydrolyse provoquant l'activation de la pepsine. Son activité catalytique est la plus élevée entre pH 1 et 4 avec un maximum vers 2,1 et varie selon la nature du substrat (Tanaka et Yada, 2001) et perd son activité enzymatique à pH neutre. La pepsine est irréversiblement dénaturée entre pH 8,5-11 à température ambiante (Ryle, 1984).

Dubois et *al.* (2005) ont montré que le changement de pH lors de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine, influence la vitesse de catalyse, et que certaines liaisons devenaient plus accessibles à la pepsine. Le pH 5,5, en présence d'urée, permet à la pepsine d'accéder plus facilement à la liaison C-terminale de la Leucine et d'augmenter le nombre de peptides antibactériens issus de ce clivage.

II-3- Mécanisme d'action de la pepsine

La pepsine porcine est une endoprotéase fonctionnant avec l'acide aspartique catalytique dans son site actif. Le site actif de cette enzyme est disposé en son centre et composé de deux acides aspartique proches géométriquement : Asp 32 et Asp215. Son mécanisme d'action est basé sur la reconnaissance d'un motif structural dont la nomenclature a été déterminée par Schechter et Berger en 1967 : figure 9. L'enzyme va hydrolyser la liaison peptidique située entre les acides aminés P1 et P1' localisés au niveau des sites d'interaction de l'enzyme S1 et S1'.

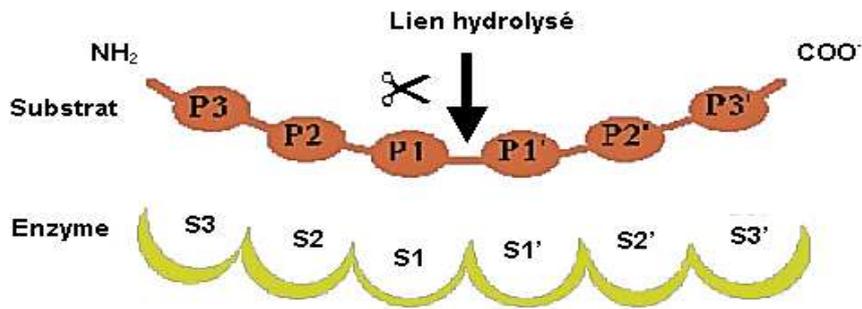


Figure 9: Nomenclature de Schechter et Berger (1967)

Le lien peptidique hydrolysé est en position P1-P1' et les sites d'interactions sur l'enzyme sont identifiés par S1 et S1'

La pepsine coupe préférentiellement les liaisons peptidiques en position C-terminale dans lesquelles un acide aminé aromatique (Tyr, Trp, Phe) ou la leucine engagent leurs fonctions amine. La pepsine, contrairement à certaines autres endopeptidases, hydrolyse seulement des liaisons peptidiques, elle n'hydrolyse pas d'amide non peptidique ou des liaisons esters.

III- Structure et mode d'action des peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens sont considérés comme l'un des éléments majeurs de la réponse immunitaire innée non seulement dans le règne animal (Wang et Wang, 2004) mais également chez les végétaux et les procaryotes (Bulet et *al.*, 2004). Ils sont issus de différents organismes allant des mammifères aux plantes en passant par les insectes et les amphibiens (Boman, 2003; Hoffmann et *al.*, 1999; Zaiou, 2007). Il s'agit d'un ensemble de peptides de petite taille 12 à 50 AA (Lai et *al.*, 2009), généralement chargés positivement, avec une structure amphipatique (Powers et Hancock, 2003; Andres et Dimarcq, 2007).

Ils sont les principales molécules effectrices de l'immunité innée de l'organisme hôte et présentent un large spectre d'activité antibactérienne, antifongique et antivirale (Bulet et *al.*, 2004). *In vitro*, la plupart des peptides antibactériens sont actifs contre différents types de bactéries: Gram positives et négatives (Zasloff, 2002; Powers et Hancock, 2003; Lai et *al.*, 2009).

La production de ces peptides antimicrobiens fait donc partie intégrante de la réponse immunitaire innée aux infections microbiennes. A l'heure actuelle, plus de 2200 peptides à activité antimicrobienne d'origines diverses ont été identifiés ou prédits. Ils présentent une

grande diversité structurale et la majorité d'entre eux est répertoriée dans des bases de données antimicrobiennes (consulté le mois d'Août 2013) <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>. Cela inclut les peptides antimicrobiens produits dans des tissus et cellules très divers de plantes, d'invertébrés, d'animaux (Ganz et *al.*, 1998; Zasloff, 2002). Ils présentent une grande diversité en termes de caractéristiques structurales, de propriétés biologiques et fonctionnelles, ainsi qu'au travers de leur distribution et expression dans les tissus (Bachère et *al.*, 2004). Une des caractéristiques générales des peptides antimicrobiens est leur capacité à augmenter la perméabilité ionique des membranes phospholipidiques (Toke, 2005).

III-1- Structure des peptides antimicrobiens

La diversité des peptides antimicrobiens est telle qu'il est difficile de les classer (Zasloff, 2002). En effet, il n'existe pas à ce jour de nomenclature universelle définie au niveau international. En effet, ils ont tout d'abord été classés en fonction de leur origine et les premiers peptides découverts portaient le nom de l'être vivant dont ils sont issus (Jenssen et *al.*, 2006; Diamant et *al.*, 2009). Cette classification n'a pas été retenue à cause de sa grande hétérogénéité. Actuellement, la charge globale et la diversité structurale des peptides antimicrobiens (secondaire et tertiaire, la présence ou non de ponts disulfures) présentent la base de leur classification (Boman, 1995; Gennaro et Zanetti, 2000; Shai, 2002). Ainsi, plusieurs classifications pour les peptides antimicrobiens ont été établies. Toutefois, on peut les répartir en quatre grands groupes : les peptides en hélice α amphiphile, les peptides en feuillet β stabilisé par un ou plusieurs ponts disulfures, les peptides linéaires riches en acides aminés particuliers et les petits peptides à structure «Random coil» (Tang et *al.*, 1999; Bulet et *al.*, 2004; Hancock et Sahl, 2006; Nedjar-Arroume et *al.*, 2008; Catiau et *al.*, 2011a,b).

➤ Les peptides en hélice α amphiphiles

Cette famille est très diversifiée et issue d'une grande variété d'organismes tels que l'Homme, les insectes, les nématodes, les amphibiens ou encore les champignons (Payne et *al.*, 1970; Zasloff, 1987; Andersson et *al.*, 2003; Zanetti, 2004; Raghuraman et Chattopadhyay, 2007).

Ces peptides sont les premiers antimicrobiens découverts et ils sont les plus étudiés en raison de leur structure et mode d'action relativement simple. Cette famille regroupe plusieurs centaines de peptides très amphiphiles et chargés. Ces peptides sont généralement cationiques et possèdent 40% à 60% de résidus hydrophobes (Tossi et *al.*, 2000). Ils sont de petite taille (< 40 acides aminés) et ne possèdent pas de résidu cystéine. Ils ne sont généralement pas

structurés en milieu aqueux, adoptent une structure secondaire caractérisée par la présence d'une ou plusieurs hélices α amphiphiles au contact de la membrane bactérienne (Brogden, 2005).

Les peptides antimicrobiens isolés d'amphibiens et d'insectes tels que les magainines, les cécropines, et la mélittine sont parmi les peptides antimicrobiens cationiques et amphiphiles les plus étudiés (Berkowitz et *al.*, 1990; Boman, 1998).

➤ Les peptides riches en ponts disulfures

Cette famille regroupe les peptides qui contiennent des paires de résidus cystéines qui sont oxydés pour former des ponts disulfures internes. Les défensines sont les plus représentatifs de ce groupe de peptides (Brogden, 2005).

Selon le nombre de cystéines, il peut y avoir un ou plusieurs ponts disulfures ce qui donne plusieurs types de structures. Il y a les peptides ayant une conformation en feuillet β avec trois ponts disulfures (les défensines de vertébrés), ceux qui possèdent une conformation en épingle à cheveux (les brévinines des amphibiens et l'androctonine du scorpion) ou encore des structures mixtes contenant à la fois des hélices α et des feuillets β (les défensines d'invertébrés et de plantes) (Bulet et *al.*, 2004).

➤ Les peptides riches en acides aminés particuliers

Cette famille de peptides linéaires est caractérisée par la prédominance d'un ou deux acides aminés. Ces peptides n'adoptent pas de structure secondaire en hélice α ou en feuillet β (Powers et Hancock, 2003) et dont les séquences primaires sont particulières avec un pourcentage élevé en certains acides aminés tels que l'histidine, l'arginine, la proline et la glycine. Contrairement aux peptides en hélice α qui procèdent par attaque de la membrane bactérienne, ces peptides inhibent la synthèse des protéines (Andreu et Rivas, 1998).

➤ Les petits peptides à structure « Random coil »

Cette famille est différente de celle des peptides antimicrobiens classiques. Ce sont des petits peptides (5 à 9 acides aminés) chargés positivement, ne possèdent pas ou peu de résidus hydrophobes, et un pourcentage élevé de structure en «Random coil» (Nedjar-Arroume et *al.*, 2008; Catiau et *al.*, 2011a,b). Généralement, en solution aqueuse, les peptides antimicrobiens

chargés positivement, avec une structure «Random coil» peuvent se structurer au contact de la membrane biologique (Powers et Hancock, 2003).

La néokyotorphine (α 137-141 : TSKYR), peptide isolé de la chaîne alpha de l'hémoglobine bovine, est le peptide le plus représentatif de cette famille. Ce peptide est capable d'interagir avec la membrane biologique par l'intermédiaire de deux acides aminés, la lysine et l'arginine qui apportent les charges positives nécessaires pour interférer avec les charges négatives des phospholipides des membranes bactériennes (Lopez et *al.*, 2006). Le déterminant antibactérien minimal responsable de l'activité antibactérienne de la néokyotorphine de la chaîne α de l'hémoglobine bovine a été déterminé (KYR) par Catiau et *al.*, 2011a.

III-2- Caractéristiques des peptides antimicrobiens

La structure des peptides leur confère certaines caractéristiques essentielles pour leur action antimicrobienne. Malgré leur grande diversité, les peptides antimicrobiens présentent des caractéristiques communes. Les principaux aspects structuraux des peptides déterminant leur action antimicrobienne sont liés essentiellement à sa charge, sa conformation, mais également son hydrophobicité et son amphiphilie (Yeaman et Yount, 2003 ; Brogden, 2005).

➤ La charge

La majorité des peptides antimicrobiens décrits dans la littérature sont des peptides cationiques qui se caractérisent par une charge nette positive allant de +2 à +9 à pH neutre (Hancock, 2006). Ce caractère cationique explique leur rapidité d'action, leur affinité sélective et leur attraction électrostatique pour les membranes anioniques des bactéries ou autres organismes chargés négativement (Yeaman et Yount, 2003). En général, plus la charge est forte, plus l'activité antibactérienne et la sélectivité augmentent, jusqu'à une valeur optimale. Une étude menée sur 2 analogues des magainines, peptides antimicrobiens isolés à partir de la peau de *Xenopus laevis*, démontre ce phénomène. L'augmentation de la charge cationique de +3 à +5 conduit à une augmentation de l'activité contre les bactéries à Gram positif et négatif. Cependant, il existe une limite au-delà de laquelle l'augmentation de la charge positive (de +5 à +7) n'induit plus d'augmentation d'activité. Cela induit au contraire, une diminution de cette activité antibactérienne et une augmentation de l'activité hémolytique (Dathe et *al.*, 2001). Cette diminution peut être expliquée par le blocage de la translocation du peptide à l'intérieur de la membrane due à une très forte interaction du peptide avec les têtes polaires des membranes bactériennes.

➤ La conformation

Les peptides n'ont pas de structure précise en milieu neutre. C'est en se fixant sur la membrane bactérienne que les peptides antimicrobiens vont prendre des structures spécifiques. Les structures linéaires en hélice α sont les plus fréquemment rencontrées. La forme en hélice α n'est pas stable dans le milieu et de nombreux travaux ont démontré le changement de conformation, de linéaire à hélicoïdale au contact d'une membrane biologique (Matsuzaki et *al.*, 1991; Bechinger et *al.*, 1993). Cependant les peptides en feuillet β , possédant des ponts disulfures, amènent à des conformations très diverses, beaucoup plus stables au contact des phospholipides membranaires, qui ont toujours un caractère amphipatique, avec des surfaces hydrophile et hydrophobe distinctes. Les formes adoptées par les peptides riches en Pro ou Arg ou riches en Trp sont moins bien connues et ont un mode d'action plus complexe. Ces conformations rigides n'étant pas affectées par l'interaction avec la membrane, leur activité pourrait être liée à une modification de leur structure quaternaire ou à une monomérisation (Yeaman et Yount, 2003).

Les formes cycliques des peptides sont plus rigides que les formes linéaires, et ils sont moins efficaces lors de la fixation initiale à la paroi bactérienne ; mais à concentration équivalente, elles présentent la même efficacité de perméabilisation membranaire. Ces conformations rigides cycliques n'étant pas affectées par l'interaction avec la membrane, leur activité peut être liée à une modification de leur structure tertiaire. Des peptides antimicrobiens ont la capacité de se lier entre eux, par simple orientation favorable de leurs domaines hydrophiles et hydrophobes. Cette aptitude d'autoassemblage est à l'origine de la formation des pores dans les membranes des bactéries, virus et champignons (Yeaman et Yount, 2003).

➤ L'hydrophobie

L'hydrophobie est définie comme le pourcentage de résidus hydrophobes au sein d'un peptide qui influe sur la capacité intrinsèque du peptide à se mouvoir depuis une phase aqueuse vers une phase hydrophobe (Dathe et Wieprecht, 1999).

La plupart des peptides antimicrobiens possèdent environ 50% de résidus hydrophobes. En effet, les peptides antimicrobiens ont une alternance de parties cationiques et hydrophobes. La partie cationique permet leur fixation aux têtes polaires des phospholipides des membranes des agents microbiens chargées négativement. Les parties hydrophobes permettent ensuite

leur insertion dans la membrane cellulaire de l'agent, la déstabilisant et entraînant la lyse par entrée d'eau (Hancock et Scott, 2000).

Les interactions hydrophobes jouent un rôle majeur dans la partition des peptides au sein des bicouches lipidiques membranaires. Il s'agit donc d'un paramètre clef modulant l'activité des peptides antimicrobiens (Dathe et Wieprecht, 1999 ; Yeaman et Yount, 2003). Pour être actif un peptide antimicrobien doit posséder deux particularités par rapport à son hydrophobicité (Dathe et Wieprecht, 1999) :

- Une bonne solubilité dans un environnement aqueux afin de permettre un transport rapide vers sa cible.
- Une capacité d'interaction avec la région hydrophobe de la bicouche membranaire pour la déstabiliser et la perméabiliser.

Une insuffisance ou au contraire un excès d'hydrophobicité conduisent respectivement à une affinité trop faible pour les lipides ou à l'agrégation voire la précipitation en milieu aqueux.

Les études analysant l'impact de l'hydrophobicité sur les activités d'analogues de la magainine 2 tout en fixant les autres paramètres structuraux (Dathe et *al.*, 1997; Wieprecht et *al.*, 1997), montrent que l'augmentation de l'hydrophobicité est fortement corrélée à une augmentation de l'hémolyse et, dans une moindre mesure, à une augmentation de l'activité antimicrobienne. De plus, les auteurs ont mis en évidence que l'augmentation de l'hydrophobicité réduisait la spécificité de l'activité antimicrobienne. Les effets de l'hydrophobicité portent principalement sur le pouvoir de perméabilisation des membranes neutres (phosphatidylcholine). Son influence sur la perméabilisation de membranes négatives contenant des phospholipides anioniques (phosphatidylglycérol) est beaucoup moins marquée. Les auteurs l'expliquent en postulant qu'alors, les interactions électrostatiques compensent la diminution des interactions hydrophobes (Dathe et Wieprecht, 1999).

➤ **L'amphipacité**

Lors de leur interaction avec les membranes cibles, les peptides antimicrobiens forment une structure fortement amphipatique. L'amphipacité représente l'abondance et la polarisation relative des domaines hydrophobes et hydrophiles. Difficile à mesurer, ce paramètre est défini par le moment hydrophobe qui est la résultante vectorielle des forces hydrophiles et

hydrophobes présentes dans la structure normalisée à un idéal d'hélicité (Eisenberg, 1984). Il existe des valeurs optimales de ces différents caractères pour avoir un effet antibactérien maximal sans augmenter la toxicité sur la cellule de l'hôte.

L'augmentation de l'amphiphilie, qui peut se faire par l'augmentation du nombre d'hélices, entraîne l'augmentation de l'activité antimicrobienne du peptide sur les membranes anioniques, mais a également un effet prononcé sur les membranes neutres, et donc rend le peptide plus hémolytique (Yeaman et Yount, 2003).

III-3- Modes d'action des peptides antimicrobiens

Chaque peptide antimicrobien possède un mode d'action qui lui est propre et dépendant de ses caractéristiques intrinsèques, mais il existe certains points communs permettant de mettre en avant certaines généralités. Les modes d'actions des peptides antimicrobiens peuvent être ainsi regroupés, en deux catégories :

- une privilégiant une action directement à la surface de la bactérie : modèles de perméabilisation membranaire reposant sur la perturbation de la membrane cytoplasmique.
- une seconde indiquant une action intracellulaire provoquant la perturbation du fonctionnement de la cellule : modèle de cible intracellulaire (Brogden, 2005 ; Jenssen et *al.*, 2006; Yeaman et Yount, 2003).

La plupart des peptides antimicrobiens agissent directement sur la membrane cytoplasmique des micro-organismes entraînant ainsi la mort de la cellule par des phénomènes osmotiques rapides entraînant la perturbation des membranes cellulaires, leur structure amphiphile joue un rôle important dans ce mécanisme. En effet, la charge externe des phospholipides de la membrane cellulaire et la distribution de charge des peptides influencent les interactions entre les peptides et les membranes biologiques (Oren et Shai, 1998 ; Cudic et Otvos, 2002). Cependant, certains, agissent par inhibition de mécanismes intracytoplasmiques tels que la synthèse d'ADN, la synthèse de protéines, des activités enzymatiques, ou encore par des perturbations dans la formation des composants de la membrane (Jenssen et *al.*, 2006).

III-3-1- Mécanismes d'action des peptides perméabilisant les membranes

Dans la plupart des mécanismes décrits, les peptides antimicrobiens s'adsorbent sur la membrane cellulaire des microorganismes puis la perméabilisent, perturbant ainsi différentes fonctions (Peschel, 2002 ; Brogden, 2005).

La perméabilisation résulte d'une interaction des peptides avec les bicouches de phospholipides membranaires (que ce soit la membrane externe des bactéries à Gram négatif ou la membrane plasmique des bactéries à Gram positif et négatif) :

- Soit par formation de pores ou de canaux, suivie de fuite du contenu cytoplasmique qui engendre l'osmolyse de la cellule (Yang *et al.*, 2000),
- Soit par rupture de la membrane par excès d'incorporation de peptides (Tossi *et al.*, 2000).

Le mode d'action des peptides antimicrobiens se déroule en 3 étapes comprenant la fixation initiale (dépendante de la concentration du peptide et de sa capacité à s'autostructurer), l'intégration dans la membrane (dépendante de la conformation et de la capacité d'autoassemblage des peptides) puis l'aboutissement à la mort cellulaire (par un phénomène de perméabilisation membranaire) (Daffre *et al.*, 2008). Pour comprendre et expliquer la perméabilisation de la membrane par les peptides antimicrobiens, plusieurs modèles ont été proposés (Brogden, 2005).

a) Attraction entre le peptide antimicrobien et la membrane de la bactérie

Avant de déstabiliser la membrane ou de perturber le fonctionnement de la bactérie, l'action des peptides antimicrobiens nécessite une première étape d'interaction avec l'enveloppe bactérienne. L'interaction des peptides avec la membrane implique principalement deux caractéristiques de liaison : les interactions hydrophobes entre les chaînes acyles lipidiques et les chaînes hydrophobes des peptides et les interactions électrostatiques entre les chaînes hydrophiles des peptides et les têtes polaires des phospholipides.

Chez les bactéries à Gram-négatif, l'attraction initiale se fait par l'intermédiaire de liaisons électrostatiques entre le peptide cationique et les phospholipides chargés négativement au niveau de la membrane externe (Jenssen *et al.*, 2006). L'interaction se fait alors grâce aux groupements phosphates situés au niveau du lipopolysaccharide (LPS). En effet, le peptide entre en compétition avec les cations divalents (Mg^{2+}) présents à la surface du LPS. Grâce à

son affinité pour le LPS, le peptide va déplacer les cations divalents et conduire à sa propre translocation au travers de la membrane externe (Hancock, 1997).

Chez les bactéries à Gram positif, l'attraction a lieu entre le peptide antimicrobien et le peptidoglycane. C'est le mode d'attraction supposé pour la plupart des peptides antimicrobiens. En effet, de nombreuses études ont démontré une forte corrélation entre la charge du peptide et l'attachement à la membrane (Bessalle *et al.*, 1992; Vaz Gomes *et al.*, 1993; Dathe *et al.*, 2001).

Certains peptides interagissent préférentiellement avec des molécules spécifiques de l'enveloppe. Ainsi, la nisine qui se lie spécifiquement au précurseur de la biosynthèse du peptidoglycane. Son spectre d'activité est dirigé contre les bactéries Gram positif riches en peptidoglycane (Breukink et de Kruijff, 1999).

b) Attachement et fixation de peptides antimicrobiens à la surface de la bactérie

Une fois à proximité de la membrane, les peptides antimicrobiens vont se fixer à la membrane externe pour les bactéries à Gram négatif ou au peptidoglycane pour les bactéries à Gram positif. Cette fixation se fait grâce aux groupements phosphates qui sont situés au niveau du LPS pour les bactéries à Gram négatif et des acides lipoteichoïques présents à la surface des bactéries à Gram positif. Il a été montré que les peptides antimicrobiens en interaction avec différentes membranes ont deux états de fixation : un état de surface appelé «état S» et un état de formation de pore appelé «état I» (Huang, 2000).

Pour de faibles ratios peptides/lipides et sous l'effet hydrophobe, les peptides s'adsorbent à la membrane en s'enfouissant entre les têtes polaires des lipides. Il s'agit d'état inactif «état S» configuration dans laquelle les peptides sont orientés parallèlement à la membrane de la bactérie, provoquant ainsi un amincissement de celle-ci (Yang *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003). Le degré d'amincissement est lié à la concentration en peptide et à la valeur de la constante élastique de la membrane (Huang, 1986 ; Huang, 1995). Lorsque ce ratio augmente, les peptides vont s'orienter perpendiculairement à la membrane, et s'y insérer : ils vont ainsi former des pores transmembranaires, et sont alors dans un «état I».

c) Interactions entre le peptide antimicrobien et la membrane bactérienne

Après fixation, les peptides vont entraîner la déstabilisation de la membrane externe ou plasmique ; cela aboutit à une modification de la perméabilité membranaire. La déstabilisation de la membrane peut se faire selon trois modèles distincts, présentés par la figure 10 «*barrel stave*» (a), «*Pores toroïdaux*» (b) et «*Capet*»(c) (Yeaman et Yount, 2003).

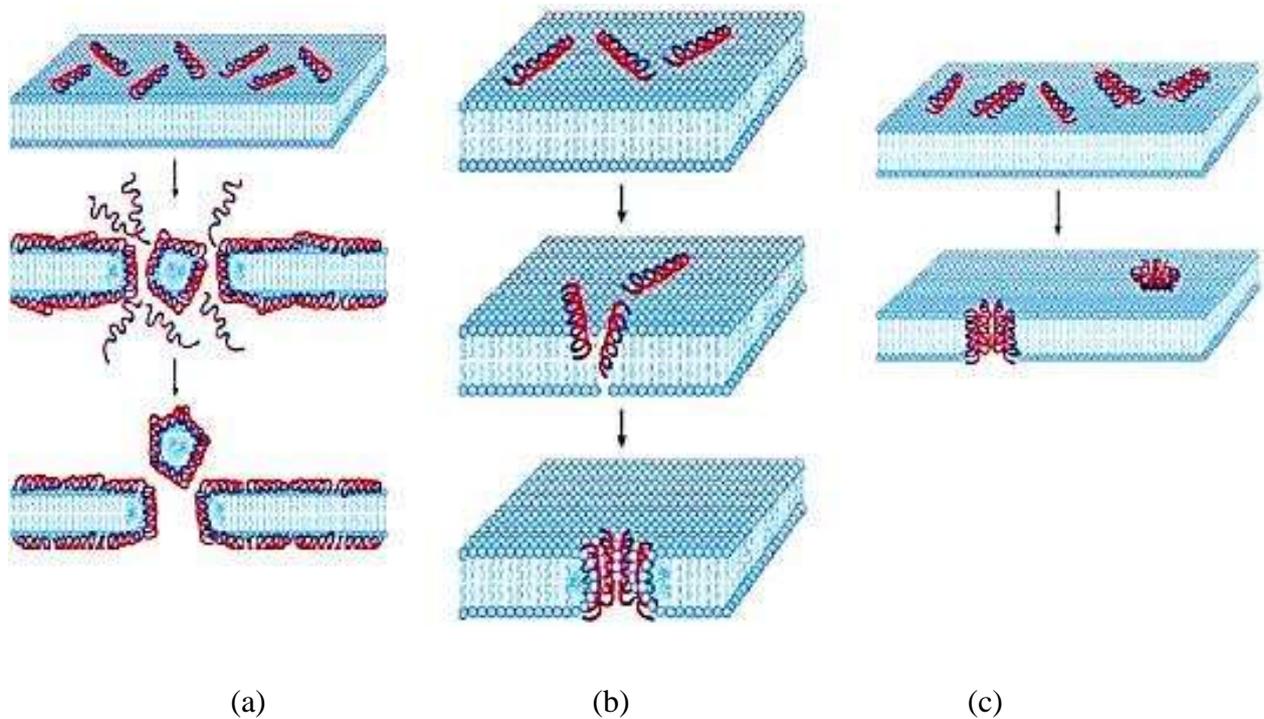


Figure 10: Modèles d'interaction peptide/membrane «Barrel stave» (a), «Pores toroïdaux» (b) et «Capet»(c) (Brogden, 2005)

➤ Le modèle en douves de tonneaux «barrel stave»

Le modèle «Barrel-stave» est le modèle classique qui permet de comprendre le mécanisme de perméabilisation de la membrane cytoplasmique, il explique la formation des pores sous forme de tonneaux dans des bicouches lipidiques planes. Ce mécanisme concerne certains peptides hélicoïdaux (He et *al.*, 1996). Ce modèle est appelé également modèle du tonneau ou modèle de l'amas hélicoïdal (Baumann et Mueller, 1974 ; Bechinger et *al.*, 1999). Dans ce modèle, les peptides se fixent ensemble et s'insèrent dans la bicouche de membrane de telle sorte que les régions peptidiques hydrophobes s'alignent avec la région de bicouche lipidique et les régions peptidiques hydrophiles forment la région intérieure du pore (Baumann et Mueller, 1974 ; He et *al.*, 1996). Dans ce mécanisme, les peptides organisés en hélices α amphipathiques sont réunis à la surface de la membrane, leurs domaines hydrophobes sont en

interaction avec la partie non polaire des chaînes acyles de la membrane, alors que les surfaces hydrophiles se tournent et pénètrent vers l'intérieur pour former un pore aqueux comme le montre la figure 11 (Ehrenstein et Lecar, 1977; Breukink et De Kruijff, 1999) (Shai et Oren, 2001; Yeaman et Yount, 2003).

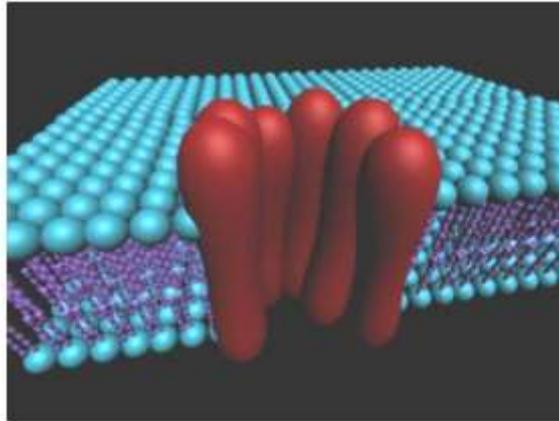


Figure 11: Modèle en "douves de tonneaux" (Etienne, 2004)

Les canaux transmembranaires ainsi formés vont conduire à la fuite du contenu cytoplasmique et à la lyse de la bactérie par un déséquilibre osmotique. Plusieurs études révèlent que la paradaxine de certains poissons (Rapaport et Shai, 1991) et l'alaméthicine d'origine fongique (Sansom, 1993 ; Chen *et al.*, 2003) détruisent les bactéries selon ce modèle «barrel stave».

➤ **Le modèle en pores toroïdaux «toroïdal-pore»**

Le modèle «Pore toroïdal», également connu sous le nom de modèle wormhole, les peptides antimicrobiens, sous forme d'hélices α , forment des structures amphiphiles au contact de la membrane puis y enfouissent leur partie hydrophobe. Cette insertion déplace les têtes hydrophiles des phospholipides induisant ainsi une courbure de la membrane (Hirsh *et al.*, 1996). À partir d'un certain seuil, les peptides s'orientent perpendiculairement à la membrane, jusqu'à produire un pore dont les parois sont formés par les peptides et les phospholipides auxquels ils sont associés comme le montre la figure 12 (Matsuzaki *et al.*, 1996; Yeaman et Yount, 2003).

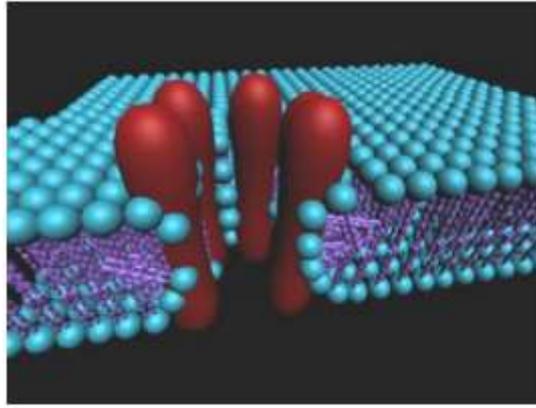


Figure 12: Modèle des "pores toroïdaux"(Etienne, 2004)

Ce modèle diffère du modèle précédent par le fait que les lipides font partie intégrante du pore (Brogden, 2005). Ainsi, l'intercalation dynamique entre peptide et lipide entraîne la jonction des deux feuillet lipidiques, formant un trou toroïdal. Ce type de pores transmembranaires a été étudié et décrit notamment pour certains peptides hélicoïdaux comme les magainines de la peau des grenouilles ou encore la méllitine peptide antimicrobien du venin d'abeille (Matsuzaki et *al.*, 1996; Yang et *al.*, 2001).

➤ **Le modèle en tapis « carpet »**

Le modèle de «carpet» suggère que les peptides s'orientent de façon strictement parallèle vis-à-vis de la membrane (Pouny et *al.*, 1992). Par ailleurs, la présence de lipides chargés négativement aide à la formation d'un tapis qui s'insinue plus ou moins entre les têtes hydrophiles des phospholipides, provoquant des déplacements et des perturbations dans la fluidité de la membrane aboutissant à sa rupture (Oren et Shai, 1998). Contrairement au modèle de barrel-stave, les peptides sont en contact avec les têtes polaires des lipides durant tout le processus de perméabilisation, mais ils ne sont pas insérés dans le cœur hydrophobe de la membrane comme le montre la figure 13.

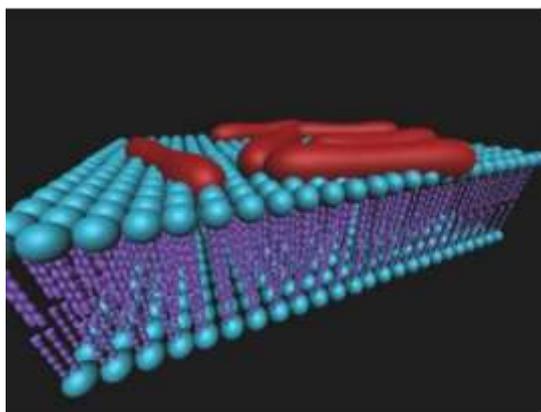


Figure 13: Modèle en tapis (Etienne, 2004)

En effet, les peptides vont se fixer à haute concentration à la surface de la membrane par des interactions électrostatiques de façon similaire à celle d'un détergent, entraînant la formation de micelles et de pores dans la membrane lorsqu'une certaine concentration peptidique est franchie (fort ratio peptide/lipide) (Shai et Oren, 2001 ; Jenssen et *al.*, 2006). Il est alors nécessaire que les peptides recouvrent toute la surface de la membrane, et qu'ils se trouvent en concentration efficace pour agir. Ce modèle diffère des deux précédents de fait que les peptides ne s'insèrent pas dans la membrane lipidique et qu'il n'est pas nécessaire qu'ils adoptent une structure en hélice α dans ce mode d'action. Ce modèle fut envisagé pour dans le cas de la cécropine P1 de l'hémolymphe du papillon de nuit (Gazit et *al.*, 1996 ; Yeaman et Yount, 2003) et des dermaseptines des amphibiens (Pouny et *al.*, 1992; He et *al.*, 1996 ; Dagan et *al.*, 2002).

➤ **Le model de Shai-Mastsuzaki et Yang**

Shai, Mastsuzaki et Yang ont repris les différentes hypothèses émises jusqu'à présent sur les mécanismes d'action des peptides antibactériens cationiques en les associant chronologiquement. Ainsi, il a été suggéré que les canaux ioniques, les pores membranaires et plus généralement la rupture de la membrane n'indiquent pas trois modèles distincts, mais qu'ils évoluent les uns après les autres comme le montre la figure 14 (Matsuzaki, 1999 ; Shai, 1999 ; Yang et *al.*, 2000).

Après fixation, les peptides s'étalent en tapis, puis en s'intégrant déstabilisent la membrane. Si la membrane n'est pas rompue, le mécanisme se poursuit par la pénétration des hélices α et la formation de pores conduisant soit à des désordres osmotiques mortels pour la cellule, soit à la diffusion de fragments peptidiques à cible intracellulaire (Zaslhoff, 2002).

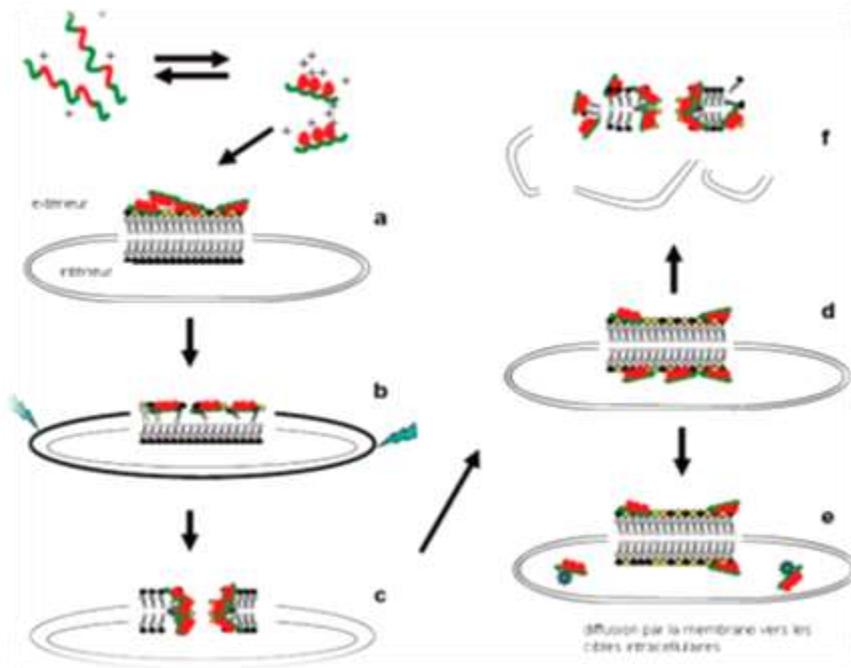


Figure 14: Modèle de Shai-Matsuzaki-Yang (Zasloff, 2002)

Ce mécanisme a été démontré pour un peptide en hélice α et les différentes étapes sont décrites par la figure 14 :

Étape a. Formation d'un tapis sur la membrane bactérienne (lipopolysaccharides des bactéries Gram-négatif, les peptidoglycanes et le lysophosphatidylglycérol des bactéries Gram-positif): Les peptides étant chargés positivement sont attirés par des forces électrostatiques aux phospholipides chargés négativement,

Étape b. Micellisation de la bicouche lipidique par interaction des peptides avec la membrane.

Étape c. Formation de pores, ayant pour conséquence la fuite des composants intracellulaires. Si cette déstabilisation ne suffit pas à entraîner la rupture de la membrane, le mécanisme peut alors se poursuivre par :

Étape d. Déplacement des peptides et des lipides au niveau de la bicouche lipidique, provoquant l'une ou l'autre des réactions suivantes :

Étape e. Diffusion du peptide jusqu'à des cibles intracellulaires ;

Étape f. Désorganisation générale de la membrane, conduisant à sa désintégration par l'action du peptide antimicrobien (Zasloff, 2002).

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

Un modèle a été proposé plus récemment à partir de courts polymères synthétiques, et une simulation informatique. Ce mécanisme perméabilise la membrane sans destruction de sa structure. Les différentes étapes de ce mécanisme sont expliquées par la figure 15. Au début, les peptides amphipatiques s'infiltrent dans l'épaisseur de la membrane en restant liés aux têtes chargées des phospholipides (figure 15 a). Puis, quand la concentration peptidique atteint un certain seuil, les molécules d'eau ou d'éléments hydratés traversent la membrane en passant de peptide en peptide, passant d'un domaine hydrophile à un autre (figure 15 b). Ce qui entraîne, finalement, une dilution des éléments cytoplasmiques et l'augmentation de la pression de la bactérie engendrant son « explosion » (figure 15 c) (Lopez et *al.*, 2006).

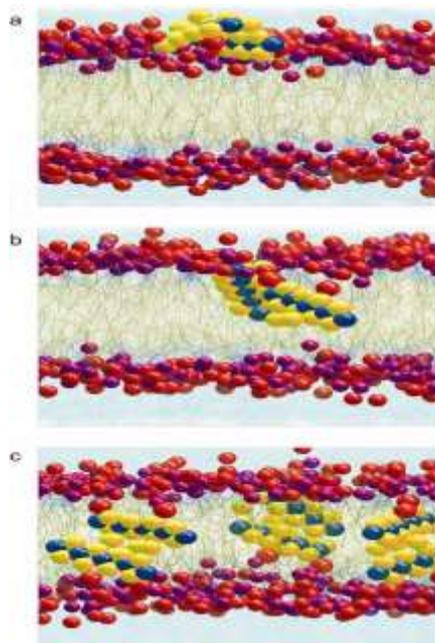


Figure 15: Mécanisme hypothétique d'apprêtement et de pénétration d'un peptide antimicrobien : Coarse grain molecular dynamics (Lopez et *al.*, 2006)

Ce mécanisme est modélisé pour de petites molécules amphipatiques synthétiques et pourrait s'appliquer à des peptides naturels de taille trop petite pour traverser la membrane.

d) La mort cellulaire : dysfonction membranaire

La mort de la bactérie est causée par les dégâts provoqués par les peptides au niveau de la membrane. Ainsi, les perturbations locales de l'organisation des phospholipides de la membrane induisent la fuite des métabolites cytoplasmiques, puis la dépolarisation

membranaire, l'arrêt de l'activité synthétique (du peptidoglycane et d'autres polymères), et finit par entraîner la mort de la bactérie (Yeaman et Yount, 2003).

On peut donc attribuer la mort de la bactérie à la modification de la perméabilité de la membrane, à la perte en ions et en métabolites, et à l'arrêt de fonctions essentielles comme la respiration (Blondelle et *al.*, 1999; Hancock et Chapple, 1999). Toutefois, il apparaît que la perméabilisation de la membrane ne suffit pas à tuer la cellule et qu'un effet synergique de plusieurs peptides antimicrobiens soit nécessaire. Ces mécanismes ne sont pas encore bien élucidés, et un même peptide semble pouvoir agir à plusieurs niveaux, ou faciliter l'action d'autres protéines impliquées dans les phénomènes de cytolyse.

III-3-2-Mécanisme agissant au niveau intracellulaire

Les modes d'action les plus connus sont indéniablement les ruptures de membranes et la formation de pores. Toutefois, de nombreux peptides ont des mécanismes d'action, intracellulaires comme présenté dans la figure 16. Powers et Hancock (2003) ont montré que des peptides riches en arginine peuvent à la fois être transportés à travers la membrane externe des bactéries à Gram négatif, mais également à travers la membrane plasmique, que ce soit pour les bactéries à Gram négatif ou à Gram positif. Ces peptides passent la membrane plasmique, puis interagissent avec l'ADN, l'ARN et/ou des protéines, et peuvent inhiber différentes voies métaboliques (figure 16) (Jenssen et *al.*, 2006). Il a été démontré que les histatines agissent, en inhibant l'activité enzymatique indispensable à la survie de la cellule (Brogden, 2005).

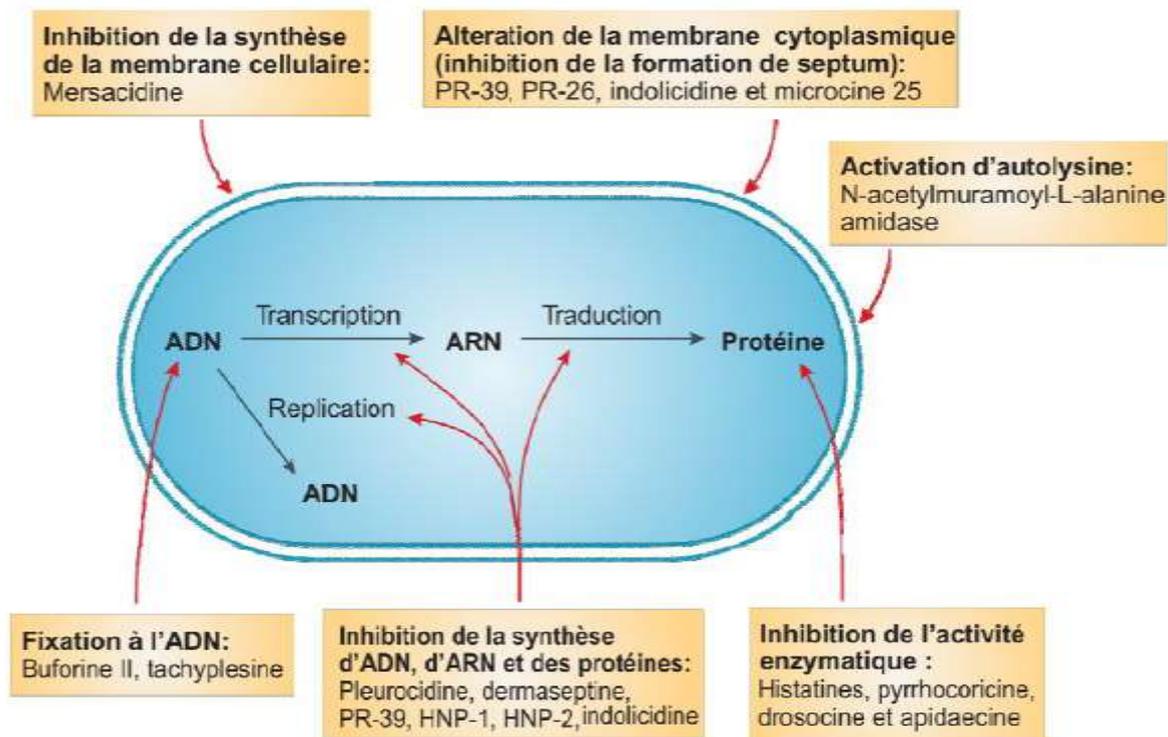


Figure 16: Mode d'action intracellulaire des peptides antimicrobiens (Brogden, 2005)

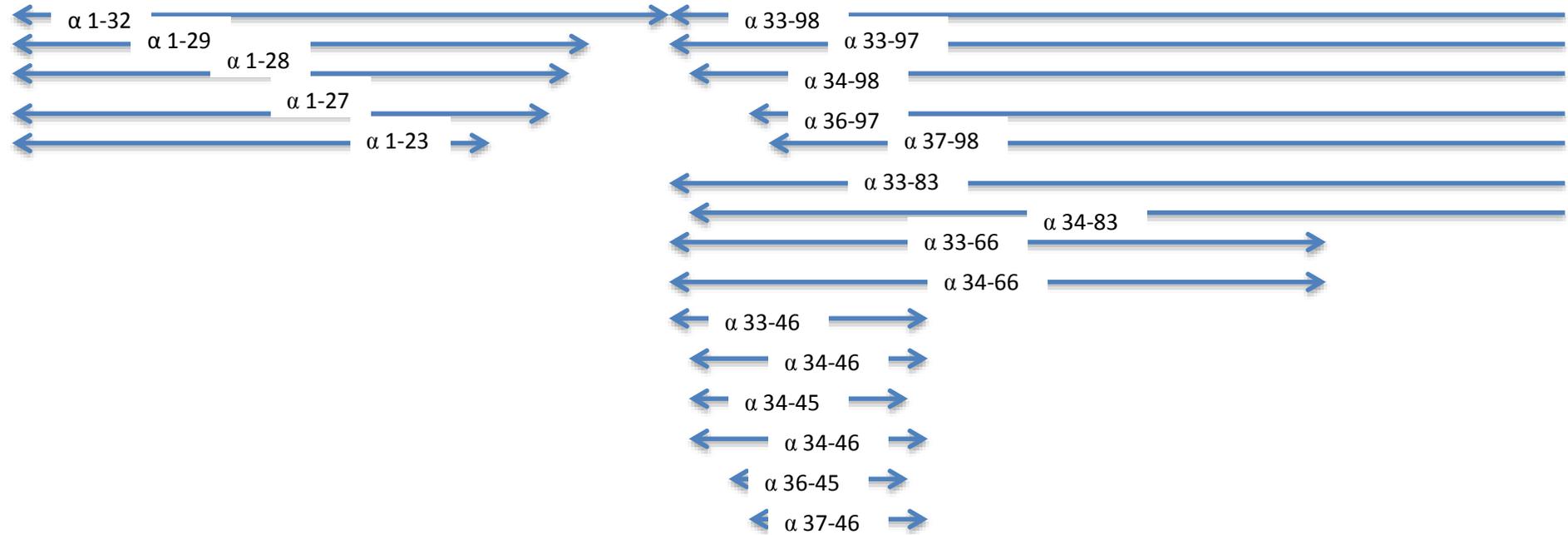
IV- Obtention de peptides antibactériens par hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine

L'hémoglobine bovine a été décrite par plusieurs auteurs comme une source importante de peptides actifs (Piot *et al.*, 1992; Zhao *et al.*, 1994; Ivanov *et al.*, 1997), notamment des peptides antibactériens obtenus par hydrolyse pepsique des chaînes α et β de l'hémoglobine bovine native ou dénaturée (Nedjar-Arroume *et al.*, 2006; Nedjar-Arroume *et al.*, 2008; Yaba Adje *et al.*, 2011b). Trente peptides antibactériens issus de l'hydrolyse en milieu aqueux de l'hémoglobine bovine native ou dénaturée ont été identifiés, dont 24 peptides dérivés de la chaîne α et 6 peptides dérivés de la chaîne β . Ces peptides actifs sont classés en trois familles pour la chaîne α et en deux familles pour la chaînes β : la famille $\alpha 1$ dérivée du peptide $\alpha 1-32$, la famille $\alpha 2$ dérivée du peptide $\alpha 33-98$, la famille $\alpha 3$ dérivée du peptide $\alpha 107-141$, et les familles $\beta 1$ et $\beta 2$ dérivées respectivement des peptides $\beta 1-30$ et $\beta 114-145$ (Nedjar-Arroume *et al.*, 2008). L'hydrolyse en milieu hydroalcolique de l'hémoglobine bovine native ou dénaturée a permis l'identification de nouvelles séries peptidiques dont la famille $\alpha 67-106$ constituée des peptides $\alpha 67-106$, $\alpha 73-105$, $\alpha 86-109$, $\alpha 96-106$, $\alpha 99-105$ et $\alpha 99-106$ est spécifique à ces hydrolysats hydroalcoliques. La figure 17 présente les peptides antibactériens obtenus par hydrolyse pepsique en milieu aqueux de l'hémoglobine bovine native ou dénaturée en [bleu](#)

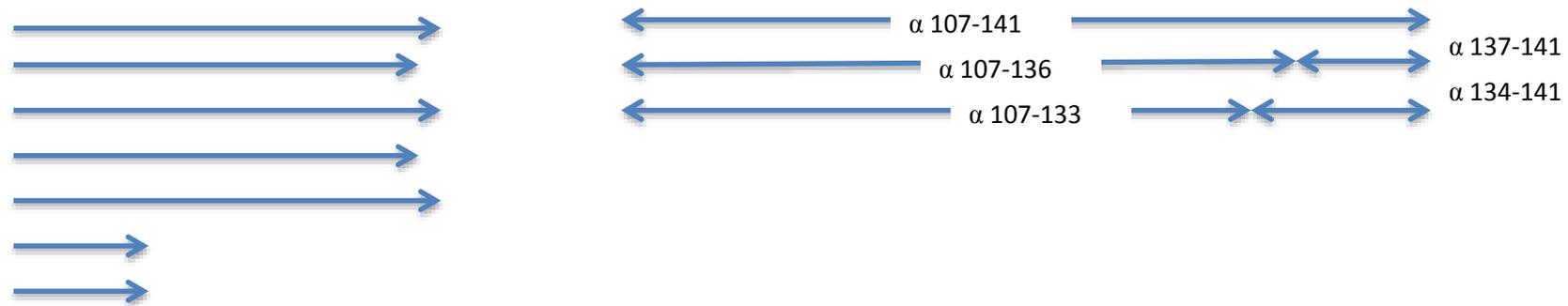
(Nedjar-Arroume et *al.*, 2008). La figure 18 présente les peptides obtenus par hydrolyse pepsique en milieu hydroalcoolique de l'hémoglobine bovine, les peptides spécifiques aux hydrolysats hydroalcoliques en rouge et les peptides communs avec les hydrolysats pepsiques de l'hémoglobine bovine en absence d'alcool en violet (Yaba Adje et *al.*, 2011b). Le tableau 1 présente un résumé de l'ensemble de ces peptides antibactériens.

Chaîne α

V¹LSAADKGNV¹⁰KAAWGKVGGH²⁰AAEYGAEALE³⁰RMFLSFPTTK⁴⁰TYFPFDLSH⁵⁰GSAQVKGHGA⁶⁰KVAAALTKAV⁷⁰EHLDDLPG



AL⁸⁰SELSDLHAHK⁹⁰LRVDPVNFKL¹⁰⁰LSHSLVTLA¹¹⁰SHLPSDFTPA¹²⁰VHASLDKFLA¹³⁰NVSTVLTSKY¹⁴⁰R



Chaîne β

MLTAEKAAV¹⁰TAFWGKVKVD²⁰EVGGEALGRL³⁰LVVYPWTQRF⁴⁰FESFGDLSTA⁵⁰DAVMNNPKVK⁶⁰AHGKKVLDSF⁷⁰SNGMKHLD



DL⁸⁰KGTFAAALSEL⁹⁰HCDKLHVDPE¹⁰⁰NFKLLGNVLV¹¹⁰VVLARNFGKE¹²⁰FTPVLQADFQ¹³⁰KVVAGVANAL¹⁴⁰AHRYH

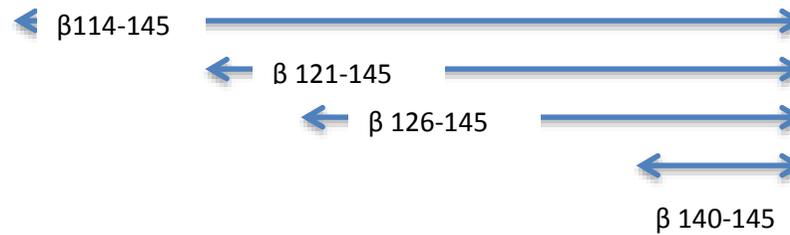
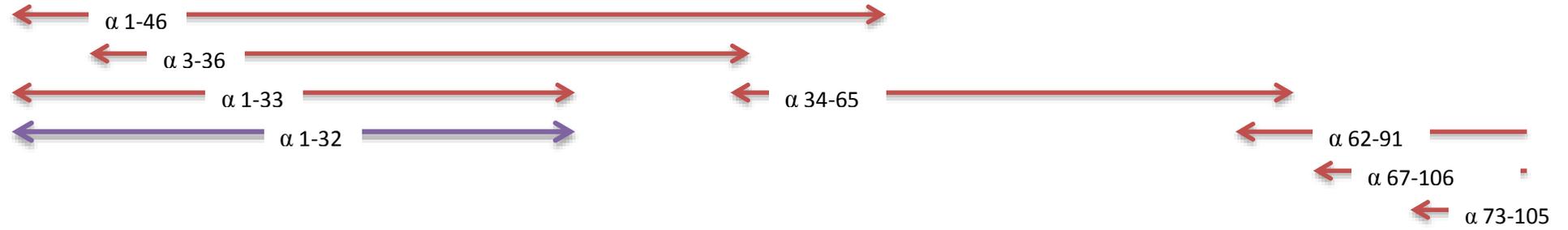


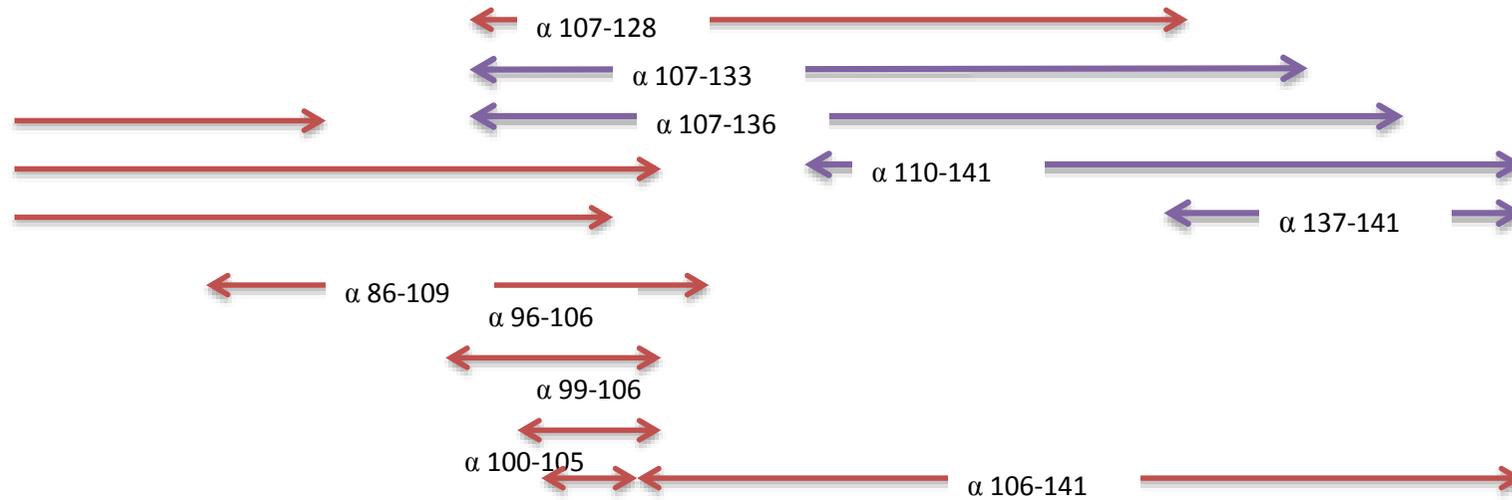
Figure 17: Cartographie peptidique des peptides antibactériens de l'hydrolysats pepsique de l'hémoglobine bovine en milieu aqueux (Nedjar-Arroume et *al.*, 2006; Nedjar-Arroume et *al.*, 2008)

Chaîne α

V¹LSAADKGNV¹⁰KAAWGKVG²⁰GHAAEYGA³⁰EALERMFLSF⁴⁰P⁴⁰TTK⁴⁰TYFP⁵⁰HF⁵⁰DL⁵⁰SH⁵⁰GSAQ⁶⁰VK⁶⁰GH⁶⁰GAK⁶⁰VAAAL⁷⁰TKAV⁷⁰EHLDDL⁷⁰PG



AL⁸⁰SELSDLHAHK⁹⁰LRVDPVNF¹⁰⁰KL¹⁰⁰L¹¹⁰SHSLLV¹¹⁰TLA¹¹⁰SHLPSDF¹²⁰TPA¹²⁰VHASL¹³⁰DKFLA¹³⁰NVSTVL¹⁴⁰TSKY¹⁴⁰R



Chaîne β

MLTAEKAAV¹⁰TAFWGKVKVD²⁰EVGGEALGRL³⁰LVVYPWTQRF⁴⁰FESFGDLSTA⁵⁰DAVMNPKVK⁶⁰AHGKKVLD⁷⁰SF⁷⁰SNGMKHLD

← β 1-30 →

DL⁸⁰KGTFAA⁹⁰SEL⁹⁰HCDKLHVDPE¹⁰⁰NFKLLGNVLV¹¹⁰VVLARNFGKE¹²⁰FTPVLQADFQ¹³⁰KVVAGVANAL¹⁴⁰AHRYH

β 79-125

← →

β 79-104

← →

β 85-105

← →

β 114-124

← →

β 114-145

← →

β 126-145

← →

←

↔

: Les peptides communs avec l'hydrolysat pepsique de l'hémoglobine bovine en absence d'alcool

Figure 18: Cartographie peptidique des peptides antibactériens de l'hydrolysat pepsique de l'hémoglobine bovine en milieu hydroalcoolique (Yaba Adje et *al.*, 2011b)

Tableau 1 : Peptides antibactériens issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine

Fragments		Milieu d'hydrolyse	Souches	Références
Chaîne α	Chaîne β			
α 1-32	β 1-30	Milieu aqueux	<i>Salmonella enteritidis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Listeria innocua</i> <i>Micrococcus luteus</i>	Nedjar-Arroume et al., 2008
α 1-29	β 1-13			
α 1-28				
α 1-27	β 114-145			
α 1-23	β 121-145			
	β 126-145			
	β 140-145			
α 33-98				
α 33-97				
α 34-98				
α 36-97				
α 37-98				
α 33-83				
α 34-83				
α 33-66				
α 34-66				
α 33-46				
α 33-45				
α 34-46				
α 36-45				
α 37-46				
α 107-141				
α 107-136				
α 107-133				
α 133-141				
α 137-141				
α 1-32	β 1-30	Milieu hydroalcoolique	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Listeria innocua</i> <i>Escherichia coli</i>	Yaba Adje et al., 2011b
α 1-33	β 77-125			
α 1-46	β 79-104			
α 100-105	β 85-105			
α 106-141	β 114-124			
	β 114-145			
	β 126-145			
α 107-128				
α 107-133				
α 107-136				
α 107-141				
α 110-141				
α 137-141				
α 3-36				
α 34-65				
α 62-91				
α 67-106				
α 73-105				
α 86-109				
α 96-106				
α 99-105				
α 99-106				

V- Valorisation de molécules actives en emballage intelligent

V-1- Généralités sur les emballages actifs

Un emballage actif, que l'on retrouvera aussi sous les noms de «fonctionnel», d'«intelligent» ou d'«interactif», est défini comme « un emballage qui offre plus qu'une simple protection. Il interagit avec l'aliment et dans certains cas répond à des changements du milieu environnant ou du produit lui-même (Gontard, 2000).

Le rôle de l'emballage a longtemps été limité à une simple protection physique en limitant l'impact des chocs mécaniques et les contaminations microbiologiques extérieures. Il s'agissait donc d'un emballage passif et inerte qui a comme fonctions principales la sécurité des aliments, la protection, la praticité et la communication. Aujourd'hui, les emballages actifs remplissent une nouvelle fonction destinée à changer les conditions du produit emballé pour améliorer la durée de vie et la sûreté tout en maintenant la qualité (exemples : absorbeur O₂, humidité, système antimicrobien). Ils génèrent alors de plus longues durées de conservation des aliments, une protection plus élevée des saveurs, ainsi que de faibles teneurs en additifs et conservateurs dans des formulations alimentaires tout en préservant la qualité du produit.

Ces nouveaux emballages dits «actifs» remplissent donc un autre rôle que celui de barrière inerte puisqu'ils permettent l'amélioration de la qualité et de la sécurité des aliments en relarguant progressivement des composés prolongeant la durée de vie du produit ou encore en modifiant sa composition. Ces emballages permettent de mieux répondre aux évolutions du marché et aux exigences des industriels mais aussi des consommateurs. Les produits frais sont par exemple de plus en plus recherchés et leurs circuits de commercialisation nécessitent des emballages adaptés pour les maintenir dans des conditions optimales de conservation en réduisant au maximum l'utilisation d'additifs et allonger ainsi leur durée de conservation à qualité constante. Beaucoup de ces systèmes sont incorporés directement au contact alimentaire sous forme de sachets (Rooney, 1995).

La première utilisation du terme emballage actif a été proposée par Labuza et Breene (1989). Depuis, les travaux portant sur la conservation des denrées par l'intermédiaire d'un système d'emballage conduisant à modifier le conditionnement du produit emballé sont en pleine évolution. Rooney (1995), Smith et *al.*, (1990), ou encore Guilbert (1998) et Gontard (2000)

ont notamment étudié l'activité antimicrobienne, les absorbeurs d'oxygène ou d'humidité, ou la biodégradabilité de tels emballages.

Un emballage peut être actif dès le moment où il a la faculté de modifier l'environnement de l'aliment (par un dégagement de substances, un piégeage, une neutralisation, ...) pour augmenter sa durée de vie et/ou préserver ses propriétés organoleptiques.

Ces systèmes actifs sont ajoutés aux emballages sous forme de sachets ou capsules disposés directement dans le milieu clos de l'emballage, ou incorporés dans un opercule, ou bien encore directement répartis dans l'intégralité du matériau d'emballage. Ils empêchent la formation des gaz qui endommagent le produit, ou bien libèrent des agents conservateurs ou antioxydants.

Dans la gamme des emballages actifs, nous pouvons distinguer deux grandes catégories :

- les absorbeurs qui ont pour objectif de retirer les éléments indésirables du couple produit-emballage (par exemple les absorbeurs d'oxygène ou d'odeurs, ou les régulateurs d'humidité).
- les relargueurs ou émetteurs d'additifs qui introduisent des éléments bénéfiques à l'ensemble produit-emballage comme, par exemple, les agents antimicrobiens, dont le rôle est de ralentir le développement des micro-organismes, les émetteurs d'éthanol, de gaz carbonique, d'agents de conservation, d'arômes, d'agents antimicrobiens, etc (Multon et Bureau, 1997).

V-2- Cas d'utilisation des emballages antimicrobiens

Les emballages actifs antimicrobiens peuvent être une solution contre les contaminations microbiennes de surface pour certains produits frais comme les aliments carnés pour lesquels les techniques de conservation classiques (le traitement thermique, l'irradiation, les conservateurs chimiques ou la protection des aliments sous atmosphère modifiée) ne sont pas applicables. Ces emballages peuvent être classés en deux types. Certains sont efficaces contre la croissance des micro-organismes de surface sans migration, comme les absorbeurs d'oxygène et d'humidité. D'autres contiennent un agent antimicrobien qui migre vers la surface des aliments. Dans les deux cas, le contact avec l'aliment est nécessaire.

Les emballages antimicrobiens peuvent prendre plusieurs formes :

- Effet antimicrobien indirect des emballages par absorption d'O₂ par exemple ou d'eau.
- Utilisation de films à activité antimicrobienne propre comme le chitosane, un polymère naturel dérivé de la chitine.
- Adsorption à la surface du film ou incorporation dans le film de molécules antimicrobiennes comme certains additifs, substances antimicrobiennes, conservateurs, vapeur d'éthanol, etc.

Le maintien des composés actifs à la surface des produits pour une période suffisamment longue permet l'amélioration des procédés de conservation par usage de substances antimicrobiennes (Torres et *al.*, 1985; Labuza, 1996; Gennadios et *al.*, 1997). Dans ces conditions, la diffusion des composés antimicrobiens vers l'intérieur des produits est considérablement ralentie. Cette idée est à la base du développement du concept d'emballage antimicrobien qui consiste à incorporer les agents antimicrobiens directement dans des films ou enrobages qui entrent en contact avec les aliments (Hotchkiss, 1995).

Différents modes d'incorporation des substances antimicrobiennes dans une matrice alimentaire sont envisagés (1) incorporation directe dans l'aliment (2) immersion ou pulvérisation et (3) incorporation dans un film (Coma, 2008).

- La première stratégie consiste à une incorporation des agents antimicrobiens directement dans l'aliment. L'ajout direct a donné des résultats très satisfaisants dans plusieurs types de matrices alimentaires. Parmi les agents antimicrobiens utilisés, la nisine, un bactériocine produite par fermentation à l'aide de bactérie *Lactococcus lactis* sur des substrats naturels comme le lait ou du dextrose, et la pédiocine produite par une souche de l'espèce *Pediococcus acidilactici*, sont ceux qui ont suscité le plus d'intérêt dans le secteur bioalimentaire. En effet, ils agissent à de faibles concentrations sur des bactéries pathogènes ou d'altération. L'incorporation directe des agents antimicrobiens dans la matrice alimentaire peut être limitée par certains facteurs tels que leur interaction avec certains constituants de l'aliment, le pH et l'activité protéolytique intrinsèque du produit (Katla et *al.*, 2001; Roller et *al.*, 2002; Aasen et *al.*, 2003). Ainsi, l'application de la nisine est limitée par sa faible solubilité à un pH autour de 6, et son inactivation dans certains types de produits (Katla et *al.*, 2001; Ross et *al.*, 2003).

- La deuxième approche consiste en l'immersion de la matrice alimentaire ou sa pulvérisation par des agents antimicrobiens. L'inconvénient des techniques de trempage ou de pulvérisation des agents antimicrobiens est que l'activité antimicrobienne de ces derniers peut être perdue rapidement par les composants de l'aliment ou par la dilution des agents antimicrobiens à une concentration au-dessous de la concentration minimale inhibitrice à la suite de la migration de ces agents vers la matrice alimentaire. Les émulsifiants et les acides gras, par exemple, sont connus pour interagir avec la nisine réduisant ainsi son activité biologique dans l'aliment (Henning et *al.*, 1986; Jung et *al.*, 1992). Les films permettant une diffusion lente sont souhaitables car ils permettent de maintenir des concentrations en surface plus élevées pendant de plus longues périodes (Devlieghere et *al.*, 2004).

- La troisième approche consiste à incorporer des bactériocines dans une matrice de polymère pour former des films antimicrobiens qui peuvent être appliqués sur la surface de l'aliment. Cette méthode permettrait une libération progressive de la bactériocine à travers le film vers la surface de l'aliment et d'exploiter l'effet combiné des bactériocines et de certains polymères présentant une activité antimicrobienne naturelle. On parle alors d'emballages antimicrobiens. Ceci fait l'objet de la section suivante de ce document.

La diffusion des agents antimicrobiens à travers les emballages a fait l'objet de plusieurs publications (Vojdani et Torres, 1990 ; Han et Floros, 1998). Les matériaux d'emballage antimicrobiens doivent entrer en contact avec la surface des aliments principalement dans le cas où les agents antimicrobiens sont non-volatils. Ainsi, ils peuvent se répandre sur la surface du produit et diffuser si nécessaire. D'autres composés actifs peuvent également être incorporés aux polymères comme, les enzymes antimicrobiennes telles que la lactoperoxydase (extraite du lait de vache ou du lactosérum), les peptides antimicrobiens, les phénols comme les hydroquinones et la catéchine (flavonoïdes que l'on retrouve en majorité dans le thé vert), les esters d'acide gras, les composés phénoliques antioxydants, les antibiotiques et les métaux comme le cuivre (Hotchkiss, 1997).

V-3- Matériaux utilisés pour l'emballage actif

L'un des polymères le plus couramment utilisés comme support à l'incorporation de composés antimicrobiens est le polyéthylène basse densité. Weng et Hotchkiss (1992, 1993) ont incorporé dans ce type de matériau des agents anti-fongiques dans le but de contrôler la croissance de levures et de moisissures sur la surface des fromages. De même, Ming et *al.*,

(1997) ont fixé des bactériocines sur des films plastiques en vue d'inhiber la croissance de *Listeria monocytogenes* sur les viandes. Certains polymères possèdent une activité antimicrobienne intrinsèque et peuvent donc être utilisés dans des films et des enrobages alimentaires. Les polymères cationiques tels que le chitosane et le poly-L-lysine adhèrent facilement aux cellules microbiennes (Goldberg et *al.*, 1990) puisque les amines chargées positivement agissent avec les charges négatives sur la membrane des cellules libérant ainsi les constituants intracellulaires. Les alginates de calcium ont aussi été étudiés pour le développement de films antimicrobiens. Ils ont permis la réduction de la croissance de la flore naturelle et des coliformes sur des produits carnés (Cuq et *al.*, 1995). D'autre part, certains polymères nécessitent une modification afin d'augmenter leur activité antimicrobienne. Par exemple, le potentiel antimicrobien des films de polyamide traités par irradiation aux UV a permis d'augmenter leur activité antimicrobienne. Ceci est probablement dû à l'augmentation de la concentration en amines à la surface du film (Hagelstein et *al.*, 1995). Parmi les molécules antimicrobiennes pouvant potentiellement être utilisées pour obtenir des films bioactifs, on peut citer : la nisine, la pédiocine, les acides organiques dont l'acide citrique, phosphorique ou propionique et les agents chélatants, séquestrants et surfactants dont l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA). Les matériaux antimicrobiens ont généralement pour objectif d'augmenter la phase de latence et de réduire le taux de croissance des microorganismes afin de prolonger la durée de vie du produit. Parallèlement, une activité antimicrobienne contre les souches pathogènes permet de diminuer le risque d'apparition d'un problème de santé publique. Enfin, l'introduction de particules antimicrobiennes peut modifier la résistance mécanique, les propriétés barrières ou encore le comportement optique, qu'il faudra obligatoirement appréhender (Appendini et Hotchkiss, 2002).

VI- Modélisation cinétique de l'hydrolyse enzymatique des protéines agroalimentaires

VI-1- Généralités sur les modèles cinétiques

Un modèle est une description mathématique d'un processus permettant de simuler son comportement et de prédire son évolution.

La modélisation de protéolyse permet le contrôle des conditions d'hydrolyse protéique afin d'obtenir, de manière reproductible, des hydrolysats ou des peptides possédant les propriétés d'intérêt. Les modèles simulant les cinétiques d'hydrolyse présentent des outils intéressants

pour ce contrôle (Hardwick et Glatz, 1989) et permettent de prédire l'influence des paramètres opératoires sur l'hydrolyse (Adler-Nissen, 1978). Toutefois, ces réactions d'hydrolyse sont très complexes par l'interaction de plusieurs phénomènes comme l'inhibition de l'enzyme par les produits d'hydrolyse, par le substrat, par des inhibiteurs de protéase ou par des molécules non-protéiques. En plus, la protéolyse est un processus à multiples substrats puisqu'elle implique l'hydrolyse de multiples liaisons peptidiques de réactivités différentes. Ainsi, le substrat est hydrolysé par une succession de réactions qui s'effectuent soit en série, soit en parallèle (Adler-Nissen, 1987).

Il existe différents types de modèles classés selon leur structure ou leurs objectifs. Pour ces modèles, il est supposé que, dans un réacteur discontinu agité et thermostaté, le mélange réactionnel est homogène, ce qui implique que les variations de concentration en enzyme, de concentration en substrat, de température et de pH dans le mélange sont modérées ou négligeables. Les concentrations en substrat ou en produit dans les équations de vitesse sont généralement exprimées soit en fonction du nombre de liaisons peptidiques clivables, soit en fonction du degré d'hydrolyse DH (Sousa et *al.*, 2004).

L'équation bilan du substrat dans un bioréacteur discontinu est alors de la forme :

$-\int_{S_0}^{S_f} dS = \int_0^{t_f} r \cdot dt$	<p>So : concentration initiale en substrat dans le réacteur Sf : concentration finale en substrat dans le réacteur r : vitesse de la réaction tf : temps final de la réaction</p>
--	--

Les modèles comportementaux et les modèles phénoménologiques sont les deux types de modèles les plus rencontrés.

Le **modèle comportemental, aussi appelé empirique** est basé sur des corrélations. Cependant, l'utilisation de ce type de modèle ne permet pas d'expliquer les mécanismes impliqués dans l'hydrolyse et se limite aux conditions qui ont permis de le développer. Il apporte peu de renseignements sur les principaux phénomènes accompagnant le processus. Le modèle empirique utilise, en général, des séries de fonctions simples ou des polynômes du second degré. Enfin, sa capacité de prédiction est limitée et restreinte au domaine d'identification des paramètres.

A l'inverse, le **modèle phénoménologique**, basé sur la connaissance, reproduit un comportement après une analyse rigoureuse des phénomènes et facteurs accompagnant le

processus. Il s'établit sous la forme de bilans mettant en jeu les grands principes de la physique (cinétique, thermodynamique, transfert...). Ce type de modèle est basé sur la prise en compte des processus limitant après identification de la valeur physique des différents coefficients.

De par la complexité de son mécanisme réactionnel, la protéolyse est plus souvent modélisée à partir de modèles empiriques (Margot et *al.*, 1997). Une relation linéaire entre le DHt (DH à un temps donné) et le logarithme de la concentration initiale en enzyme a été mise en évidence lors de l'hydrolyse de protéines de crustacés (Baek et Cadwallader, 1995; Simpson et *al.*, 1998), de poisson (Kristinsson et Rasco, 2000; Guérard et *al.*, 2001; Guérard et *al.*, 2002) et de blé. Une relation linéaire entre le logarithme du DHt et le logarithme de la quantité de protéase pour les systèmes protéines d'écrevisses papaïne ou bromélaïne a également été établie par Baek et Cadwallader (1995).

Ces modèles, établis pour différentes protéases sur un même substrat, permettent de comparer les enzymes selon leur efficacité catalytique et selon leur coût. En effet, de tels modèles permettent de calculer la quantité d'enzyme nécessaire pour atteindre un DHt donné (Kristinsson et Rasco, 2000).

VI-2- Modèles comportementaux (empiriques) de la protéolyse

La méthode empirique est un ensemble de procédures mathématiques et statistiques qui sont utilisées pour étudier les relations entre une réponse (variable dépendante comme le DH) et les facteurs de l'hydrolyse (variables indépendantes correspondant aux paramètres réactionnels). Cette méthode génère des modèles mathématiques qui permettent d'optimiser ces paramètres pour atteindre un DH donné en simulant l'influence des paramètres opératoires sur le DH. Cette méthode a été utilisée pour contrôler le processus de l'hydrolyse pour des protéines de poisson (Baek et Cadwallader, 1995 ; Diniz et Martin, 1996) ou pour des protéines de viande (Linder et *al.*, 1995).

Ces modèles comportent généralement entre deux et quatre paramètres à identifier. Certains modèles empiriques expriment la vitesse d'hydrolyse en fonction du temps tandis que d'autres l'expriment en fonction de la quantité d'azote soluble.

Les modèles présentés dans le tableau 2 simulent les cinétiques suivant les conditions réactionnelles et les phénomènes susceptibles d'être impliqués ; les modèles type inverse

simulent convenablement les hydrolyses où l'enzyme est inhibée par les produits d'hydrolyse alors que le modèle 4 simule avec précision les hydrolyses où l'enzyme est inactivée par dénaturation thermique. Les valeurs modélisées par des modèles comportementaux entraînent fréquemment des déviations par rapport aux données expérimentales (Margot et *al.*, 1997).

Tableau 2: Quelques modèles empiriques simulant l'hydrolyse enzymatique (Margot et *al.*, 1997)

Modèle empirique	
$\frac{dX}{dt} = \frac{a_1 a_2}{(a_2 + t)^2} + a_3$	(Modèle 1)
$\frac{dX}{dt} = a_1 a_2 \exp(-a_2 t) + a_3 a_4 \exp(-a_4 t)$	(Modèle 2)
$\frac{So \, dX}{Eo \, dt} = \frac{a_1 So (a_4 - X)}{a_2 + So (a_4 - X) + 2a_3 So_2 (X - Xo)(a_4 - X)}$	(Modèle 3)
$\frac{dX}{dt} = a_1 \frac{Eo}{So^2} \exp(-a_2 X)$	(Modèle 4)

X : fraction d'azote soluble; t : temps ; a_i : paramètres i du modèle ; So : concentration initiale en substrat ; Eo : concentration initiale en enzyme.

Les fonctions les plus courantes sont de type inverse (modèles 1 et 3 du tableau 2) ou de type exponentiel (modèles 2 et 4 du tableau 2). Le modèle de type exponentiel, développé par González-Tello et *al.*, (1994, 1996), a été utilisé avec succès pour modéliser la cinétique d'hydrolyse de divers systèmes enzyme/substrat (Moreno et Cuadrado, 1993; González-Tello et *al.*, 1994 ; Linder et *al.*, 1995; Margot et *al.*, 1997; Márquez et Vázquez, 1999).

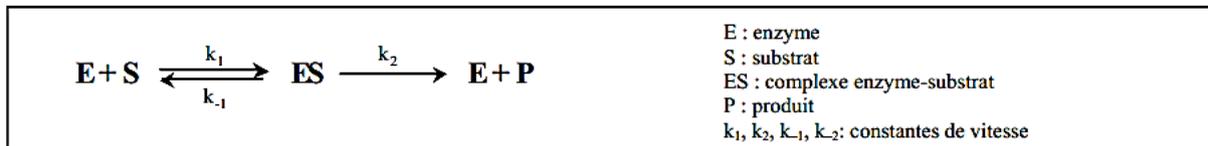
VI-3- Modèles phénoménologiques de la protéolyse

La plupart des modèles traitant la protéolyse sont empiriques, cependant quelques travaux ont eu recours à des modèles phénoménologiques. Toutefois, d'importantes hypothèses simplificatrices sont mises en place pour permettre une résolution analytique des équations différentielles élaborées.

Les cinétiques d'hydrolyse sont généralement caractérisées par une vitesse initiale élevée suivie d'un ralentissement rapide de la vitesse d'hydrolyse (Adler-Nissen, 1978). Cette diminution de vitesse peut être attribuée à différents phénomènes tels que l'inhibition de l'enzyme par les peptides formés ou par le substrat, l'inactivation de l'enzyme par autolyse ou

par dénaturation thermique, la limitation du nombre de liaisons peptidiques disponibles (Constantinides et Adu-Amankwa, 1980; Margot et *al.*, 1997; Guerard et *al.*, 2002).

Les modèles phénoménologiques sont, pour la plupart, basés sur le schéma réactionnel de Michaelis-Menten (Postolache et Oncescu, 1989) :



A l'état stationnaire, dans un réacteur discontinu, il en résulte l'équation suivante :

$\frac{dP}{dt} = \frac{V_M \cdot S}{K_M + S} \quad \text{avec} \quad K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{et} \quad V_M = k_2 \cdot E_0$	<p>K_M : constante de Michaelis-Menten (quantité/volume) V_M : vitesse maximale (quantité/(volume.temps)) S : concentration en substrat (quantité/volume) P : concentration en produit (quantité/volume) E_0 : concentration initiale en enzyme (quantité/volume)</p>
--	--

MATÉRIELS ET MÉTHODES

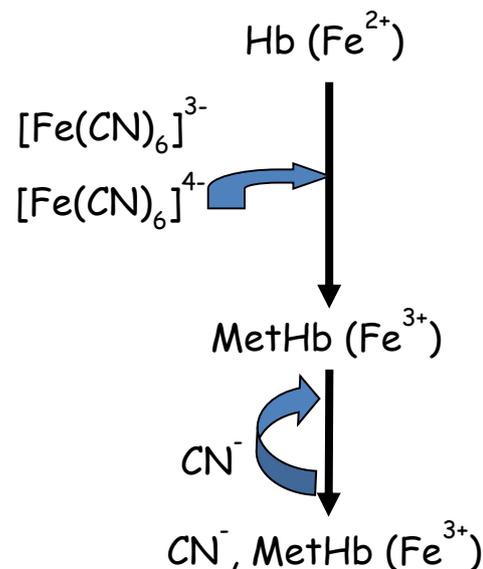
I- Hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine bovine

I-1- Dosage de l'hémoglobine

Une solution mère de l'hémoglobine bovine a été préparée à partir d'hémoglobine pure lyophilisée (Sigma chemical). 15g d'hémoglobine en poudre sont dissous dans 100mL d'eau distillée. Cette solution est ensuite centrifugée à 4000 tour/min pendant 30min afin d'éliminer la partie insoluble. Le surnageant est récupéré et permettra de déterminer la concentration de solution mère en hémoglobine par la méthode de Drabkin décrite par Crosby et *al.*, 1954.

➤ Principe de la méthode de Drabkin

La concentration en hémoglobine de la solution mère (Y) préparé à partir de l'hémoglobine pure en poudre a été déterminée par la méthode de Drabkin. Il s'agit d'une méthode colorimétrique de référence (Standard d'or ou golden standard) pour le dosage de l'hémoglobine en solution. Le principe de cette méthode consiste à diluer une solution mère d'hémoglobine dans le réactif de Drabkin. Un réactif qui transforme l'hémoglobine en un complexe stable : la cyanméthémoglobine. En effet, l'hémoglobine (Fe^{2+}) est oxydée en méthémoglobine par le ferricyanure ; la méthémoglobine (Fe^{3+}) réagit avec le cyanure de potassium pour former la cyanméthémoglobine.



La densité optique de la solution ainsi obtenue est déterminée au photomètre à la longueur d'onde d'absorption maximale de la cyanométhémoglobine (540 nm). Cette densité optique

est proportionnelle à la quantité d'hémoglobine présente dans la solution. La quantité d'hémoglobine est déterminée par comparaison avec les densités optiques mesurées pour des concentrations connues d'hémoglobine.

➤ **Mode opératoire**

-50µL de la solution d'hémoglobine sont ajoutés à 12,5mL du réactif de Drabkin (phosphate monopotassique 1mM, cyanure de potassium 0,75mM et ferricyanure de potassium 0,6mM en solution aqueuse). Après 10mn à température ambiante l'absorbance des échantillons est lue à 540nm contre le blanc (12,5mL du Drabkin avec 50µL d'eau).

Une solution d'hémoglobine standard à 14,7% (p/v) donne une absorbance de 0,4 par la méthode de Crosby, la concentration Y en hémoglobine de la solution à doser en % (p/v) peut se calculer comme suit :

$$Y = 14,7 \times \frac{A_{540\text{nm}}}{0,4} \text{ mL} \quad A_{540\text{nm}} : \text{Absorbance de la solution à doser à 540 nm}$$

I-2- Dénaturation de l'hémoglobine par l'urée

I-2-1- Préparation des solutions d'hémoglobine dénaturée 2% pH2

Un volume V de la solution mère d'hémoglobine Y correspondant à 5g d'hémoglobine est ajouté dans une solution contenant 80g d'urée dissout dans (80-V) mL d'eau distillée. Le mélange est placé sous agitation pendant 1h à 37°C et ensuite 50mL du tampon HCl/KCl 0,25M pH2 sont ajoutés. Le pH est ajusté à 2 grâce à une solution d'acide chlorhydrique concentrée. Le volume total est complété à 250mL avec de l'eau distillée. Cette solution est utilisée pour le dosage de l'activité enzymatique de la pepsine.

I-2-2- Préparation des solutions d'hémoglobine dénaturée 1% pH4, 5

Un volume V de la solution mère correspondant à 1g d'hémoglobine est ajouté dans une solution contenant 32g d'urée dissout dans (32-V) mL d'eau distillée. Le mélange est placé pendant 1h à 37°C et ensuite 20mL de tampon acide acétique/acétate de sodium 0,5M pH4, 5 sont ajoutés. Le pH est ajusté à 4,5 grâce à une solution d'acide chlorhydrique 2M. Le volume total est complété à 100mL avec de l'eau distillée. Cette solution est utilisée pour l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine.

I-3- Dosage de l'activité enzymatique de pepsine

L'activité enzymatique de pepsine est dosée par spectrophotométrie à 280nm. Une solution mère de pepsine de porc (EC 3.4.23.1; 32000 Unité Anson (UA); Sigma chemicals) est préparée en mélangeant 56 mg de pepsine et 20mL de tampon acide acétique/ acétate de sodium 0,1M à pH 4,5 et ensuite diluée à 1/200 dans l'eau distillée. Cette solution de pepsine diluée et la solution d'hémoglobine dénaturée 2% sont pré-incubées pendant 5min à 37°C. Le dosage de l'activité enzymatique de la pepsine est réalisé en ajoutant 1mL de la solution de pepsine diluée à 5mL de la solution d'hémoglobine dénaturée (2% à pH2). Après 10 min d'incubation à 37°C, la réaction enzyme-substrat est arrêtée en ajoutant 10mL d'acide trichloracétique (TCA) 5%. Un blanc est réalisé en parallèle en mélangeant dans l'ordre, 10mL de TCA 5%, 1 mL de pepsine diluée puis 5mL d'hémoglobine. L'ensemble est ensuite laissé 30 min à température ambiante. Les solutions sont centrifugées à 4000tours/min pendant 15 minutes, puis le surnageant est filtré sur un filtre en acétate de cellulose de 0,22 µm. L'absorbance est lue à 280nm contre le blanc, ainsi l'activité de la pepsine est déterminée.

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

$$(\Delta A_{280\text{nm}} / 10) \times 1000 \times 200 \quad \text{U.A. / mL} \quad \Delta A : \text{Absorbance de la solution à doser}$$

$$\text{Soit:} \quad \text{U.A./mL} \times \frac{\text{Volume de la solution}}{\text{Masse de pepsine pesée}} \quad \text{U.A/ mg pepsine}$$

I-4- Hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 synthétisé

Une cinétique de l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 synthétisé a été faite à différentes températures (15°C, 23°C et 37°C) et à différents pH (3,5; 4,5 et 5,5) et à différents rapports enzyme/substrat (E/S=1/50, 1/100 et 1/200 (mole/mole)) (Hedhili et *al.*, 2013).

La quantité de pepsine correspond à un rapport enzyme/substrat équivalent à 1/50, 1/100 ou 1/200 a été calculée à partir de l'activité de la pepsine déterminée précédemment et dissoute à l'aide de tampon acide acétique /acétate de sodium 0,1M pH 3,5; 4,5 ou 5,5. Cette solution de pepsine et 2mL de la solution de peptide α 1-32 pur de concentration 0,5 mg.mL⁻¹ sont

équilibrées à la température choisie avant de commencer l'hydrolyse. Ensuite, la solution de pepsine et la solution de peptide sont mélangées et incubées à cette température. Des prélèvements chronométrés de 100µL sont effectués et 40µL de tampon borax 0,32M pH 12,3 sont ajoutés à chaque prélèvement afin d'arrêter la réaction. La pepsine est inactivée par l'augmentation du pH du milieu. Les échantillons sont ensuite analysés par CLHP et spectrométrie de masse afin de suivre l'évolution des hydrolysats et d'établir le schéma réactionnel de l'hydrolyse du peptide α 1-32 synthétisé.

I-5- Hydrolyse de l'hémoglobine bovine purifiée ou directement à partir du cruor

La cinétique d'hydrolyse d'hémoglobine et du cruor a été suivie dans différentes conditions : 3 températures (15, 23 et 37°C), à 3 pH (pH 3,5; 4,5 et 5,5) et 3 rapports enzyme/substrat (1/5, 1/11 et 1/20 (mole/mole)) correspondant aux rapports 1/50, 1/100 et 1/200 pour le peptide α 1-32 synthétisé puisque dans l'hémoglobine, il y a environ dix fois plus de liaisons peptidiques à hydrolyser par la pepsine que dans le fragment α 1-32 . La quantité de pepsine correspondant à un rapport enzyme-substrat équivalent à 1/5, 1/11 ou 1/20 a été calculée à partir de l'activité de la pepsine déterminée précédemment et dissoute à l'aide de tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1M pH 3,5; 4,5 ou 5,5. 100mL de la solution d'hémoglobine dénaturée 1%, préparée précédemment et un volume de pepsine correspondant au rapport E/S choisi sont équilibrés à la température choisie avant de commencer l'hydrolyse. Un volume T_0 est prélevé avant l'ajout de l'enzyme. Puis, dans un réacteur à température contrôlée, la pepsine a été ajoutée à la solution d'hémoglobine. Différents hydrolysats ont été prélevés et l'arrêt de la réaction a été effectué par ajout de 400µL de tampon borax 0,32M (pH 12,3) à 1mL de l'hydrolysat. Le pH de la solution a alors atteint une valeur de 10, permettant l'inactivation de la pepsine. Les échantillons ont ensuite été analysés par CLHP et spectrométrie de masse afin d'identifier les peptides d'intérêts et de les quantifier. Il s'agit des hydrolysats de 1; 2,5; 5; 10; 15; 30min et 1; 2 ; 3; 10; 24; 28 et 32h.

II- Analyse des hydrolysats pepsiques de l'hémoglobine bovine

II-1- La Chromatographie Liquide Haute Performance en phase inverse (CLHP)

La chromatographie liquide haute performance en phase inverse est une technique permettant la séparation des molécules en fonction de leurs affinités pour une phase stationnaire apolaire

et une phase mobile plus ou moins polaire. La photo 1 représente les différentes composantes du CLHP utilisée pour cette étude. L'appareillage est constitué d'une pompe WatersTM600, d'un détecteur Waters 486 et un enregistreur Waters 746 à une atténuation de 512.

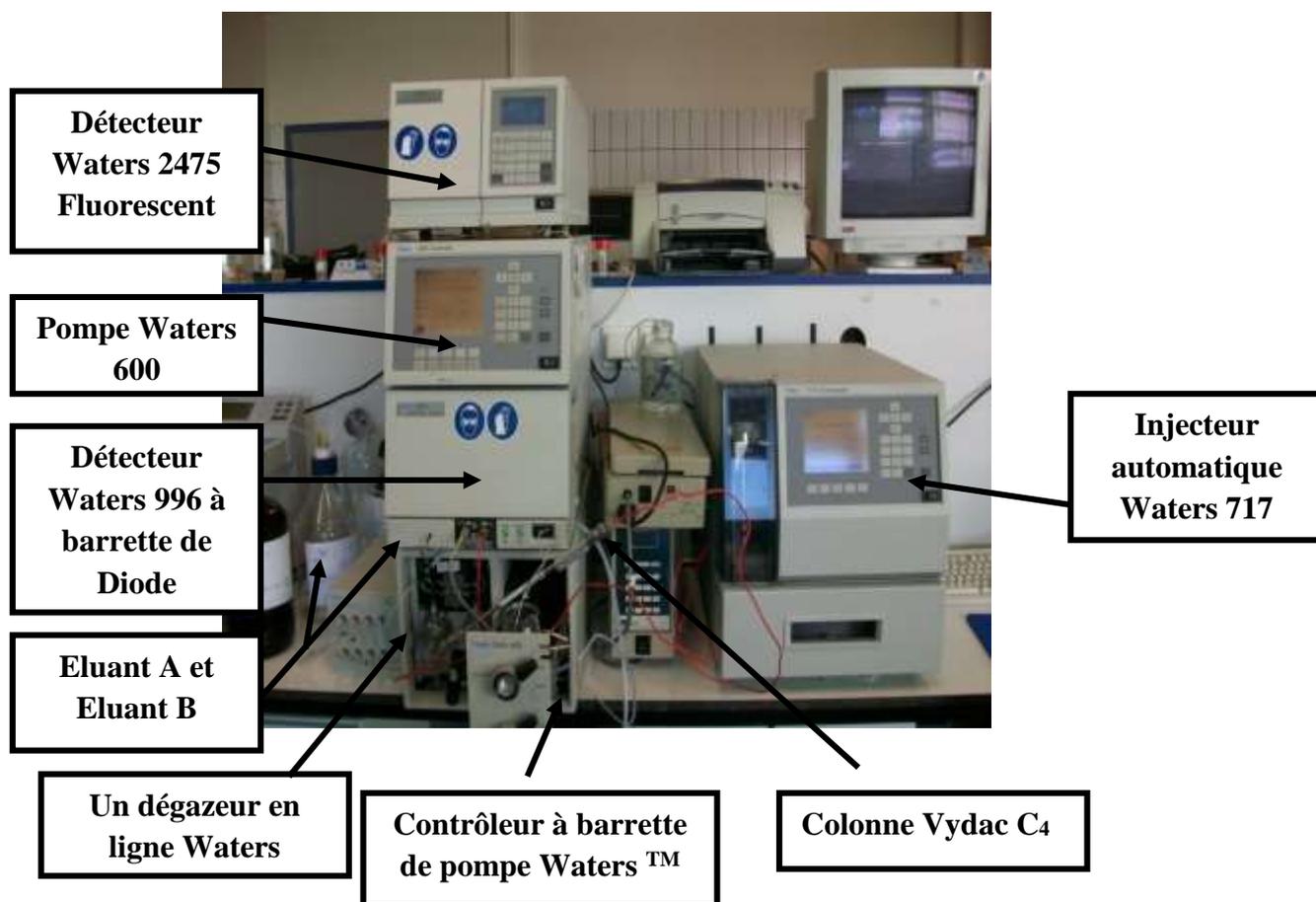


Photo 1 : Chromatographie Liquide Haute Performance analytique

La phase stationnaire est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 4, 8 ou 18 atomes de carbones (C₄, C₈ et C₁₈). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (ACN, MeOH, H₂O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Une colonne C₄ est recommandée pour l'analyse des peptides de plus de 20 à 30 acides aminés et la phase mobile est choisie en fonction des molécules à analyser. Dans notre cas, une colonne C₄ de 0,32x 25cm à un débit de 0,6 mL.mn⁻¹ a été utilisée pour l'analyse des hydrolysats des peptides étudiés. De par la sensibilité de la CLHP, les échantillons des hydrolysats sont filtrés sur des filtres d'acétate de cellulose de 0,2µm avant l'injection.

La phase mobile est composée de deux solvants A et B 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 H₂O milli Q et de l'acide trifluoroacétique (TFA) en proportion 100: 0,1, v/v. Le solvant B est une solution d'acétonitrile (ACN), d'eau milli Q et de l'acide trifluoroacétique dans les proportions (60: 40: 0,1 v/v/v). Le mode d'injection est automatique et la détection se fait par un détecteur à barrettes de diode qui permet la détection sur les longueurs d'onde entre 210nm et 400nm.

II-2- Identification des peptides par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une méthode permettant de transformer des molécules dans leur état naturel en ions à l'état gazeux et d'obtenir leur masse moléculaire en analysant leur rapport de masse/charge, noté m/z , où m est la masse du composé et z la charge. Elle permet ainsi de recueillir des informations sur la nature, la composition et la structure en plus de la quantité de la molécule étudiée dans l'échantillon. Un spectromètre de masse est constitué de cinq parties principales : un système d'induction, une source d'ions, un analyseur, un détecteur et un ensemble informatique de traitement des données.

La détection par spectrométrie de masse comprend principalement quatre étapes :

- L'introduction de l'échantillon à analyser,
- L'ionisation des molécules à analyser et leur passage en phase gazeuse,
- La séparation des ions dans l'analyseur qui sert à mesurer le rapport m/z des ions générés,
- La détection des ions et le traitement du signal : le courant d'ion doit être converti en courant électrique et amplifié afin de permettre l'obtention de données exploitables via un traitement informatique.

Le système d'induction fait pénétrer l'échantillon dans le spectromètre de masse, les molécules sont vaporisées et ionisées, l'analyseur trie les ions fragments en fonction du rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique, puis, le détecteur collecte les ions fragments et amplifie le signal associé aux ions et finalement l'ensemble informatique de traitement de données qui permet de transformer les informations reçues du détecteur en spectre de masse.

II-3- Couplage LC- ESI- MS

Les analyses LC- ESI- MS ont été réalisées pour identifier les peptides générés par hydrolyse pepsique. L'analyse a été effectuée sur un système CLHP Accela acquis auprès de Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, Brême, Allemagne) qui se composait d'un injecteur automatique équipé d'un four à colonne, et d'une pompe quaternaire avec un dégazeur, le tout piloté par le logiciel Xcalibur. Le système CLHP Accela a été couplé avec un système de spectrométrie de masse Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Allemagne) équipé par une source d'ions ESI. Les analyses ont été effectuées avec la même colonne C4 analytique et avec le même gradient comme décrit précédemment pour RP-CLHP. Les solvants utilisés sont pour la voie A eau/Acide formique 0,1% et la voie B Acétonitrile/acide formique 0,1% à un débit de 0,1mL.min⁻¹. Afin de diminuer le débit un split est installé en sortie de colonne afin d'obtenir un débit de 0,3mL.min⁻¹ en introduction dans le spectromètre de masse. La source d'ionisation utilisée est un électrospray. Les conditions d'entrée d'ESI suivantes ont été utilisées : l'azote a été utilisé à la fois comme une gaine et auxiliaire à des débits arbitraires, respectivement de 20 à 10 µL.min⁻¹, la température capillaire a été fixée à 275°C, dans le mode positif, la tension capillaire a été réglée à 93,4 V, la tension de source à 3,3 kV et le courant de la source 0-8 µA ; les spectres ont été enregistrés sur la masse/charge gamme 400-2000 m/z.

III- Détermination de l'activité antibactérienne

L'activité antimicrobienne a été déterminée en réalisant des tests qualitatifs qui permettent de mettre en évidence le pouvoir antimicrobien, et des tests quantitatifs par la mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

III-1- Évaluation qualitative de l'activité antibactérienne

La détection de l'activité antimicrobienne sur milieu gélosé est basée sur la diffusion de l'agent antimicrobien au sein de ce milieuensemencé avec une souche cible. Les bactéries testées sont : *Listeria innocua*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* et *Salmonella enteritidis*. Le dépôt du peptide se fait après avoir délimité des points sur la boîte de Petri à l'aide d'un gabarit, le volume de l'échantillon à tester (peptide antibactérien préparé à 1mg/mL dans de l'eau distillée) déposé est de 20 µL. La pré-culture est préparée en inoculant 100 µL d'une suspension bactérienne à 10⁶ UFC.mL⁻¹ dans 10 mL de milieu Muller Hinton (MH), après

24h d'incubation à 37° C on aura 10^9 UFC.mL⁻¹. Un isolement en parallèle dans le milieu LB gélosé a été réalisé pour s'assurer de la pureté de la souche.

Une dilution 200 fois (10^6 UFC.mL⁻¹) a été obtenue en inoculant 250 µL de la suspension à 10^9 UFC.mL⁻¹ dans 50 mL du milieu MH liquide, 2 mL de cette suspension ont été coulés sur milieu MH gélosé, on laisse reposer 5 minutes. L'excès est ensuite enlevé avec une pipette Pasteur stérile en tenant la boîte inclinée, puis on laisse sécher la boîte 20 minutes sous la hotte. 20 µL de solution avec le peptide antibactérien à tester préparé à 1mg/ml dans de l'eau distillée sont déposés dans chaque spot après l'avoir stérilisé à froid avec un filtre 0,22 µm pour éviter sa dénaturation à haute température, avant incubation à 37°C pendant 24 heures les boîtes sont mises à 4°C pendant 3 heures.

III-2- Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibactérien qui inhibe toute croissance visible d'une bactérie après 24h d'incubation dans un milieu de croissance spécifique.

Cette méthode a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne des peptides isolés, en milieu liquide contre une souche cible.

La détermination de la CMI se fait sur une microplaque stérile, pour un volume total de 100 µL deux puits vont contenir respectivement un témoin négatif (de stérilité) correspondant à 100 µL du milieu MH, et un témoin positif contenant 50 µL du milieu MH et 50 µL de la suspension bactérienne qui représente 10^6 UFC.mL⁻¹. Les autres puits vont servir à tester le peptide. 50 µL du milieu MH sont déposés dans les puits à l'exception du premier qui doit contenir le milieu MH doublement concentré. Puis, 50µL de peptide antimicrobien préparé à 1mg/ml dans de l'eau distillée sont déposés dans le premier puits, bien mélanger puis transvaser 50µL de puits n⁻¹ au puits n dans le but de diluer le peptide à un demi à chaque fois. En dernier, 50µL d'une suspension bactérienne diluée 200 fois dans 50 mL du milieu MH sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est ensuite incubée pendant 24h à la température de croissance de la bactérie (37°C pour les souches étudiées dans notre cas) et la lecture est effectuée à une longueur d'onde de 600 nm contre le témoin négatif (100 µL du milieu MH) et le témoin positif (50 µL du milieu MH et 50 µL de la suspension bactérienne).

La CMI correspond à la concentration en peptide du premier puits présentant une absence de la croissance. Elle est égale à la concentration initiale du peptide sur la dilution du premier

tube positif.

IV- Modélisation de l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32

La figure 19 présente la démarche mise en œuvre pour l'élaboration d'un modèle mathématique décrivant une hydrolyse enzymatique. Elle a nécessité deux phases.

La première phase a consisté à :

- la définition du chemin réactionnel de l'hydrolyse pepsique des peptides d'intérêts ;
- l'obtention de faits expérimentaux quantitatifs (cinétiques d'hydrolyse,...) ;
- la mise en place des hypothèses expliquant les phénomènes impliqués dans l'hydrolyse.

La seconde phase d'élaboration des modèles a consisté à :

- l'écriture de relations mathématiques basées sur les hypothèses précédentes ;
- la confrontation de ces expressions mathématiques à l'expérience ;
- la confirmation ou l'infirmité de la formalisation effectuée ;
- la modification de la formalisation.

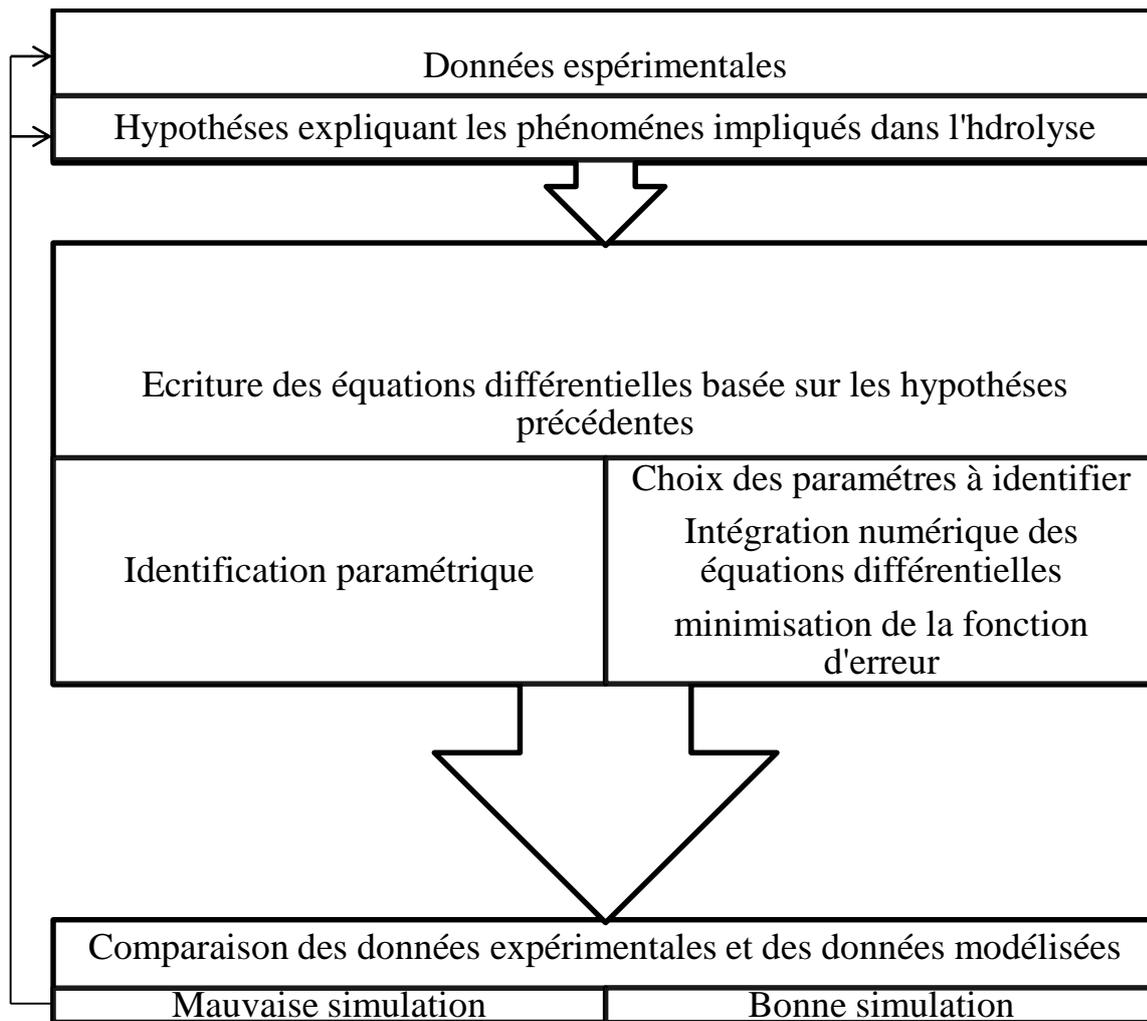


Figure 19 : démarche mise en œuvre pour l'élaboration un modèle mathématique décrivant une hydrolyse enzymatique

IV-1- Hypothèses de modélisation pour la suite de l'étude

Du fait de la complexité de la réaction de l'hydrolyse protéique, la modélisation peut conduire à des modèles très complexes si des hypothèses simplificatrices ne sont pas mises en place. Le but de ce travail étant de proposer un modèle qui pourrait décrire avec précision la cinétique d'hydrolyse de la famille du peptide α 1-32, et qui ne serait pas trop complexe, afin de faciliter la poursuite de son utilisation. Par conséquent, certaines hypothèses ont été formulées. On a supposé que les réactions enzymatiques étaient irréversibles. L'effet de la concentration de l'enzyme a été négligé, en supposant que l'enzyme est toujours disponible pour effectuer l'hydrolyse du substrat. Enfin, les réactions d'hydrolyse sont supposées de premier ordre. L'agitation a été considérée comme parfaite, le taux global d'apparition et de disparition des peptides dépendant seulement des réactions enzymatiques, en négligeant la résistance de

transfert de masse. Comme il s'agissait des simples hypothèses, les constantes de vitesse ont été considérées comme des constantes apparentes.

IV-2- Détermination des paramètres de la cinétique

Sur la base des hypothèses présentées précédemment et les schémas réactionnels établis, l'évolution des concentrations de peptides dans le temps a été décrite selon des systèmes d'équations différentielles.

La résolution de ces équations a permis d'établir l'expression de la concentration de chaque peptide en fonction des constantes apparentes de vitesse et de temps d'hydrolyse. L'injection de ces équation dans le solveur Microsoft Excel a permis de déterminer les valeurs des constantes apparentes de vitesse en utilisant la méthode d'estimation de paramètres multiples avec l'algorithme de Newton, de manière à minimiser la moyenne de tous les NRMSD (normalized Root mean square deviation) de la cinétique des peptides étudiés.

Les valeurs des constantes apparentes de vitesse ont été déterminées grâce à des données expérimentales, en minimisant l'écart quadratique moyen normalisé entre les données expérimentales et la prédiction du modèle.

Ainsi, les équations du modèle ont été ajustées aux données expérimentales pour déterminer les valeurs des constantes apparentes de vitesse, avec l'objectif de minimiser les écarts entre les cinétiques expérimentales et le modèle. Pour caractériser l'écart entre les données expérimentales et le modèle les critères NRMSD ont été utilisés :

$$NRMSD = \frac{RMSD}{\exp_{\max}} = \frac{\sqrt{\frac{1}{n} \cdot \sum_{p=1}^n (\exp_p - \text{mod}_p)^2}}{\exp_{\max}}$$

IV-3- Le solveur Microsoft d'Excel

Le système solveur Microsoft d'Excel a été utilisé pour modéliser la cinétique de l'hydrolyse pepsique de fragments peptidiques issue du peptide α 1-32 synthétisé et celles des peptides α 1-32 et α 107-141 issus de l'hémoglobine et du cruor bovins.

Le solveur Excel est un outil puissant d'optimisation. Il utilise la méthode d'Euler pour minimiser l'écart entre les valeurs expérimentales et les valeurs données par le modèle, en créant une feuille de calcul avec des cellules variables multiples qui correspondent aux

constantes de vitesses des réactions élémentaires de l'hydrolyse. On peut définir des contraintes à satisfaire sur le problème avant qu'une solution ne soit trouvée, par exemple que les constantes de vitesses soient supérieures à 0.

On a fait appel au solveur pour valider le schéma réactionnel afin de maîtriser au mieux l'hydrolyse pepsique des peptides étudiés.

La figure 20 montre la boîte de dialogue du Solveur avec : une cellule cible qui correspond dans notre cas aux critères NRMSD, des cellules variables correspondant aux constantes apparentes de vitesse et la cellule des contraintes à respecter par le solveur pour minimiser la cellule cible et calculer les cellules variables.

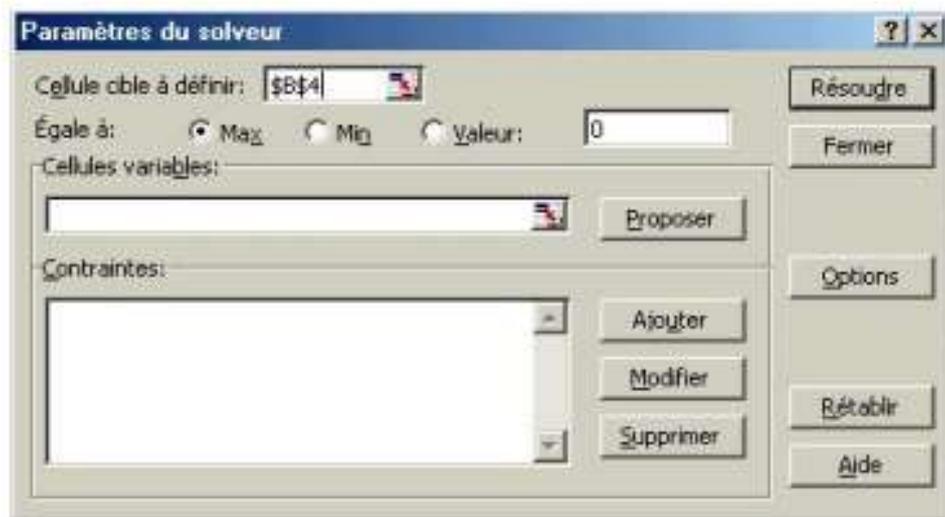


Figure 20: Boîte de dialogue du système solveur Microsoft Excel

Généralement, on considère une série de couples des résultats expérimentaux (temps, y expérimental) que l'on cherche à modéliser par une relation du type $y_{\text{modèle}} = f(t, k_1, k_2, k_3 \dots)$.

k_1, k_2, k_3, \dots , désignent des paramètres dont on cherche les valeurs. Dans notre cas, ce sont les constantes apparentes de vitesses des différentes réactions élémentaires du modèle.

Un algorithme de modélisation optimise les valeurs des paramètres k_1, k_2, k_3, \dots de façon à minimiser la somme des NRMSD de tous les peptides.

L'assistante graphique nous permet de tracer dans une même présentation, les points expérimentaux et une courbe qui se rapproche de ces points produits par le solveur pour chaque peptide à différents instants de la cinétique enzymatique de l'hydrolyse de peptide α 1-32 synthétisé et celui issu de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine et du cruor à différentes conditions.

V- Dosage des ions potassium extracellulaires

V-1- Préparation de la suspension bactérienne de *Listeria innocua*

La pré-culture de *Listeria innocua* a été préparée en inoculant dans 10mL du milieu cerveau cœur bouillon (BHB) 100 μ L d'une suspension de 10⁶UFC.mL⁻¹ pendant 24h d'incubation à 37°C afin d'obtenir une suspension de 10⁹UFC.mL⁻¹. Un isolement en parallèle a été effectué pour s'assurer de la pureté de la souche. Les cultures ont été préparées en inoculant 500 μ L de la pré-culture dans 500mL BHB stérilisé auparavant en autoclave pendant 20min à 121°C. Ensuite, les cultures ont été incubées à 30°C pendant 24h. Après incubation, la culture été répartie dans des pots à centrifugation, préalablement stérilisés. Une première centrifugation de 15min à 10000g à 4°C (centrifugeuse BECKMAN) a été effectuée dans le but est de concentrer les cellules bactériennes. Les culots sont repris dans 100mL de tampon PIPES 30mM [Sodium Piperazine -N-N'-bis (éthanesulfonate)] à pH 6,5. Après une seconde centrifugation identique à la première, le culot été repris dans 50 ml de tampon PIPES 30mM, à pH 6,5. 1mL d'une solution de KCl de concentration 5 g.L⁻¹ préparé dans un tampon PIPES pH 6,5 a été ajouté, à la suspension cellulaire. La suspension cellulaire est répartie en 2 volumes identiques dans 2 flacons à bouchons butyles. Un flacon témoin sans glucose et un deuxième flacon contenant 1 mL d'une solution de glucose de concentration 5g.L⁻¹ (tampon PIPES pH 6,5) après cinq minutes d'incubation à 30°C pour augmenter l'ATP disponible. Puis après 20 minutes d'incubation à la même température, 1,5 mL d'une préparation de peptide à tester (1mg/mL dans de l'eau distillée) ont été ajoutés (à t = 20 minutes). L'addition de glucose ou du peptide à la suspension cellulaire a été réalisée par piqûre centrale à travers les bouchons butyles.

V-2- Prélèvement des échantillons

Afin de suivre l'évolution de la concentration extracellulaire des ions K⁺ dans la solution, des prélèvements chronologiques de 1,5 mL ont été effectués dans chaque flacon (t=0; 2,5; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 45; 55 et 65 min).

Pour séparer les cellules bactériennes du milieu dans lequel elles baignent, une filtration à travers des filtres 0,45 μ m a été effectuée. Pour chaque 500 μ L échantillon prélevé, 4,5 mL du solvant H₂SO₄ à 1M/CICs à 1,1 g.L⁻¹ ont été ajoutés. La concentration en ions K⁺ dans le surnageant a été mesurée par spectrophotomètre d'absorption atomique à une longueur d'onde de 766,5 nm.

V-3- La spectrophotométrie d'absorption atomique

La spectrophotométrie d'absorption atomique est une technique d'analyse élémentaire et très sensible. Elle permet de doser plus de soixante-dix éléments chimiques même à l'état de traces (quelques mg.L^{-1}) parmi eux le potassium.

L'appareil utilisé pour le dosage des ions potassium extracellulaires est un spectrophotomètre d'absorption atomique, Nova AA300 (Analytical Jena, Allemagne). L'absorbance des prélèvements est mesurée à une longueur d'onde $\lambda = 766,5 \text{ nm}$.

L'analyse est basée sur l'absorption de photons par des atomes à l'état fondamental, et on utilise à cet effet en général des solutions à l'état liquide.

Ensuite, la solution est pulvérisée dans une flamme qui résulte de la combustion d'un mélange d'air (40 mL.min^{-1}) et acétylène (C_2H_2) (20 mL.min^{-1}). Sa température est de l'ordre de 2300°C où elle est transformée en vapeurs atomiques.

On envoie sur ces vapeurs une radiation caractéristique des atomes à doser (longueur d'onde de la raie de résonance le plus souvent) qui est produite par la source qui est généralement une lampe à cathode creuse contenant l'élément à doser. La radiation est absorbée par les atomes non excités sur le trajet de la lumière (figure 21), pour des concentrations C faibles le modèle obéit à la loi de Beer-Lambert : $A = k C l$, k est une constante de proportionnalité pour une température donnée et une longueur d'onde donnée (Rouessac et *al.*, 2004; Mendham et *al.*, 2005).

A partir de l'équation de la droite obtenue après traçage de la courbe d'étalonnage, on peut déterminer la concentration en K^+ dans la solution à doser,

Cette technique est simple, quantitative, très sélective et relative, on doit faire une courbe d'étalonnage. Dans la pratique, on compare les absorbances obtenues avec une gamme d'étalon et la solution à doser dans les mêmes conditions.

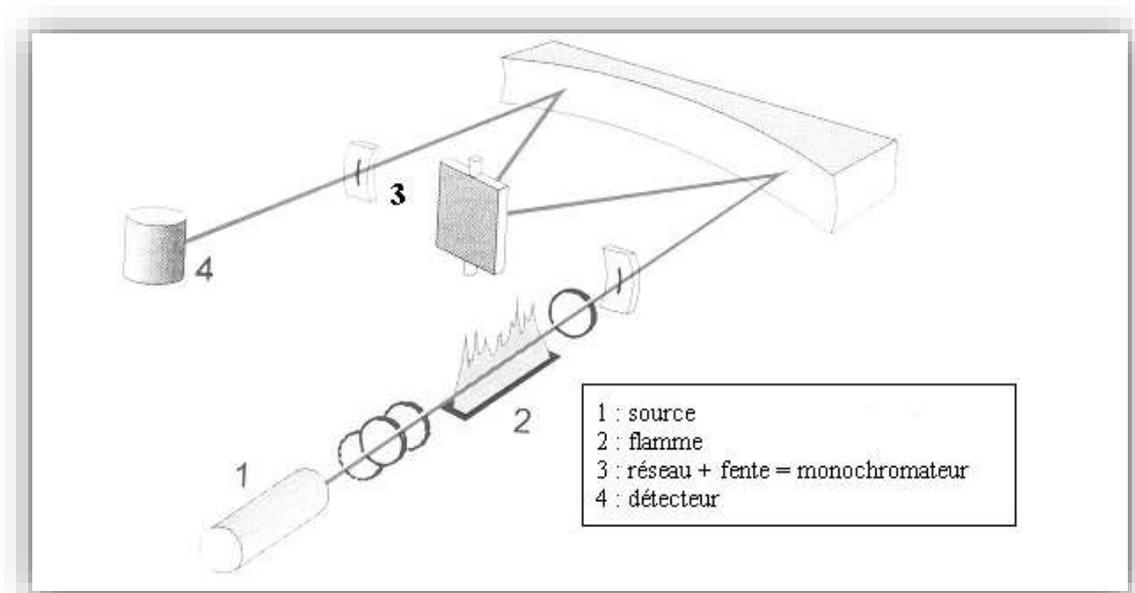


Figure 21: Principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre d'absorption atomique

V-4- Préparation de la gamme d'étalonnage du potassium

Une gamme d'étalonnage a été établie à partir d'une solution de chlorure de potassium (KCl) de concentration 10 mg.L^{-1} , comme décrit dans le tableau 3. Les échantillons ont été dosés par spectrophotomètre d'absorption atomique à $\lambda=766,5 \text{ nm}$.

Tableau 3: Préparation de la gamme d'étalonnage du potassium

$[\text{K}^+] \text{ mg L}^{-1}$	0,5	1	1,5	2	3	4	5
Solution KCl (mL)	0,25	0,5	0,75	1	1,5	2	2,5
Tampon $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{ClCs}$ (mL)	4,75	4,5	4,25	4	3,5	3	2,5

Les résultats trouvés grâce à la spectrophotométrie d'absorption atomique ont permis de tracer une courbe d'étalonnage de la concentration en K^+ en fonction de la densité optique (DO) représentée par la figure 22.

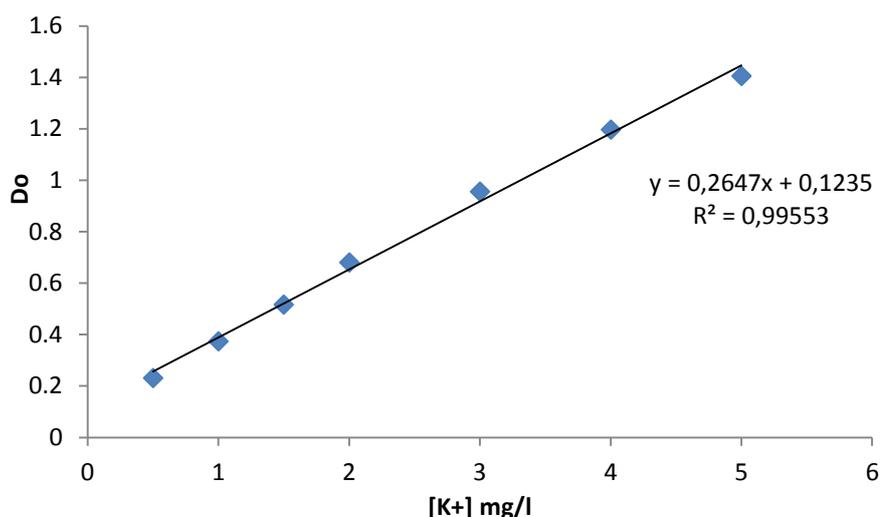


Figure 22: Courbe d'étalonnage de la solution de KCl

Cette courbe d'étalonnage va servir à déterminer les concentrations en K^+ des solutions a dosées ultérieurement et cela à partir de l'équation de la droite obtenue : $Y=0,2647X+0,1235$.

VI- Préparation des films polyéthylène basse densité traités par le plasma froid et fonctionnalisés par les peptides antibactériens

Les films d'emballages antimicrobiens à base de polyéthylène à basse densité demeurent un concept innovant en emballage alimentaire, le développement des microorganismes nuisibles à la surface des aliments est contrôlé par l'application du peptide antimicrobien à la surface du film.

Dans cette étape des films en polyéthylène faible densité (LDPE) (Polimeri Europa, France SAS), couramment utilisés dans le secteur de l'emballage alimentaire ont été coupés (2x2 cm) avec précision, lavés et dégraissés avec de l'éthanol 95°. Les films sont placés dans l'éthanol 95° dans un bain ultrason rempli d'eau distillée pendant 10 minutes à 25° C. Une fois lavés les films sont mis dans des boîtes de Petri fermées et laissés sécher à 30° C dans l'étuve. Une fois séchées les boîtes sont bouclées avec du para film afin d'éviter toute contamination. Après séchage les films sont traités avec du plasma radiofréquence à froid avec le gaz argon (Ar)/ oxygène O_2 (Karam et *al.*, 2013). Les conditions d'emploi des gaz utilisés sont présentées par le tableau 4.

Tableau 4: Récapitulatif des conditions d'emploi des gaz utilisés

Gaz	Débit (Cm³/min)	Temps (s)	Puissance (Watt)	Facteur de correction
N ₂	500	300	300	1
Ar/O ₂	1000(950/50)	245	420	Ar =1.43 O ₂ =0,996=1

Une fois traités par le plasma froid les films sont fonctionnalisés par les peptides antibactériens à étudier. Les films traités sont placés dans un flacon de 19 ml de préparation de peptide (préparé à 1mg/ml dans de l'eau milliQ et stérilisé à froid par un filtre 0,22 µm) avec des pinces stériles, une fois bien plongés au fond des flacons, les films sont incubés à 8°C pendant 18h.

Les films sont ensuite plongés successivement trois fois dans l'eau milliQ pendant 10 secondes puis mis dans la boîte de Petri correspondante. Les boîtes sont ensuite mises à sécher à 20°C pendant 6h. Après séchage les boîtes contenant les films imprégnés de peptides actifs sont conservées à 4°C.

VII- Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des films fonctionnalisés par les peptides antibactériens

Le but de cette expérience est d'évaluer l'activité antibactérienne des films polyéthylène basse densité traités par le plasma froid et fonctionnalisés par des peptides antibactériens et d'étudier la possibilité d'utiliser les peptides testés pour fonctionnaliser des surfaces modèles utilisées comme matériau d'emballage actif.

VII-1- Test qualitatif de l'activité antimicrobienne des films fonctionnalisés par les peptides antibactériens

L'activité antibactérienne des films polyéthylène basse densité traités par le plasma froid et fonctionnalisés par les peptides antibactériens a été mise en évidence par l'absence de croissance bactérienne sous le carré occupé par le film fonctionnalisé et ses contours sur milieu MH gélosé ensemencé par la souche à tester (*Listeria innocua* ou *Salmonella enteridis*). Les carrés des films traités sont mis en surface de milieu gélosé préalablement ensemencé et séché.

Une dilution bactérienne 200 fois des souches à tester est obtenue en rajoutant 250 µL d'une

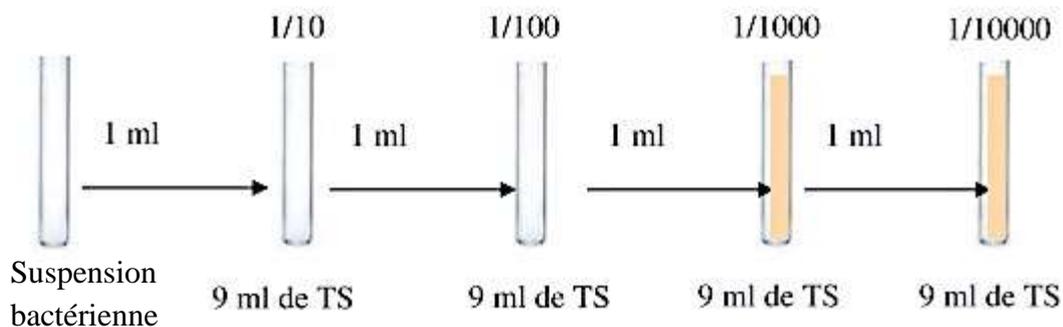
suspension bactérienne à 10^9 UFC.mL⁻¹ dans 50 mL de milieu MH. Ensuite, 2 mL de la suspension bactérienne diluée sont prélevés et déposés sur chaque boîte de Petri avec un milieu Mueller-Hinton (MH) gélosé. Après 5 min de repos, l'excès est enlevé avec une pipette pasteur et les boîtes sont séchées sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) pendant 30 min. Une fois séchés les films antibactériens sont déposés dans des conditions stériles sous hotte et avec des pinces stériles puis les boîtes sont incubées à 4°C pendant 4 heures pour permettre la diffusion de l'agent antibactérien (il faut bien étaler le film pour chasser les bulles d'air et avoir une meilleure diffusion). Enfin, les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24h et l'activité antimicrobienne est détectée par la présence de zone d'inhibition sous le carré occupé par le film fonctionnalisé et ses contours.

VII-2- Test quantitatif de l'activité antimicrobienne des films fonctionnalisés par les peptides antibactériens

VII-2- 1- Dénombrement de la suspension bactérienne préparée sans film (témoin)

Une dilution bactérienne 200 fois, a été préparée en rajoutant 250 µL de la suspension bactérienne de *Listeria innocua* dans 50 mL de milieu Mueller-Hinton. 1 mL de cette dilution est ensemencé dans 9 ml du milieu Tryptone sel (TS) stérile et ainsi une série de dilution est préparée dans un volume final de 10 mL, jusqu'à la dilution 10^{-4} .

- Préparation des dilutions 10^{-3} et 10^{-4}



100 µL des dilutions 10^{-3} et 10^{-4} ont été étalés stérilement sur les boîtes de milieu LB gélosé (3 étalements pour chaque dilution) qui seront incubées à 37°C pendant 24h. Une fois les boîtes de retour de l'incubateur, les colonies qui se sont développées sur le milieu sont comptées, et cela pour toutes les boîtes.

VII-2- 2- Dénombrement de la suspension bactérienne préparée après ajout des films traités aux peptides antibactériens

Afin d'étudier l'évolution de la charge bactérienne au cours du temps en présence du film fonctionnalisé par un peptide antibactérien, trois dénombrements sont réalisés : à $t=0$, puis à 5 et 30 minutes après avoir mis en contact le film pour chacune des dilutions bactériennes (10^{-3} et 10^{-4}).

Une dilution bactérienne 200 fois, a été préparée en rajoutant 250 μL de la suspension bactérienne de *Listeria innocua* dans 50 ml de milieu Mueller Hinton. Ensuite 5 ml de la dilution bactérienne ont été prélevés et mises dans des flacons stériles dans lesquels sont déposés les films traités et on laisse en contact avec la dilution bactérienne pendant 5 min sous agitation.

Après 5 minutes, 1 mL de cette dilution est prélevé etensemencé dans 9mL du milieu Tryptone sel (TS) stérile et ainsi une série de dilution est préparée dans un volume final de 10 mL, jusqu'à la dilution 10^{-4} .

Après 30 minutes, on prélève à nouveau 1 mL de la dilution bactérienne qu'on met dans 9 mL du milieu TS et une série de dilutions est réalisée jusqu'à 10^{-4} .

100 μL des dilutions 10^{-3} et 10^{-4} ont été étalés stérilement sur les boîtes de milieu LB gélosé (3 étalements pour chaque dilution) qui seront incubées à 37C° pendant 24h. Une fois les boîtes de retour de l'incubateur, les colonies qui se sont développées sur le milieu sont comptées, et cela pour toutes les boîtes.

Pendant la manipulation les différents tubes et dilutions sont placés dans la glace pour freiner la multiplication bactérienne.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

**CHAPITRE 1 : MÉCANISME ET MODÉLISATION DE
LA CINÉTIQUE DE L'HYDROLYSE PEPSIQUE DU
PEPTIDE ANTIBACTÉRIEN α 1-32 SYNTHÉTISÉ**

Les peptides possédant une activité biologique, comme l'activité analgésique (Takagi et *al.*, 1982), opioïde (Nyberg et *al.*, 2001), de stimulation de la croissance de bactéries gram-négatives (Zhao et *al.*, 1996), ou antimicrobienne (Liepke et *al.*, 2003) peuvent être obtenus par l'hydrolyse de nombreuses protéines.

L'hémoglobine bovine a été décrite comme une source endogène de peptides actifs (Ivanov et *al.*, 1997). En effet l'hydrolyse enzymatique de cette protéine engendre plusieurs peptides à activités biologiques, tels que les peptides opioïdes (Barkhudaryan et *al.*, 1993; Lignot et *al.*, 1999; Zhao et Piot, 1997), les peptides potentialisateurs de la bradykinine (Piot et *al.*, 1992), les peptides solubilisateurs d'hème (Lebrun et *al.*, 1998), les peptides stimulateurs de la croissance bactérienne (Zhao et *al.*, 1996), les peptides antihypertensifs (Yaba Adje et *al.*, 2011a) et les peptides antimicrobiens (Froidevaux et *al.*, 2001; Choisnard et *al.*, 2002; Daoud et *al.*, 2005; Nedjar-Arroume et *al.*, 2008 ; Catiau et *al.*, 2011ab ; Yaba Adje et *al.*, 2011ab).

Plusieurs études se sont intéressées à l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine (Vercaigne-Marko et *al.*, 2000, Choisnard et *al.*, 2002; Daoud et *al.*, 2005; Nedjar-Arroume et *al.*, 2006; Nedjar-Arroume et *al.*, 2008) et une quarantaine de peptides antibactériens issus de l'hydrolyse de l'hémoglobine ont été identifiés. Ces peptides actifs sont classés en trois familles pour la chaîne α et en deux familles pour la chaîne β : la famille α_1 dérivée du peptide α 1-32, la famille α_2 dérivée du peptide α 33-98, la famille α_3 dérivée du peptide α 107-141, et les familles β_1 et β_2 dérivées respectivement de peptides β 1-30 et β 114-145. En particulier, la famille dérivée de peptide α 1-32 se compose de peptides antibactériens et non toxiques qui pourraient être utilisés pour conserver des produits à base de viande au cours de leur stockage et de leur distribution (Nedjar-Arroume et *al.*, 2008).

Par conséquent, l'objectif de ce chapitre était de proposer un premier modèle simple avec le peptide synthétisé correspondant au fragment α 1-32 de l'hémoglobine bovine comme substrat, et en tenant compte de la variation de la température, du pH et du rapport enzyme/substrat (E/S) . Un tel modèle peut être utilisé pour définir les conditions optimales pour favoriser la production d'un peptide intermédiaire spécifique présentant une activité biologique intéressante. Finalement, les buts étaient (1) d'étudier la cinétique de l'hydrolyse enzymatique du peptide synthétisé α 1-32 et de l'influence de la température, du pH et du rapport E/S , d'établir le schéma réactionnel de cette l'hydrolyse, (2) d'étudier l'activité antibactérienne de la famille du peptide α 1-32, et (3) de développer un modèle mathématique

décrivant la cinétique de l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 , en tenant compte de l'influence de la température , du pH et du rapport E/S.

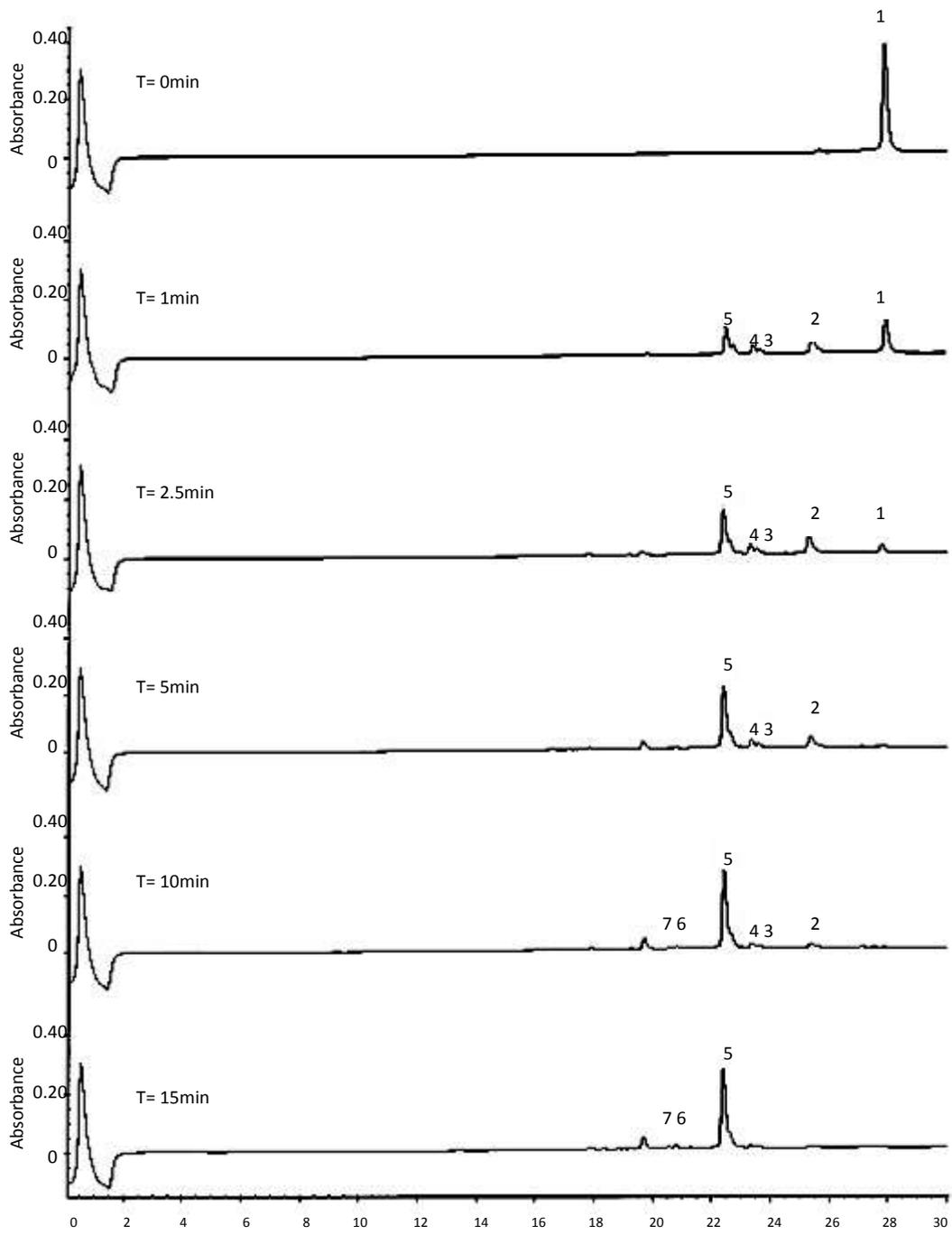
I- Identification et caractérisation des peptides issus de l'hydrolyse du peptide α 1-32 synthétisé

Le premier objectif de ce travail était d'étudier la cinétique d'hydrolyse enzymatique d'une famille de peptides antibactériens issus de l'hydrolyse d'un peptide synthétisé correspondant au fragment α 1-32 de l'hémoglobine bovine afin d'identifier les peptides générés et leur cinétique d'apparition, et enfin d'établir le schéma réactionnel de l'hydrolyse de cette famille de peptides. Vu la complexité de l'hydrolysate de l'hémoglobine bovine et afin d'avoir des résultats fiables on va utiliser pour ce premier chapitre un peptide α 1-32 synthétisé et pur.

L'hydrolyse par la pepsine du peptide α 1-32 synthétisé a été effectuée pour trois températures (15°C, 23°C et 37°C avec un pH=4,5 et un rapport E/S=1/100) et trois pH (3,5; 4,5 et 5,5 avec T=23°C et E/S=1/100), dans 0,1 M de tampon d'acétate de sodium, avec trois rapports E/S (1/50, 1/100 et 1/200 avec T=23°C et pH=4,5) et pendant 32 heures. Des échantillons de l'hydrolysate ont été prélevés à différents temps d'hydrolyse (0; 1; 2,5; 5; 10; 15; 30min et 1; 2; 3; 10; 24; 28 et 32h) et analysés par RP-HPLC et LC-ESI-MS dans le but d'identifier et de quantifier les peptides générés au cours de l'hydrolyse du peptide α 1-32.

RP-HPLC et LC-ESI-MS ont été couplés dans le but d'identifier les pics correspondant aux peptides générés au cours de l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32, grâce à leurs masses moléculaires et leurs temps de rétention et de pouvoir suivre l'évolution dans le temps de chacun de ces peptides.

La figure 23 montre le profil RP-CLHP de la cinétique d'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 à pH 4,5 et à 15°C. La masse moléculaire relative et les temps de rétention de chaque peptide sont énumérés dans le tableau 5.



(a)

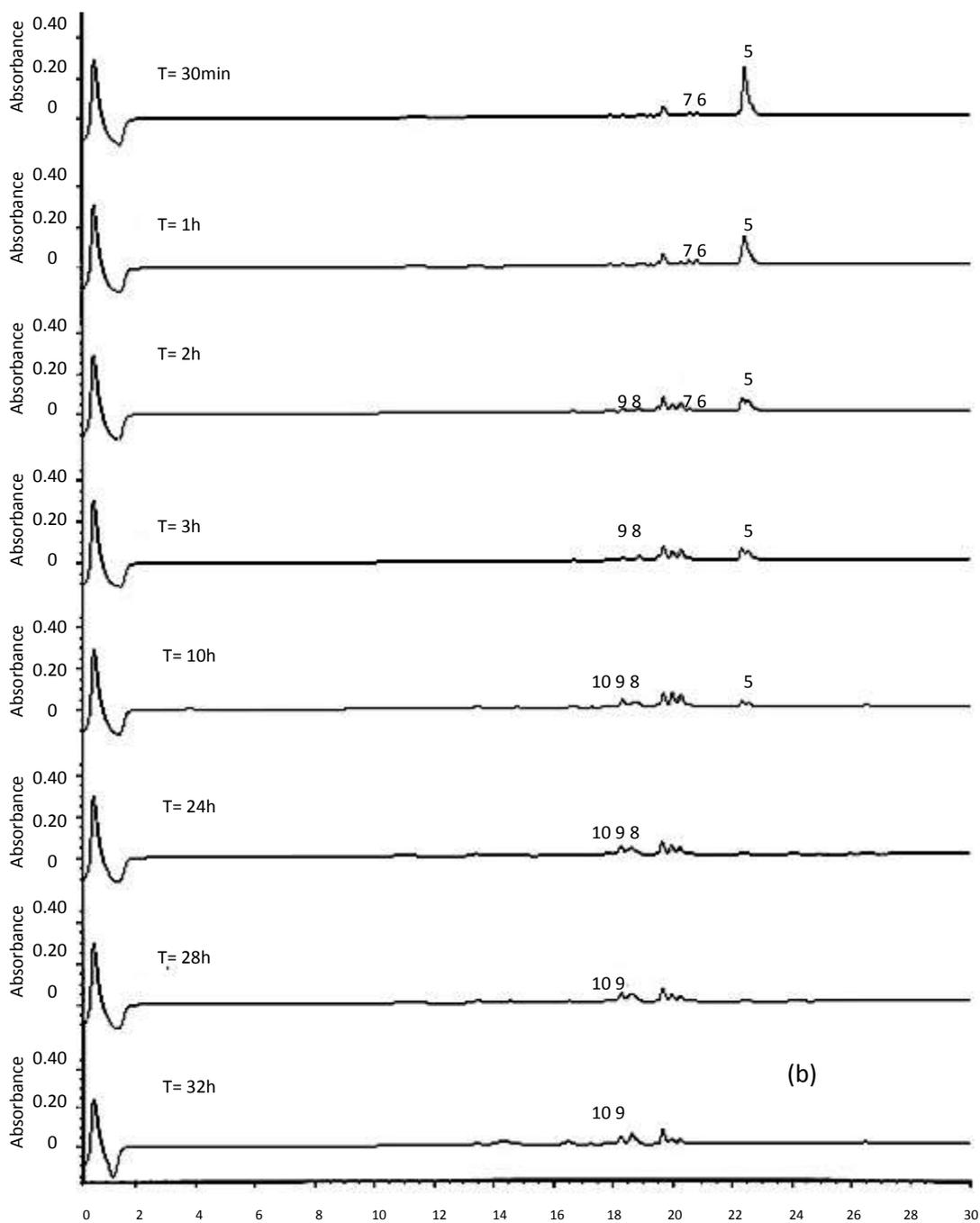


Figure 23: Profil RP-CLHP (a et b) de la cinétique d'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 à pH 4,5; E/S=100 et à 15°C (A=215nm)

L'analyse des chromatogrammes des hydrolysats à 15°C à différents temps d'hydrolyse a permis de suivre la disparition ou l'apparition de chaque peptide au cours de l'hydrolyse. Et on peut remarquer que la concentration de peptide α 1-32 dans l'hydrolysat (fraction 1, temps de rétention de 29,82min) diminue avant de disparaître après 5 min d'hydrolyse, ce qui correspondait à la coupure de ce peptide par la pepsine. La concentration des peptides α 1-29 (fraction 2, temps de rétention de 27,78min), α 1-28 (fraction 3, temps de rétention de 25,38min), α 1-27 (fraction 4, temps de rétention de 25,85min) et α 1-23 (fraction 5, temps de

rétenion de 24,43min) augmente dans l'hydrolysate jusqu'à 2,5 min pour les trois premiers peptides et 15 min pour le dernier d'entre eux, avant de diminuer. Cela suggère que α 1-29, α 1-28, α 1-27 et α 1-23 sont des peptides intermédiaires. Les concentrations des peptides α 3-23, α 5-23, α 1-14, α 3-14 et α 5-14 ont augmenté dans l'hydrolysate durant les 32 h d'hydrolyse. Ces peptides semblent être des peptides finaux.

Les profils chromatographiques des temps d'hydrolyse du peptide α 1-32 dans ces conditions (figures 23), montrent qu'au cours de l'hydrolyse pepsique le peptide a été rapidement converti en peptides intermédiaires de grande taille qui sont ensuite dégradés plus lentement en peptides finaux. Ce type de cinétique a été déjà observé au cours de l'hydrolyse de protéine dénaturée et correspond à un mécanisme "zipper" (Linderstrom-lang, 1952).

La concentration de chaque peptide a été calculée sur la base de l'aire de chaque pic sur les chromatogrammes de RP-CLHP. Conformément à la Loi de Beer-Lambert, le coefficient d'extinction molaire (ϵ) devait être pris en compte dans le calcul de la concentration.

Le coefficient d'extinction molaire a été estimé pour chaque peptide. Leurs valeurs ont été spécifiées dans le tableau 5. Il convient de mentionner que ce coefficient d'extinction molaire peut être normalement appliqué dans le cas des solutions pures. Dans notre cas, plusieurs peptides étaient présents dans les échantillons, de sorte que les interférences d'absorbance peuvent se produire ce qui pourrait provoquer des erreurs dans les calculs de concentrations. En effet, les résultats ont été soumis à l'ensemble de la variabilité de la procédure d'analyse (échantillons, l'analyse des chromatogrammes, calcul de capacité d'absorption molaire etc ...). Alors, afin de limiter les erreurs et de normaliser les valeurs de concentrations, les concentrations ont été exprimées en pourcentage de la concentration initiale du peptide α 1-32 (à $t = 0$), et la normalisation a été appliquée de telle sorte que la somme de tous les pourcentages de concentrations de peptides est toujours égale à 100 %.

Enfin, les concentrations de peptide ont été calculées comme suit :

$$\text{Concentration de peptide (\%)} = 100 \cdot A / A_0 \cdot \epsilon \cdot l$$

où A est l'aire du pic du peptide, A_0 est l'aire du pic du peptide α 1-32 à $t = 0$, ϵ est le coefficient d'extinction molaire du peptide à 215 nm ($M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et l est la longueur du trajet optique (1 cm dans le cas présent).

Tableau 5 : Masse moléculaire, temps de rétention, coefficient d'extinction molaire et séquence d'acides aminés de chaque peptide dérivé du peptide α 1-32

Fraction	Peptide	Masse (Da)	Nombre d'acides aminés	Temps de rétention (min)	Coefficient d'extinction molaire ($M^{-1}.cm^{-1}$) à 215 nm	Séquence d'acides aminés
1	α 1-32	3257,6	32	29,82	279900	VLSAADKGNV ¹⁰ KAAWG KVGGH ²⁰ AAEYGAEALE ³⁰ RM
2	α 1-29	2841,2	29	27,78	258900	VLSAADKGNV ¹⁰ KAAWG KVGGH ²⁰ AAEYGAEAL
3	α 1-28	2728	28	25,38	251900	VLSAADKGNV ¹⁰ KAAWG KVGGH ²⁰ AAEYGAE
4	α 1-27	2657	27	25,85	244900	VLSAADKGNV ¹⁰ KAAWG KVGGH ²⁰ AAEYGAEA
5	α 1-23	2236,5	23	24,43	206900	VLSAADKGNV ¹⁰ KAAWG KVGGH ²⁰ AEE
6	α 3-23	2024,2	21	22,76	192900	SAADKGNV ¹⁰ KAAWGKV GGH ²⁰ AEE
7	α 5-23	1866	19	22,64	178900	ADKGNV ¹⁰ KAAWGKVGG H ²⁰ AEE
8	α 1-14	1429,6	14	21,22	138000	VLSAADKGNV ¹⁰ KAAW
9	α 3-14	1217,3	12	20,48	124000	SAADKGNV ¹⁰ KAAW
10	α 5-14	1059,2	10	20,23	110000	ADKGNV ¹⁰ KAAW

Ces résultats ont permis de déterminer le schéma réactionnel d'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 dans les conditions d'étude (enzyme : la pepsine, rapport E/S=1/100, pH=4,5 et T=15°C). Le schéma réactionnel établi est décrit dans la figure 24. Dans un premier temps, l'hydrolyse de peptides α 1-32 génère quatre peptides qui sont les peptides α 1-29, α 1-28, α 1-27 et α 1-23. Puis, les peptides α 1-29, α 1-28 et α 1-27 sont clivés pour générer le peptide α 1-23, qui s'hydrolyse à son tour pour donner les peptides : α 3-23, α 5-23, α 1-14, α 3-14 et α 5-14.

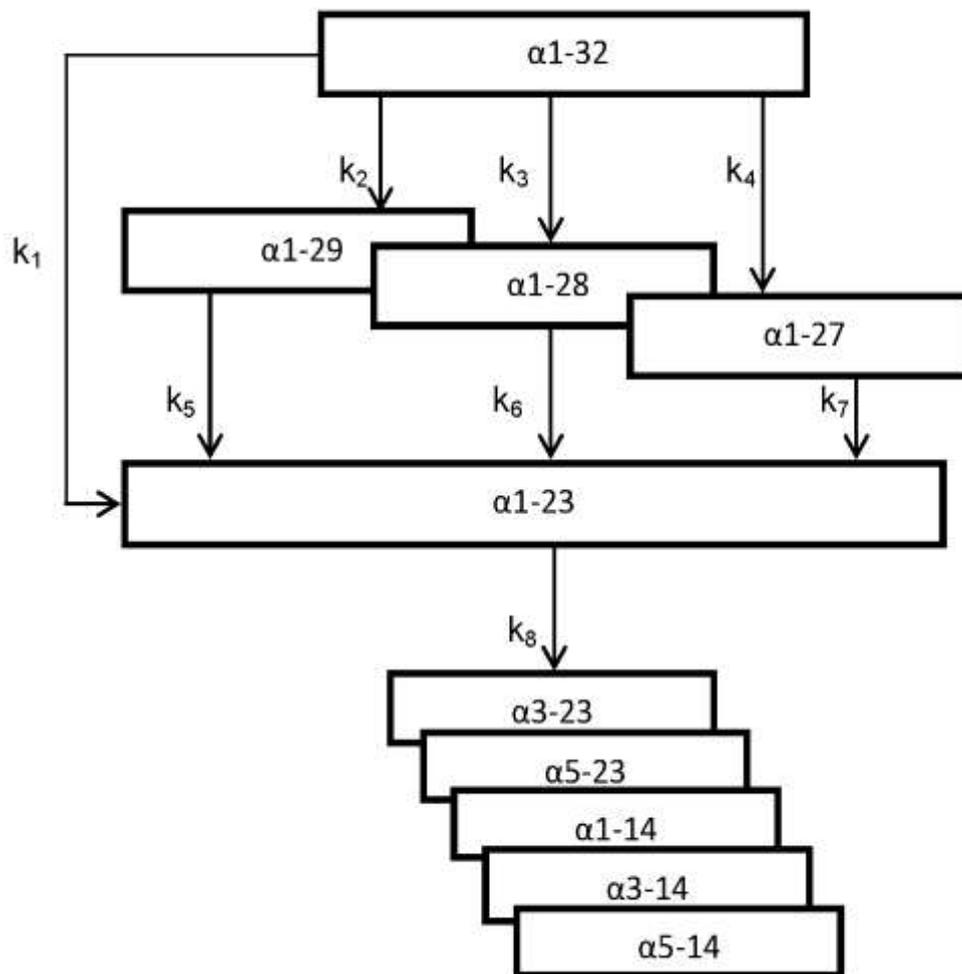


Figure 24: Schéma réactionnel de l'hydrolyse pepsique du peptide $\alpha 1-32$ synthétisé

Il est à préciser que les hydrolysats pepsique du peptide $\alpha 1-32$ à 23°C et 37°C (toutes les autres conditions étant les mêmes) sont purifiés par RP-HPLC et les pics correspondant aux peptides générés sont analysés et identifiés par LC-ESI-MS et le suivi de l'évolution dans le temps de chacun de ces peptides ont confirmé la même voie de réaction qu'à 15°C . Donc la température n'avait aucune influence sur la voie de réaction dans l'intervalle de température entre $15-37^\circ\text{C}$.

II- Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la famille des peptides antibactériens issus de l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 synthétisé

Les peptides ont été purifiés en plusieurs étapes par CLHP en phase inverse. Les fractions récupérées ont été identifiées et caractérisées par ESI-MS/MS. L'activité antimicrobienne des peptides a été testée vis-à-vis de quatre souches bactériennes : *Micrococcus luteus*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli* et *Salmonella enteritidis*.

Différents modèles mathématiques (<http://pbil.ibcp.fr>) ont été utilisés pour étudier ces peptides antibactériens purs et leurs caractéristiques structurales : le nombre d'acides aminés, le pourcentage de résidus hydrophobes, la charge globale, et la structure secondaire. Le tableau 6 présente les propriétés structurales des cinq peptides antibactériens étudiés. Tous les peptides actifs sont chargés positivement à pH 7. Ces peptides présentent certaines caractéristiques des peptides antibactériens étudiés par travaux antérieurs (Martínez-Araiza et al., 2012, Ruan et al., 2010). Ils contiennent plus d'une vingtaine de résidus d'acides aminés ayant une charge globale positive, une partie importante de résidus hydrophobes et un pourcentage élevé de structure en hélice α .

Tableau 6: Caractéristiques structurales des peptides antibactériens pure issus de l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 (<http://pbil.ibcp.fr>)

Peptides	Pourcentage de résidus hydrophobes (%)	Charge à pH 7	Prediction de structure secondaire
α 1-32	46	+1	58% hélice α
α 1-29	48	+1	58% hélice α
α 1-28	46	+1	50% hélice α
α 1-27	44	+1	50% hélice α
α 1-23	47	+2	47% hélice α

Pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI), l'activité antimicrobienne a été testée en milieu liquide sur microplaque dans du milieu Müller-Hilton contenant des concentrations variables de peptides. L'activité antimicrobienne est détectée par absence de croissance dans les puits contenant la souche et le peptide à la concentration testée. Cette méthode permet de calculer la concentration minimale inhibitrice qui correspond à la plus faible concentration de l'agent antimicrobien capable d'inhiber la croissance de la souche bactérienne testée après un temps d'incubation de 24h à 37°C. Les activités antibactériennes

du peptide α 1-32 et de quatre autres peptides obtenus après son hydrolyse ont été testées contre quatre espèces de bactéries : *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* et *Micrococcus luteus*, et les résultats sont présentés par le tableau 7.

Tableau 7: Valeurs de CMI (μM) de peptides antibactériens de la famille α 1-32 (CMI étant la concentration la plus faible du peptide qui inhibe totalement la croissance des espèces bactériennes après 24 h d'incubation à 37°C)

Peptides	CMI (μM)			
	Bactérie Gram (-)		Bactérie Gram (+)	
	<i>S.enteritidis</i>	<i>E.coli</i>	<i>L.innocua</i>	<i>M.luteus</i>
α 1-32	38	154	38	90
α 1-29	27	54	27	54
α 1-28	27	54	27	54
α 1-27	38	54	27	38
α 1-23	27	54	54	100

Le tableau 7 montre la concentration minimale inhibitrice des peptides α 1-32, α 1-29, α 1-28, α 1-27 et α 1-23 par rapport à ces souches bactériennes. Ces cinq peptides ont montré une activité antibactérienne contre les souches bactériennes testées. Pour chaque peptide testé à une concentration correspondant à la CMI, et quelles que soient les espèces bactériennes, la population de cellules a diminué d'au moins de 97 % après 24 heures d'incubation. Les valeurs de CMI obtenues pour les différents peptides dérivés de peptide synthétique α 1-32 sont en accord avec celles obtenues pour les mêmes peptides dérivés de l'hémoglobine bovine (Nedjar-Arroume et *al.*, 2008).

Les quatre peptides dérivés de l'hydrolyse du peptide α 1-32 ont présenté la même CMI contre *Escherichia coli* (μM 54), qui était environ trois fois plus faible que pour le peptide α 1-32 (154 μM) (tableau 7). Les peptides α 1-29, α 1-28 et en particulier α 1-27 semblaient plus actifs contre *Micrococcus luteus* (CMI de 54, 54 et 38 μM respectivement) que le peptide α 1-32 (CMI de 90 μM), alors que le peptide α 1-23 était moins efficace que ce dernier (CMI de 100 μM). Les résultats obtenus avec les tests contre *Salmonella enteritidis* et *Listeria innocua* étaient moins frappants. Les peptides α 1-29, α 1-28 et α 1-23 semblaient être plus actifs contre *Salmonella enteritidis* (CMI de 27 μM) que les peptides α 1-32 et α 1-27 (CMI de 38

μM). Des résultats similaires ont été obtenus contre *Listeria innocua*, sauf pour le peptide α 1-23, qui est apparu comme le moins actif parmi les peptides testés (CMI de $54 \mu\text{M}$).

Ainsi, selon les espèces bactériennes ciblées, il serait intéressant d'arrêter l'hydrolyse du peptide α 1-32 avec la plus grande concentration du peptide présentant la meilleure activité contre cette espèce bactérienne. D'où l'intérêt de la modélisation de la cinétique de l'hydrolyse afin de prédire le moment où l'hydrolyse doit être arrêtée.

III- Modélisation de la cinétique de l'hydrolyse enzymatique du peptide α 1-32 synthétisé

Au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine, plusieurs réactions parallèles et consécutives ont lieu et la cinétique d'hydrolyse est très complexe (Nedjar-Arroume et *al.*, 2006). Plusieurs études ont conduit à la modélisation de l'hydrolyse de divers substrats tels que la pomme de terre (Delgado et *al.*, 2009), la cellulose (Ye et Berson, 2011), le maltose (Findrik et *al.*, 2010) ou les rafles de maïs (Gil et *al.*, 2001), et les modèles proposés ont permis la prédiction des données expérimentales, ce qui permet d'optimiser les conditions d'hydrolyse en question. Les modèles mathématiques décrivant la cinétique enzymatique peuvent permettre le choix des conditions optimales pour obtenir des peptides à partir de protéines telles que les protéines de lactosérum (Martínez-Araiza et *al.*, 2012) ou du blanc d'œuf (Ruan et *al.*, 2010) ont été proposés. Une modélisation de la cinétique de l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine bovine a été proposée par Marquez et Vázquez (1999), qui s'inspirent de l'évolution du degré d'hydrolyse au cours du temps. À notre connaissance, un modèle permettant de décrire l'évolution des concentrations de peptides au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine n'a pas encore été proposé.

D'où l'importance de proposer un modèle permettant de décrire l'évolution des concentrations des peptides d'intérêt lors de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine, en tenant compte des conditions expérimentales (température, pH et rapport E/S). Le présent chapitre correspond à la première étape de cette approche globale, en travaillant sur un peptide synthétisé α 1-32 comme substrat moins complexe que celle de l'hémoglobine bovine.

L'hydrolyse des protéines est un phénomène complexe, la formalisation peut conduire à des modèles très complexes si des hypothèses simplificatrices ne sont pas faites. Le but de ce travail était de proposer un modèle qui pourrait décrire avec précision la cinétique d'hydrolyse

du peptide α 1-32, et qui ne serait pas trop complexe, de manière à faciliter la poursuite de son utilisation. Par conséquent, certaines hypothèses ont été formulées. On a supposé que les réactions enzymatiques sont irréversibles et que l'effet de la concentration de l'enzyme est négligeable en considérant qu'il y avait toujours assez d'enzyme pour la réalisation de l'hydrolyse du substrat. Enfin, les réactions de premier ordre avec des constantes apparentes de vitesse ont été supposées. L'agitation a été considérée comme parfaite, la vitesse globale d'apparition de peptide (disparition) a été considérée comme dépendante uniquement des réactions enzymatiques, en négligeant la résistance de transfert de masse. Comme il s'agissait d'hypothèses, les constantes de vitesse ont été considérées comme des constantes apparentes.

Selon ces hypothèses, et en se basant sur le schéma réactionnel établi ci-dessous (figure 24), l'évolution des concentrations des peptides a été décrite dans le temps par le système d'équations différentielles suivantes :

$$\frac{d\alpha_{1-32}}{dt} = -(k_1 + k_2 + k_3 + k_4)\alpha_{1-32}$$

$$\frac{d\alpha_{1-29}}{dt} = k_2\alpha_{1-32} - k_5\alpha_{1-29}$$

$$\frac{d\alpha_{1-28}}{dt} = k_3\alpha_{1-32} - k_6\alpha_{1-28}$$

$$\frac{d\alpha_{1-27}}{dt} = k_4\alpha_{1-32} - k_7\alpha_{1-27}$$

$$\frac{d\alpha_{1-23}}{dt} = k_1\alpha_{1-32} + k_5\alpha_{1-29} + k_6\alpha_{1-28} + k_7\alpha_{1-27} - k_8\alpha_{1-23}$$

α_{1-32} : la concentration du peptide α_{1-32}

α_{1-29} : la concentration du peptide α_{1-29}

α_{1-28} : la concentration du peptide α_{1-28}

α_{1-27} : la concentration du peptide α_{1-27}

α_{1-23} : la concentration du peptide α_{1-23}

Ce système d'équations différentielles a été résolu et les équations de la concentration des peptides obtenus au cours du temps de l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 synthétisé sont présentées dans le tableau 8. Les résultats expérimentaux ont été utilisés pour établir un modèle mathématique décrivant la cinétique de la concentration des peptides générés au cours de l'hydrolyse du peptide α 1-32.

Tableau 8: Équations de la concentration au cours du temps des peptides obtenus par l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 synthétisé

Peptides	Équations différentielles	Équations de la concentration au cours du temps d'hydrolyse
α 1-32	$\frac{d\alpha_{1-32}}{dt} = -(k_1 + k_2 + k_3 + k_4)\alpha_{1-32}$	$I_{1-32}(t) = I_0 e^{-(k_1+k_2+k_3+k_4)t}$ Avec $I_0=100\%$ (pourcentage du peptide α 1-32 à $t=0$)
α 1-29	$\frac{d\alpha_{1-29}}{dt} = k_2\alpha_{1-32} - k_5\alpha_{1-29}$	$I_{1-29}(t) = \frac{k_2 I_0}{(k_5) - (k_1 + k_2 + k_3 + k_4)} [(e^{-(k_1+k_2+k_3+k_4)t} - e^{-k_5 t})]$
α 1-28	$\frac{d\alpha_{1-28}}{dt} = k_3\alpha_{1-32} - k_6\alpha_{1-28}$	$I_{1-28}(t) = \frac{k_3 I_0}{(k_6) - (k_1 + k_2 + k_3 + k_4)} [(e^{-(k_1+k_2+k_3+k_4)t} - e^{-k_6 t})]$
α 1-27	$\frac{d\alpha_{1-27}}{dt} = k_4\alpha_{1-32} - k_7\alpha_{1-27}$	$I_{1-27}(t) = \frac{k_4 I_0}{(k_7) - (k_1 + k_2 + k_3 + k_4)} [(e^{-(k_1+k_2+k_3+k_4)t} - e^{-k_7 t})]$
α 1-23	$\frac{d\alpha_{1-23}}{dt} = k_1\alpha_{1-32} + k_5\alpha_{1-29} + k_6\alpha_{1-28} + k_7\alpha_{1-27} - k_8\alpha_{1-23}$	$I_{1-23}(t) = \frac{A}{(k_8) - (k_1 + k_2 + k_3 + k_4)} [(e^{-(k_1+k_2+k_3+k_4)t} - e^{-k_8 t})]$ $+ \frac{B}{(k_8) - (k_5)} [(e^{-(k_5)t} - e^{-k_8 t})]$ $+ \frac{C}{(k_8) - (k_6)} [(e^{-(k_6)t} - e^{-k_8 t})]$ $+ \frac{D}{(k_8) - (k_7)} [(e^{-(k_7)t} - e^{-k_8 t})]$ $A = I_0 [k_1 + \frac{k_5 k_2}{(k_5) - (k_1 + k_2 + k_3 + k_4)} + \frac{k_6 k_3}{(k_6) - (k_1 + k_2 + k_3 + k_4)} + \frac{k_7 k_4}{(k_7) - (k_1 + k_2 + k_3 + k_4)}]$ $B = I_0 [\frac{k_5 k_2}{(k_5) - (k_1 + k_2 + k_3 + k_4)}]$ $C = I_0 [\frac{k_6 k_3}{(k_6) - (k_1 + k_2 + k_3 + k_4)}]$ $D = I_0 [\frac{k_7 k_4}{(k_7) - (k_1 + k_2 + k_3 + k_4)}]$

Les équations présentées par le tableau 8 ont été utilisées pour estimer à l'aide du Solveur Microsoft Excel la concentration de chaque peptide à chaque instant de l'hydrolyse.

Les cinétiques d'hydrolyse du peptide α 1-32 par la pepsine à différentes températures, à savoir 15, 23 et 37°C et pendant 32 h, sont présentées dans la figure 25 (les motifs sont les résultats expérimentaux et les lignes continues sont les résultats prédits par le modèle), avec un accent sur la première demi-heure pour mieux voir l'évolution des concentrations des peptides dans la figure 26. Comme prévu, il est apparu clairement que la cinétique a été accélérée, en augmentant la température. À titre d'exemple, le peptide α 1-32 a complètement disparu en environ 5 min à 15°C, 3 min à 23°C et moins de 2 min à 37°C, donc la vitesse de son hydrolyse en peptides finaux et intermédiaires augmente avec la température.

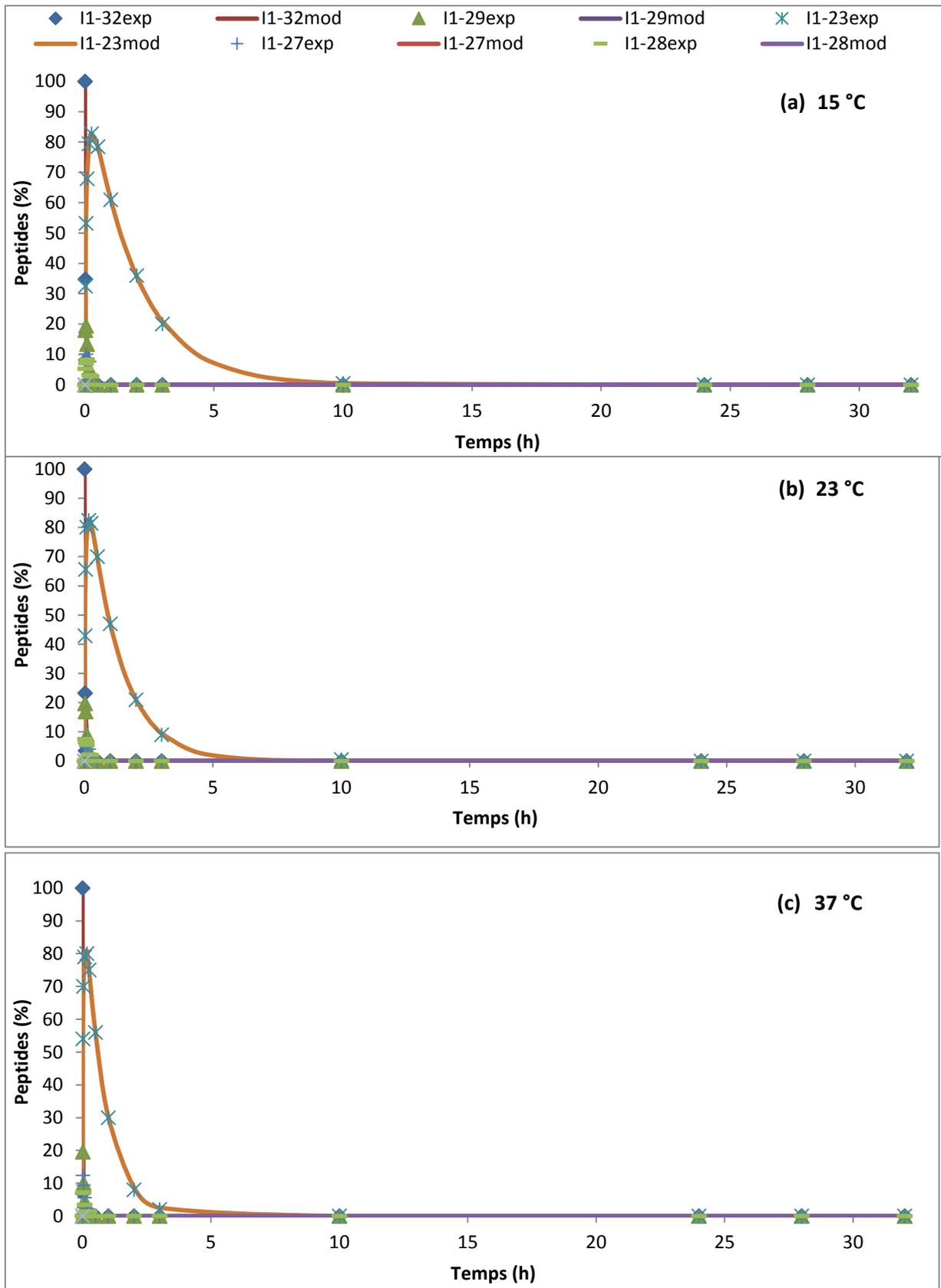


Figure 25: Évolution des concentrations (expérimentale et le modèle) de peptides générés pendant l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 (a) à 15°C, (b) à 23°C et (c) à 37°C (pH=4,5 et E/S=1/100) 32 h d'hydrolyse

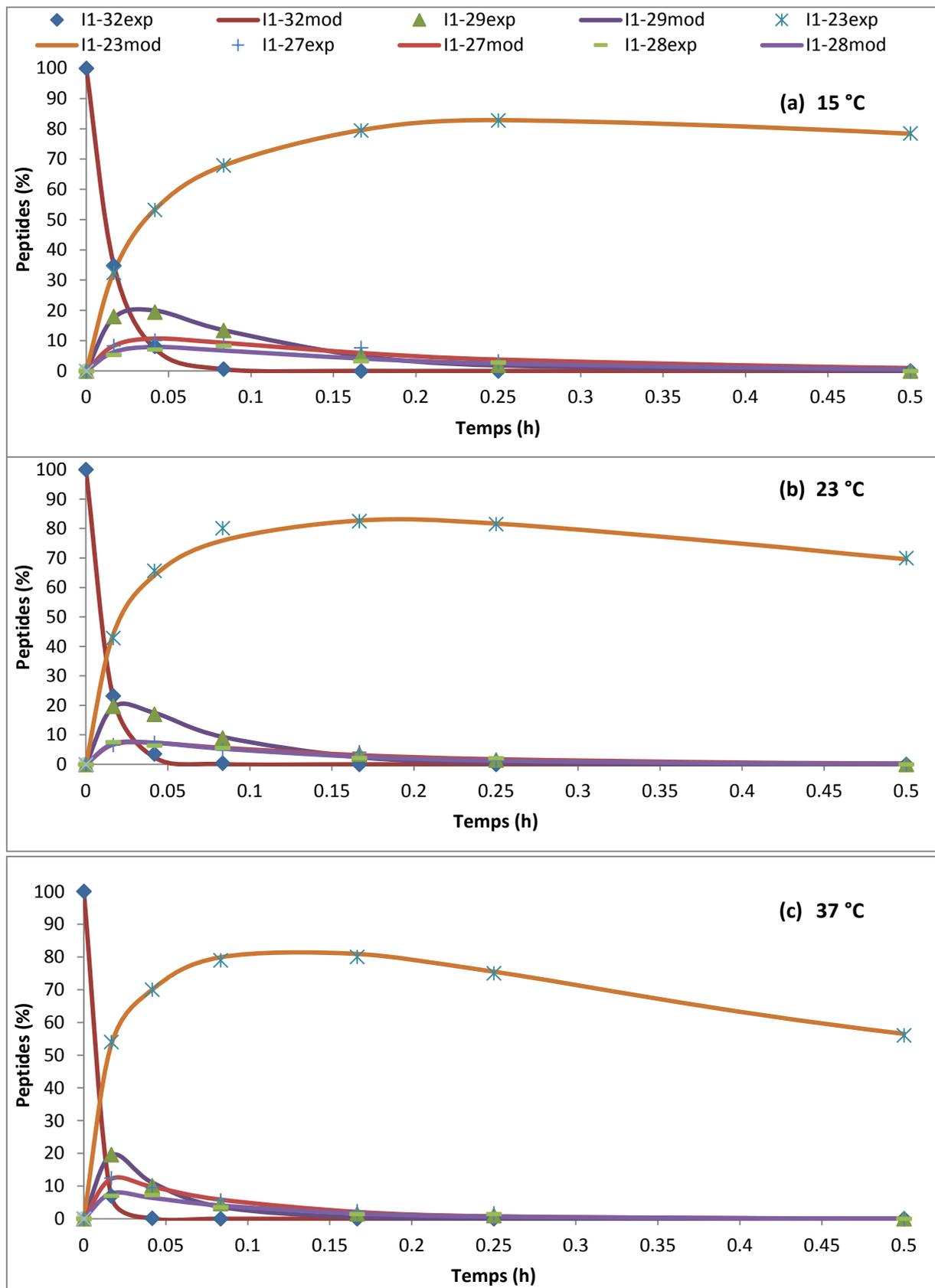


Figure 26: Évolution des concentrations (expérimentale et le modèle) de peptides générés pendant l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 (a) à 15°C, (b) à 23°C et (c) à 37°C (pH=4,5 et E/S=1/100) 30 minutes d'hydrolyse

La figure 26 présentant les données expérimentales et ceux du modèle de la cinétique de la famille des peptides issus de l'hydrolyse enzymatique du peptide α 1-32, pour les trois températures testées montre que les résultats expérimentaux et les prédictions du modèle sont en bon accord, pour toutes les températures, avec un NRMSD (normalized Root mean square deviation) en moyenne de 4,1% (4,4%, 3,9% et 4,0% pour 15, 23 et 37°C respectivement). Par conséquent, le modèle proposé est apparu comme pertinent pour décrire les cinétiques de concentration de la famille du peptide α 1-32 (pour les conditions opératoires testées). Il semble que, dans ces conditions, l'hypothèse de la cinétique du premier ordre (supposer que l'enzyme était toujours disponible) a été validée.

Les valeurs des constantes apparentes de vitesse (k_1 à k_8) ont été déterminées grâce au solveur Microsoft Excel, en minimisant l'écart quadratique moyen normalisé NRMSD entre les données expérimentales et modèle (voir les détails dans Matériels et Méthodes). Les résultats obtenus pour les valeurs de constantes apparentes sont donnés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Valeurs des constantes apparentes de vitesse et paramètres de l'équation d'Arrhenius en fonction de la température (pH=4,5 et E/S=1/100)

T (K)	288	296	310	Coefficient de determination (R ²)	Énergie d'activation (J.mol ⁻¹)
k₁ (h⁻¹)	28,73	45,89	75,37	0,986	32015
k₂ (h⁻¹)	19,05	26,39	45,32	0,999	29253
k₃ (h⁻¹)	6,36	8,80	15,04	0,999	29058
k₄ (h⁻¹)	8,45	8,32	24,16	0,849	37633
k₅ (h⁻¹)	12,21	16,22	26,90	0,999	26743
k₆ (h⁻¹)	6,07	8,69	10,97	0,935	19269
k₇ (h⁻¹)	5,49	7,08	12,37	0,994	27705
k₈ (h⁻¹)	0,54	0,80	1,24	0,987	27705

Le tableau 9 montre une augmentation des constantes apparentes de vitesse en fonction de la température d'hydrolyse. On peut expliquer l'augmentation de la vitesse de la réaction d'hydrolyse avec la température par le fait que l'accroissement de température fait augmenter la vitesse moyenne des molécules. En conséquence, plus les molécules posséderont une énergie cinétique suffisante pour produire des collisions efficaces plus la réaction sera rapide.

La température augmente également la vitesse enzymatique puisque l'interaction entre la pepsine et la famille des peptides issus du peptide α 1-32 devient plus importante à sa température optimale d'hydrolyse qui est de 37°C (Ryle, 1984).

III-1- Effet de la température sur la cinétique d'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 synthétisé

La dépendance des constantes apparentes de vitesse en fonction de la température a été établie au moyen de l'équation d'Arrhenius classique :

$$k = F \cdot e^{\frac{-E_a}{R \cdot T}}$$

où k est la constante de vitesse apparente (s^{-1} ou h^{-1}),

F est le facteur exponentiel (s^{-1} ou h^{-1}),

E_a est l'énergie d'activation ($J \cdot mol^{-1}$),

R est la constante universelle des gaz ($J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$) et T est la température (K).

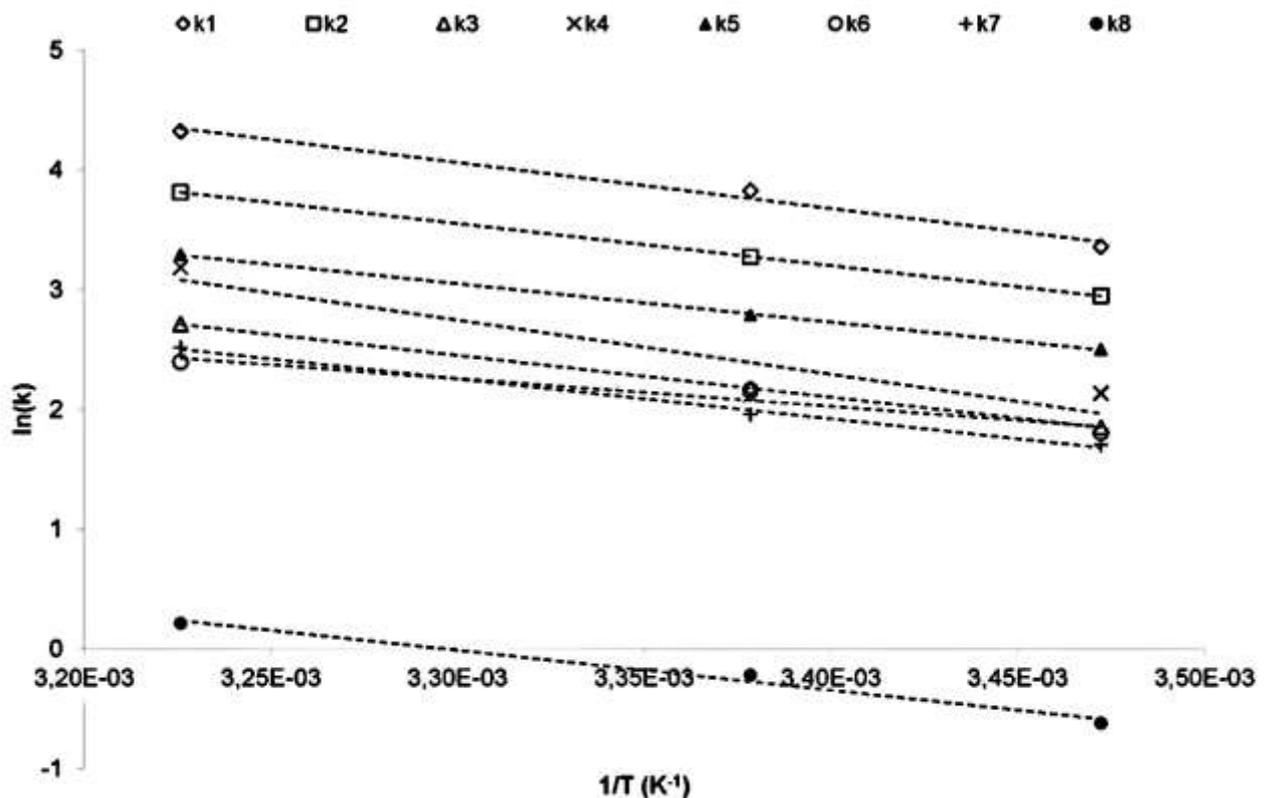


Figure 27: Linéarisation de l'équation d'Arrhenius

La linéarisation de l'équation d'Arrhenius a été réalisée de manière à déterminer le facteur d'activation et les valeurs d'énergie exponentielles. La figure 27 montre les relations linéaires trouvées entre le logarithme de la constante apparente de vitesse ($\ln(k)$) et l'inverse de la température ($1/T$). Les valeurs obtenues pour les énergies d'activation et les coefficients de détermination (R^2) sont données dans le tableau 9. Compte tenu des valeurs de R^2 , il est apparu que la dépendance des valeurs des constantes apparentes de vitesse en fonction de la température respecte le modèle selon l'équation d'Arrhenius classique. On peut également remarquer que l'énergie d'activation pour les différentes réactions mises en jeu sont relativement faibles et qu'elle est la plus élevée pour la constante k_4 , ce qui suggère qu'il faut plus d'énergie pour hydrolyser le peptide α 1-32 en α 1-27 que les autres peptides ce qui explique la petite quantité de ce peptide produite lors de l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32, et la plus faible pour la constante k_6 , ce qui explique la transformation rapide du peptide α 1-28 en α 1-23.

III-2- Effet du pH sur la cinétique d'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 synthétisé

L'évolution de la concentration de la famille de peptides issus de l'hydrolyse par la pepsine du peptide α 1-32 synthétisé a été étudiée à différents pH: 3,5; 4,5 et 5,5 (les autres conditions étant $T=23$ °C, $E/S=1/100$). Les données expérimentales et celles proposées par le modèle de cette cinétique sont présentées dans la figure 28 pour les trois pH testés. Les valeurs des constantes apparentes de vitesse à différents pH sont données dans le tableau 10. Les résultats ont montré que les cinétiques ont été décélérées avec l'augmentation de la valeur du pH, et qui est le plus élevé à un pH de 3,5. On remarque aussi que les constantes apparentes de vitesse diminuent d'une manière linéaire en augmentant le pH. En effet, chaque enzyme a un intervalle de pH approprié qui contribue à l'entretien de sa structure tridimensionnelle dans le site actif et fournit des groupes ionisables essentiels.

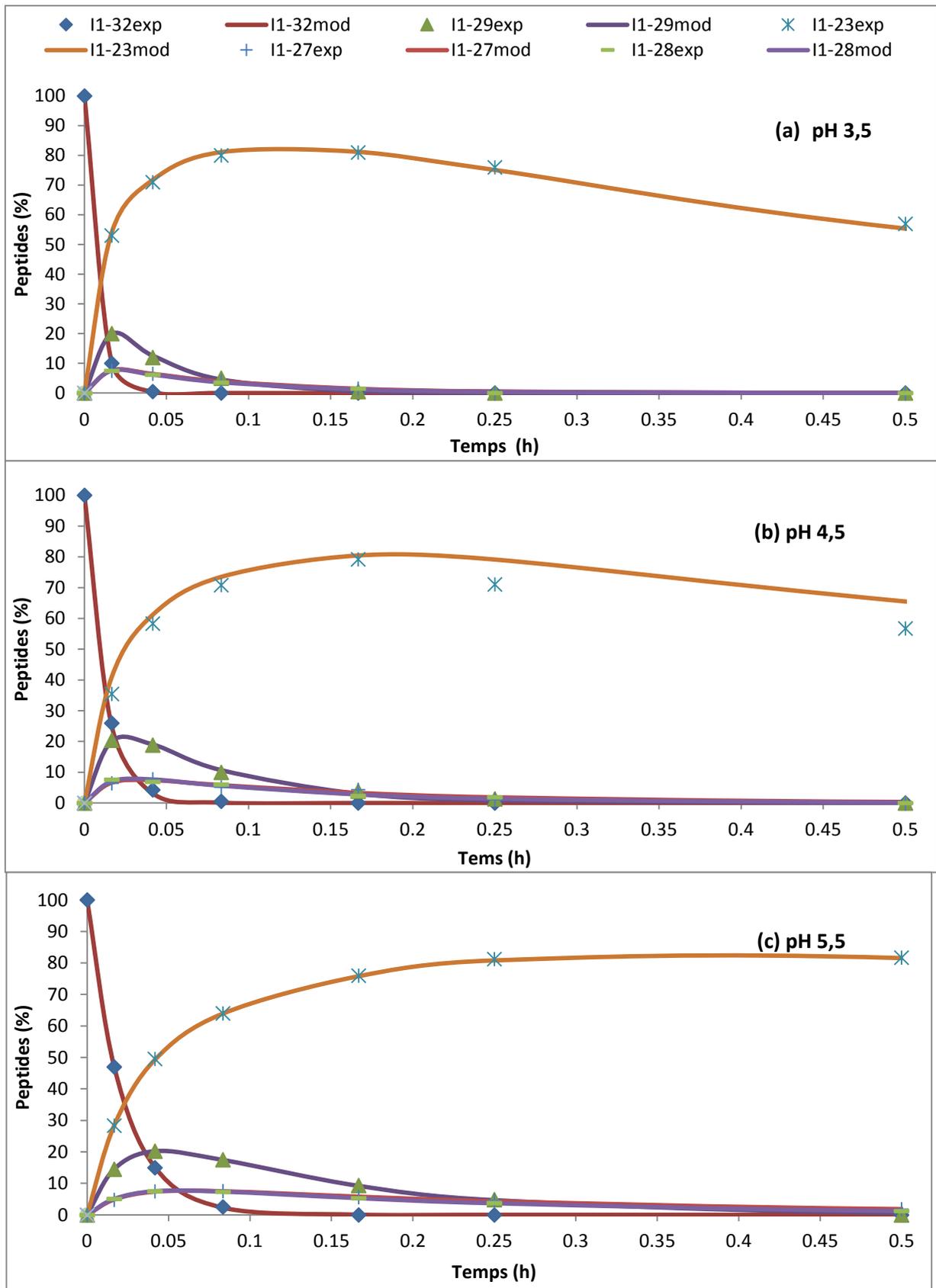


Figure 28: Évolution des concentrations (expérimentale et le modèle) de peptides générés pendant hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 (a) à pH 3,5; (b) à pH 4,5 et (c) à pH 5,5 ($T=23^{\circ}\text{C}$ et $E/S=1/100$)

La figure 28 montre que les données expérimentales et les prédictions du modèle pour la cinétique d'hydrolyse des peptides de la famille α 1-32 sont en bon accord pour les différents pH avec une moyenne de NRMSD (écart quadratique moyen normalisé permettant de minimiser l'écart entre les valeurs expérimentales et les valeurs données par le modèle) de 1,80 %. Ce modèle a permis de déterminer les équations de la dépendance des constantes apparentes de vitesse en fonction du pH en considérant une augmentation linéaire de la vitesse de réaction d'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 synthétisé en fonction du pH.

L'équation de la dépendance des constantes de vitesse apparentes en fonction du pH a été établie par l'équation d'une droite (tableau 10) :

$$k = a * x + b$$

où k est la constante de vitesse apparente (s^{-1}), x est le pH, a est la pente de la droite b est l'ordonnée à l'origine.

Tableau 10: Valeurs des constantes apparentes de vitesse et paramètres de l'équation de la dépendance des constantes apparentes de vitesse en fonction du pH (T=23°C, E/S=1/100)

pH	3,5	4,5	5,5	Coefficient de détermination (R ²)	Linéarisation	
					pente (a)	B
k₁ (h⁻¹)	70,59	45,89	23,09	0,985	-23,75	153,40
k₂ (h⁻¹)	39,86	26,39	13,42	0,993	-13,22	86,05
k₃ (h⁻¹)	13,31	8,80	4,51	0,990	-4,40	28,68
k₄ (h⁻¹)	13,36	8,32	4,32	0,991	-4,52	29,02
k₅ (h⁻¹)	24,70	16,22	8,19	0,992	-8,26	53,53
k₆ (h⁻¹)	13,11	8,69	4,36	0,998	-4,37	28,41
k₇ (h⁻¹)	12,12	7,08	3,46	0,998	-4,33	27,03
k₈ (h⁻¹)	1,27	0,80	0,40	0,980	-0,44	2,78

D'après les valeurs des coefficients de détermination de l'équation de la dépendance des constantes apparentes de vitesse en fonction du pH (R²=0,99) présentées dans le tableau 10, on peut confirmer que la vitesse de l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 augmente d'une manière linéaire en diminuant le pH dans l'intervalle 3,5-5,5.

III-3- Effet du rapport enzyme/substrat sur la cinétique d'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 synthétisé

L'évolution de la concentration des peptides issus de l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 synthétisé est étudiée avec différents rapports enzyme/substrat: 1/50; 1/100 et 1/200 (mole//mole)(les autres conditions étant $T=23^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=4,5$). Les données expérimentales et celles proposées par le modèle de cette cinétique sont présentés dans la figure 31 pour les trois rapports enzyme/substrat testés. Les valeurs des constantes apparentes de vitesse à différents rapports enzyme/substrat sont données dans le tableau 11.

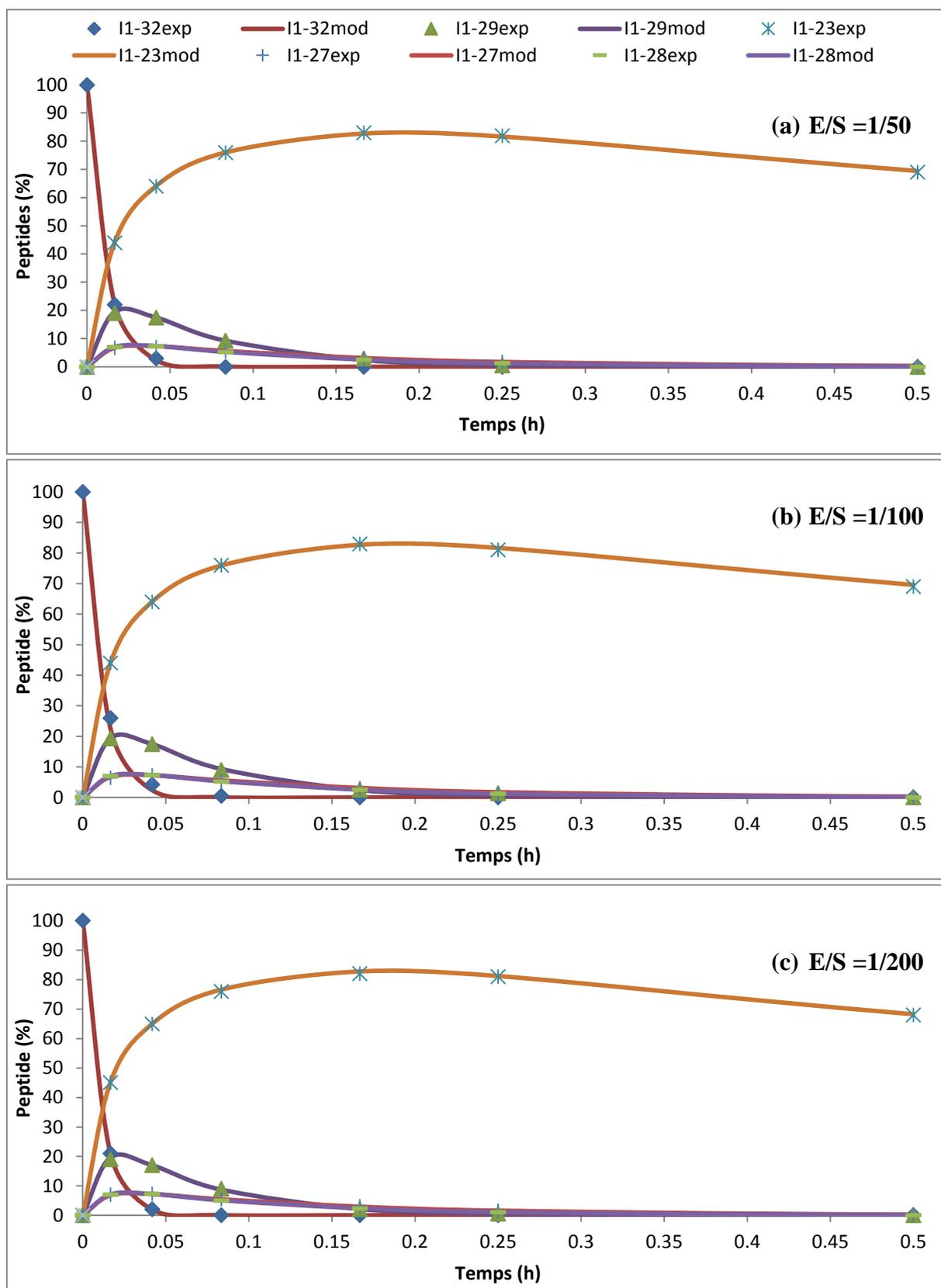


Figure 29: Évolution des concentrations (expérimentale et le modèle) de peptides générés pendant hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 (a) à E/S=1/50; (b) à E/S=1/100 et (c) à E/S=1/200 (T=23°C et pH 4,5)

Tableau 11: Valeurs des constantes apparentes de vitesse à différents rapports E/S
(T=23°C, pH=4,5)

E/S	1/50	1/100	1/200
k₁ (h⁻¹)	46,02	45,89	44,39
k₂ (h⁻¹)	26,22	26,39	25,91
k₃ (h⁻¹)	8,95	8,80	8,54
k₄ (h⁻¹)	8,36	8,32	7,74
k₅ (h⁻¹)	16,31	16,22	14,59
k₆ (h⁻¹)	8,63	8,69	8,32
k₇ (h⁻¹)	7,12	7,08	6,74
k₈ (h⁻¹)	0,81	0,80	0,69

Les résultats présentés par la figure 31 et le tableau 11, montrent que les cinétiques ont été légèrement accélérées avec l'augmentation de la valeur du rapport enzyme/substrat de 1/200 à 1/100. On remarque également que la vitesse de la cinétique est restée constante pour l'intervalle du rapport E/S entre 1/50 et 1/100. En effet, à une certaine concentration d'enzyme, la vitesse de la cinétique reste constante puisqu'il y aura suffisamment d'enzyme pour hydrolyser les liaisons peptidiques, ainsi l'augmentation de sa concentration sera sans effet sur la vitesse d'hydrolyse du peptide α 1-32. Ces observations sont en accord avec les hypothèses mis en place au début de notre travail qui suggèrent que les réactions enzymatiques mises en jeu lors de l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32, sont irréversibles et que l'effet de la concentration de l'enzyme est négligeable en considérant qu'il y avait toujours assez d'enzyme pour la réalisation de l'hydrolyse du substrat.

III-4- Validation du modèle de la cinétique d'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 synthétisé

Le modèle proposé a permis de prédire la cinétique l'hydrolyse du peptide α 1-32, les constantes apparentes de vitesse et les concentrations des peptides d'intérêt à chacune des températures entre 15 et 37°C et à chaque pH compris entre 3,5 et 4,5 et ceux à chaque moment de l'hydrolyse du peptide 1-32. Pour effectuer la validation du modèle et de vérifier sa capacité de prédiction, deux hydrolyses du peptide α 1-32, ont été effectuées une à 30°C (pH= 4,5 et E/S=1/100), et une à pH 5 (T=23°C et E/S=1/100). Les résultats obtenus ont été comparés aux valeurs prédites pour la même température et le même pH à l'aide du modèle mathématique. La cinétique prédite par le modèle et les résultats expérimentaux sont présentés par la figure 29 pour la température et la figure 30 pour le pH.

À notre connaissance, seuls Marquez et Vázquez, 1999 ont publié un modèle décrivant la cinétique de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine. Cependant, les données ne présentaient que l'évolution du degré d'hydrolyse en fonction du temps (pas de données pour la cinétique de chaque peptide).

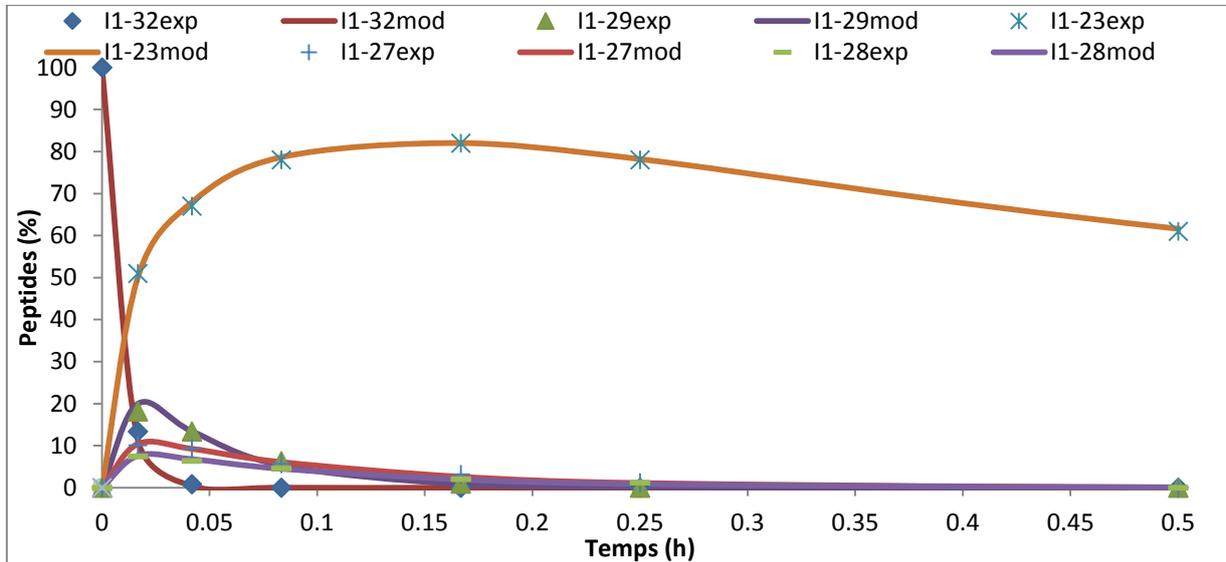


Figure 30: Comparaison des cinétiques prédites et expérimentales de peptides générés pendant hydrolyse du peptide α 1-32 à 30°C (E/S=1/100 et pH 4,5)

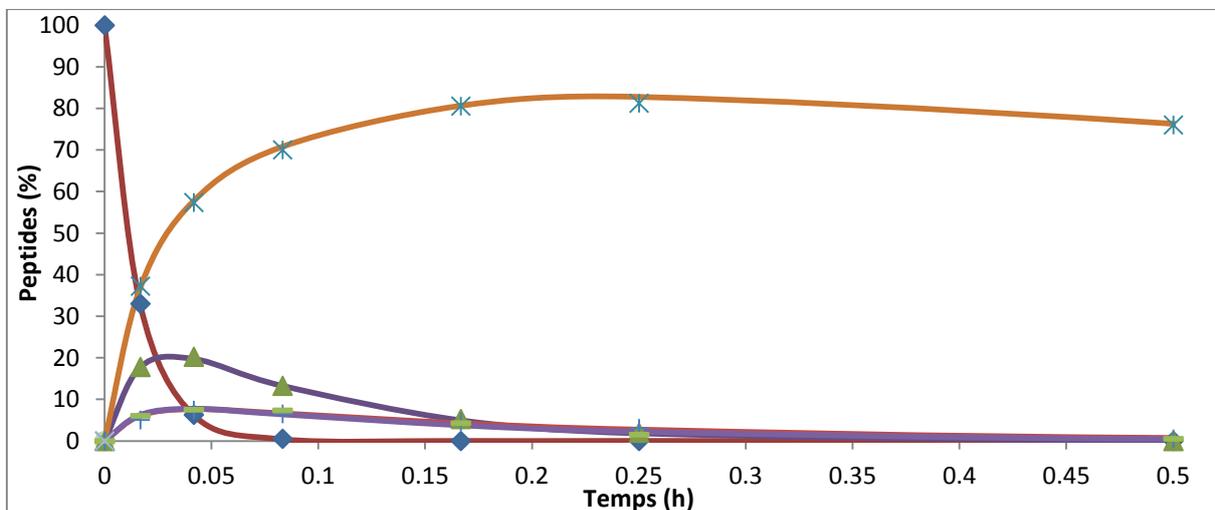


Figure 31: Comparaison des cinétiques prédites et expérimentales de peptides générés pendant hydrolyse du peptide α 1-32 à pH 5 (E/S=1/100 et à 23°C)

Comme le montre la figure 29 et la figure 30 les prédictions du modèle et les données expérimentales sont en bon accord avec un NRMSD (écart quadratique moyen normalisé permettant de minimiser l'écart entre les valeurs expérimentales et les valeurs données par le modèle) de 3,2% pour la température et 2,8% pour le pH. Cette validation a confirmé que le

modèle proposé est en mesure de prédire l'évolution de la concentration des peptides étudiés pendant l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 à une température donnée dans l'intervalle de 15 à 37° C (pour les conditions expérimentales étudiées, c'est à dire un rapport E/S=1/100 et pH=4,5) et un pH donné dans l'intervalle de 4,5 à 5,5 (avec un rapport E/S=1/100 et T=23°C).

Conclusion

L'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 synthétisé a permis l'obtention de peptides intermédiaires, qui ont présenté une activité antibactérienne contre quatre espèces bactériennes. L'identification des peptides intermédiaires et finaux a permis de proposer un schéma réactionnel décrivant les réactions parallèles et consécutives qui ont lieu au cours de l'hydrolyse. Un modèle mathématique basé sur le mécanisme proposé, a été développé pour décrire la cinétique de l'hydrolyse des peptides de la famille α 1-32.

L'influence de la température sur les coefficients cinétiques a été interprétée par le biais de l'équation d'Arrhenius, permettant le calcul des énergies d'activation pour les différentes réactions impliquées dans le mécanisme. L'effet du pH et du rapport E/S était également étudié et le modèle trouvé a démontré une augmentation de la vitesse d'hydrolyse en diminuant le pH (entre 3,5 et 5,5) et une vitesse invariable avec le rapport E/S. La validation du modèle a pu évaluer la capacité du modèle proposé de prévoir la cinétique de l'hydrolyse du peptide α 1-32 dans la plage de température de 15 à 37°C (un rapport enzyme/substrat 1/100 et à pH 4,5) et dans l'intervalle de pH entre 3,5 et 5,5 (un rapport enzyme/substrat 1/100 et à 23°C). Ce modèle mathématique peut permettre de définir les conditions optimales pour la production de divers peptides ayant une activité antibactérienne à partir de l'hydrolyse du peptide α 1-32 synthétisé.

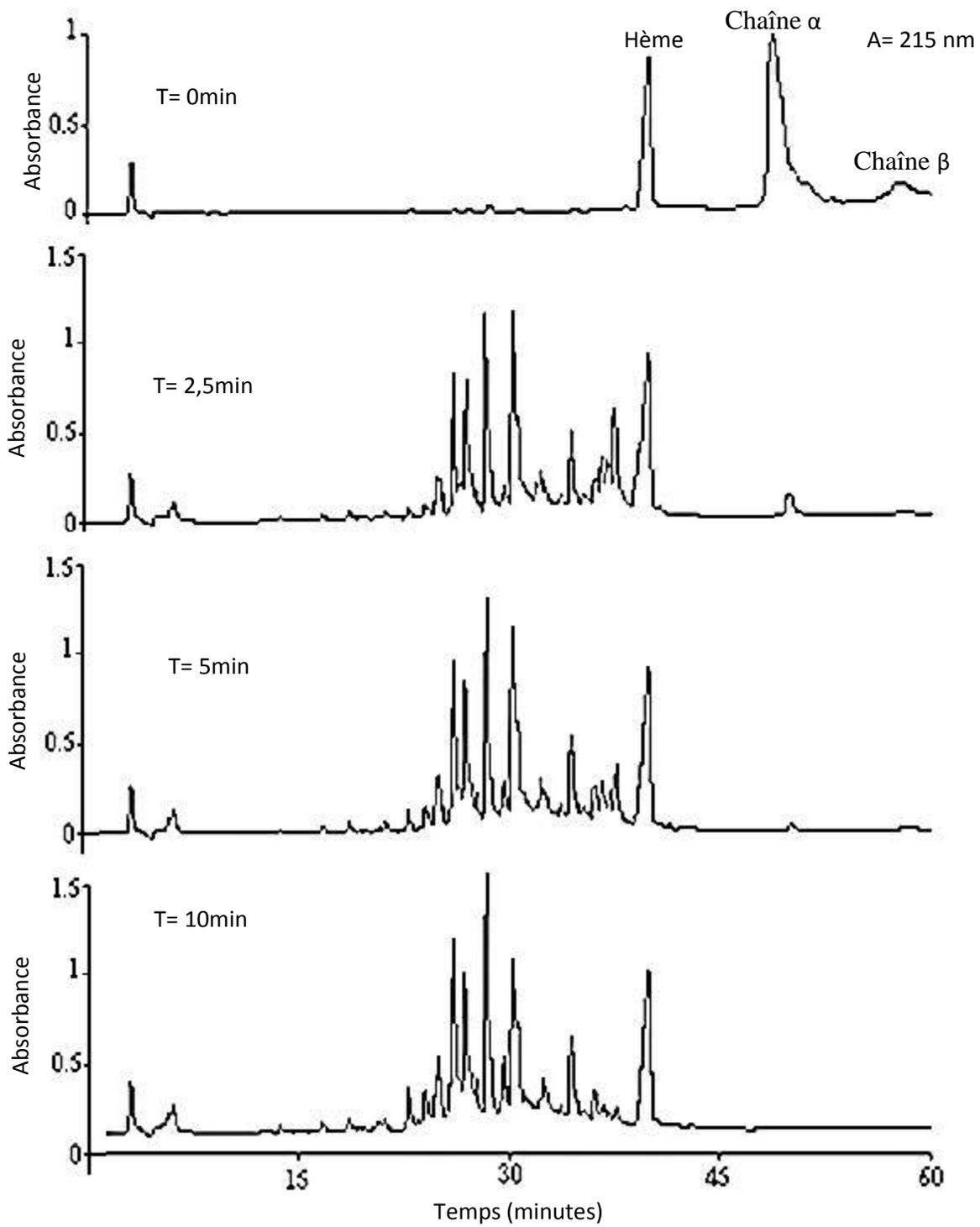
Les résultats de ce chapitre ont fait le sujet d'une première publication (Annexe 1).

**CHAPITRE 2: GÉNÉRALISATION DU MODÈLE
MATHÉMATIQUE SUR LA CINÉTIQUE DE DEUX
FAMILLES DE PEPTIDES ANTIBACTÉRIENS ISSUS
DE L'HYDROLYSE PEPSIQUE DE L'HÉMOGLOBINE
ET DU CRUOR BOVINS**

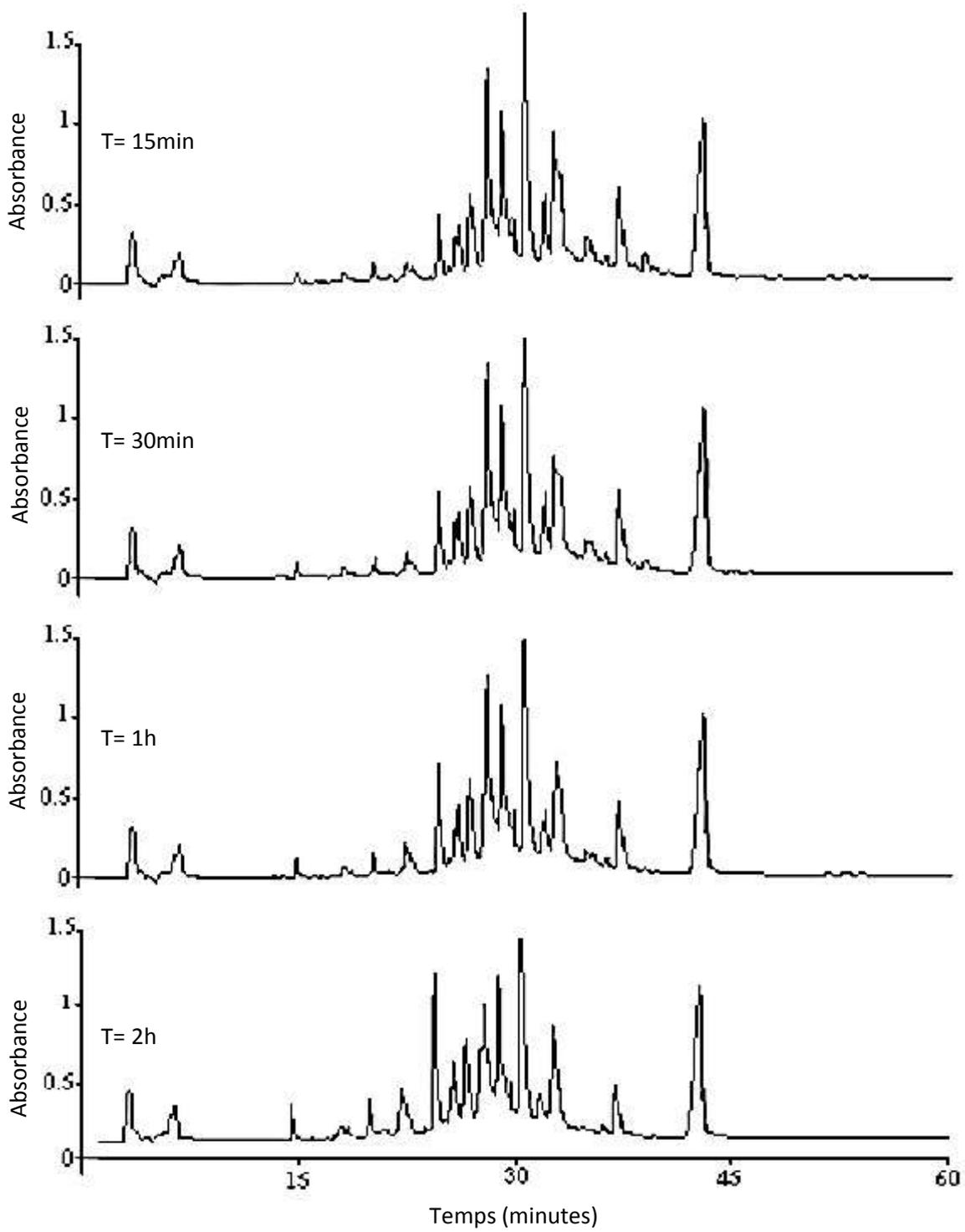
Dans le précédent chapitre, un premier modèle simple avec comme substrat le peptide synthétisé α 1-32 a été déterminé en tenant compte de la variation de la température, du pH et du rapport E/S. L'objectif de ce chapitre est de généraliser ce modèle sur l'hydrolyse de l'hémoglobine et du cruor bovins en l'appliquant à deux familles de peptides antibactériens α 1-32 et α 107-141.

I- Hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine purifiée ou à partir du cruor

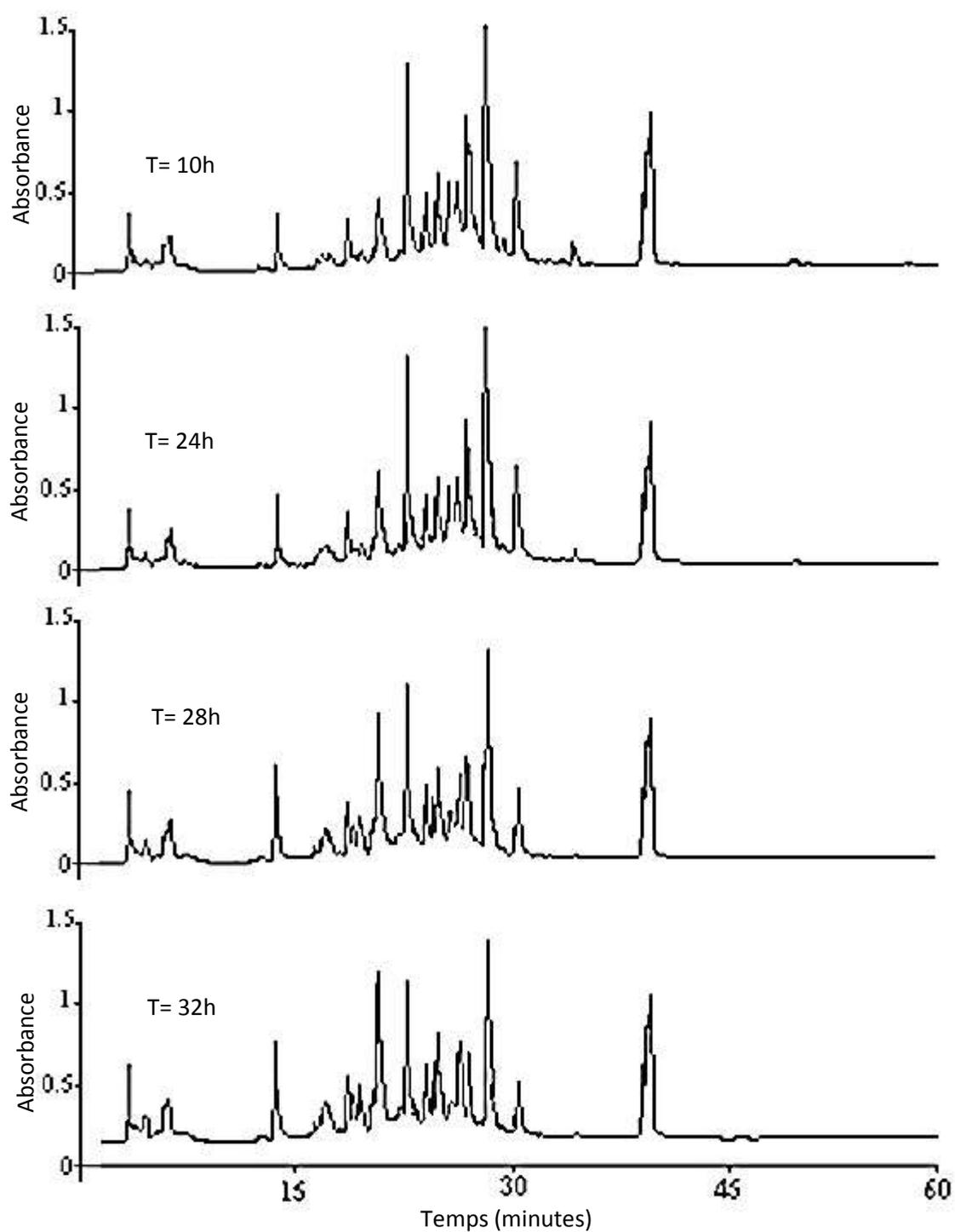
L'hydrolyse de l'hémoglobine ou du cruor bovins (1%) par la pepsine a été réalisée en conditions dénaturantes (en présence d'urée 6 M), en milieu tampon acide acétique /acétate de sodium 0,1 M, à pH 4,5 et à 23°C. La réaction d'hydrolyse est arrêtée à différents temps d'hydrolyse par ajout de tampon borax 0,32 M, pH 12,5. Les hydrolysats sont ensuite analysés par CLHP après différents temps d'hydrolyse. Les profils chromatographiques des différents temps d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine dans ces conditions (figure 32), montrent qu'au cours de l'hydrolyse en conditions dénaturantes, les molécules d'hémoglobine dénaturée ont été rapidement converties en peptides intermédiaires de grande taille qui sont ensuite dégradés plus lentement en peptides finaux. Ce type de cinétique a été déjà observé au cours de l'hydrolyse de protéine dénaturée correspond à un mécanisme " zipper " (Lindertromlang, 1952). On a également observé le même mécanisme au cours de l'hydrolyse du cruor bovin dénaturé et les chromatogrammes obtenus étaient similaires à ceux de l'hydrolysats pepsique de l'hémoglobine.



(a)



(b)



(c)

Figure 32: Profil CLHP (a, b et c) de la cinétique d'hydrolyse de l'hémoglobine purifiée ou du cruor bovins 1% (p/v) par la pepsine à pH 4,5 et à 23°C en conditions dénaturantes (A=215nm)

La figure 32 montre que les chaînes α et β des tétramères sont tout de suite entièrement hydrolysées par la pepsine. Les mêmes résultats ont précédemment été obtenus par plusieurs auteurs permettant ainsi l'obtention de peptides actifs (Nedjar-Arroume et *al.*, 2008, Dubois et *al.*, 2005; Choisnard et *al.*, 2002; Froidevaux et *al.*, 2001). En effet, en présence d'urée, la dissociation de la protéine en deux hétérodimères, favorise l'accessibilité de l'enzyme pour son substrat (hémoglobine ou cruor bovins). Il s'en suit donc une libération de peptides intermédiaires de grande taille dès le début de l'hydrolyse comme décrit par Linderstrom-Lang en 1952.

II- Identification et caractérisation des peptides antibactériens des familles de α 1-32 et α 107-141 issus de l'hémoglobine et du cruor bovins

Il a été démontré que l'hydrolyse de la chaîne α de l'hémoglobine bovine par la pepsine engendre trois familles de peptides actifs (Lignot, 1998). Deux familles présentant une activité antibactérienne prononcée: la famille α 1-32 et la famille α 107-141 vont faire l'objet de cette étude.

La première famille est localisée du côté N_{terminal} de la chaîne α de l'hémoglobine bovine et constituée des peptides α 1-32, α 1-29, α 1-28, α 1-27 et α 1-23. La deuxième famille située du côté C_{terminal} de la chaîne α de l'hémoglobine bovine et constituée des peptides se formant à partir du peptide α 107-141.

Les hydrolystats à différents temps d'hydrolyse de l'hémoglobine et du cruor bovins en milieu dénaturant ont été analysés par CLHP comme décrit précédemment et les différents pics ont été recoltés et leur contenu a été analysé dans un premier temps par spectrométrie de masse, puis les pics qui n'étaient pas purs ont subi une deuxième purification par chromatographie liquide haute performance en phase inverse sur colonne C4. La composition en acides aminés des peptides purifiés a été ainsi déterminée et les pics correspondants à la famille α 1-32 et α 107-141 ont été identifiés comme indiqué dans la figure 33.

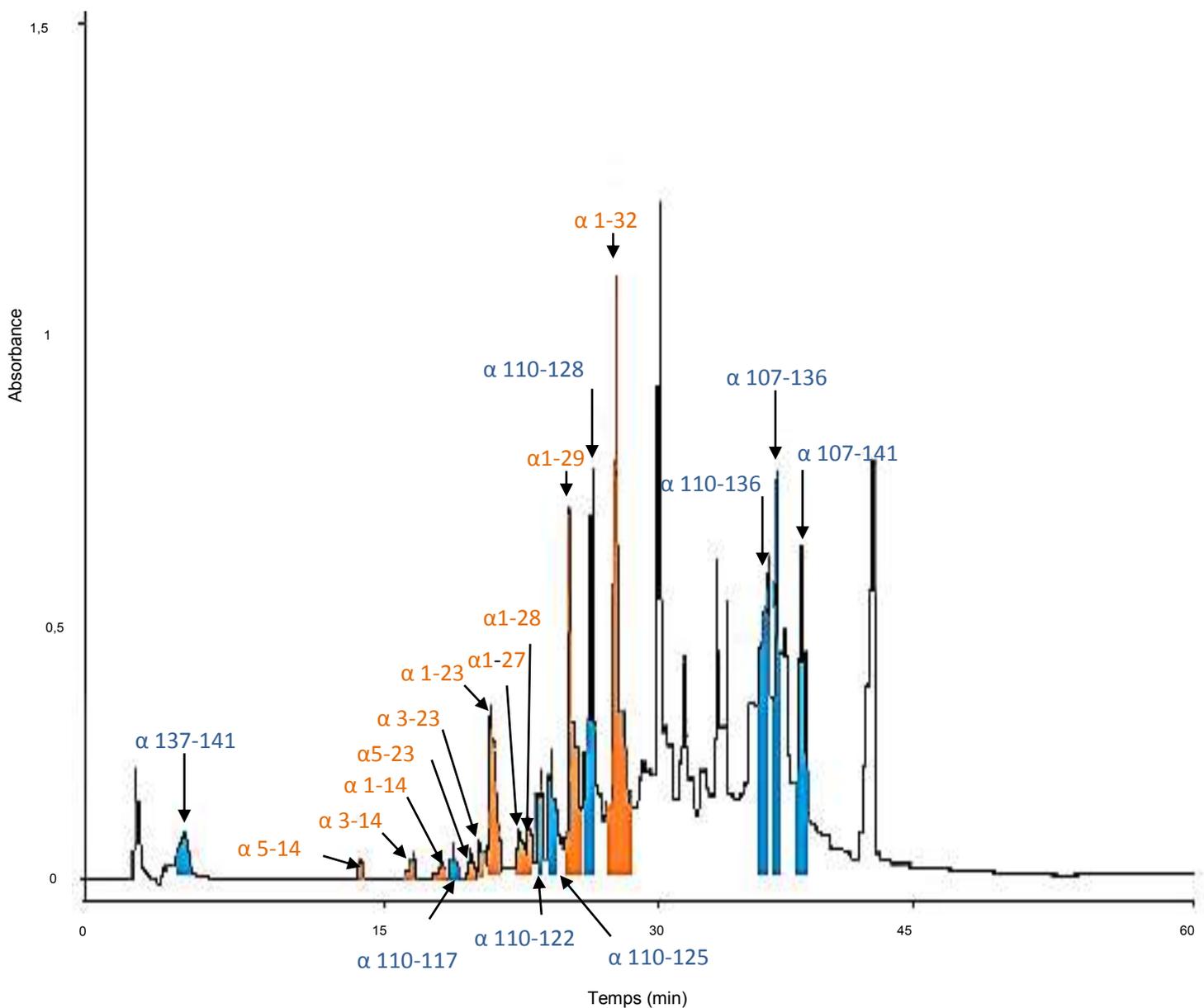


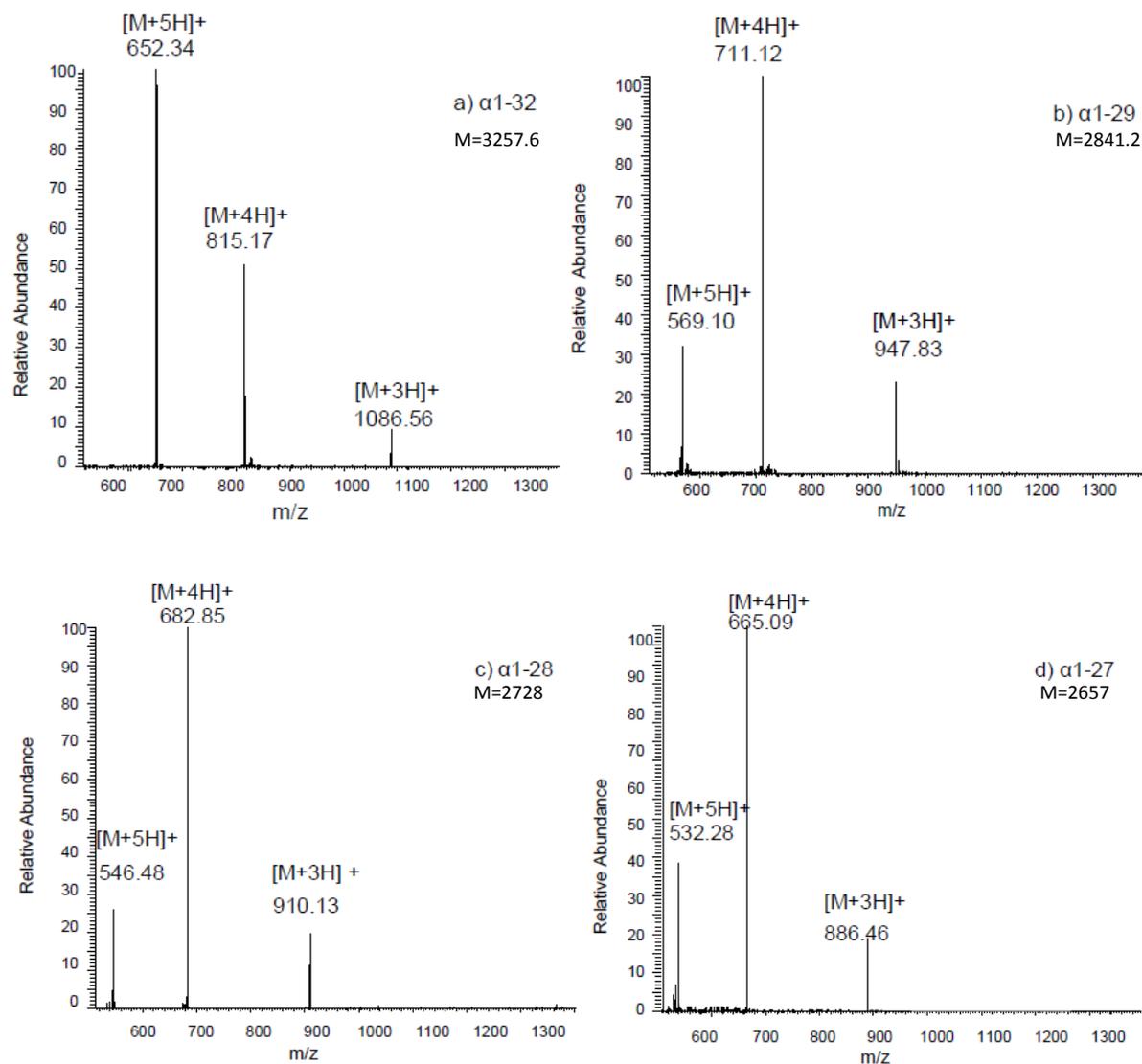
Figure 33: Profil CLHP de l'hydrolysate pepsique d'hémoglobine bovine 1% en conditions dénaturantes à 23°C dans le tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5

(10min d'hydrolyse ; les peptides de la famille α 1-32 en orange et les peptides de la famille α 107-141 en bleu)

II-1- Identification et caractérisation des peptides de la famille α 1-32 issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine

Les peptides de la famille α 1-32 sont identifiés et repérés sur chromatogramme grâce aux résultats obtenus par analyse CLHP et SM de l'hydrolysate de l'hémoglobine bovine.

Le profil chromatographique de l'hydrolysate de l'hémoglobine bovine à 10 minutes (temps d'hydrolyse où on peut observer la totalité des peptides de la famille α 1-32) est présenté par la figure 33 indiquant les fractions correspondant à la famille α 1-32 en orange, les SM des peptides de cette famille sont présentés par la figure 34.



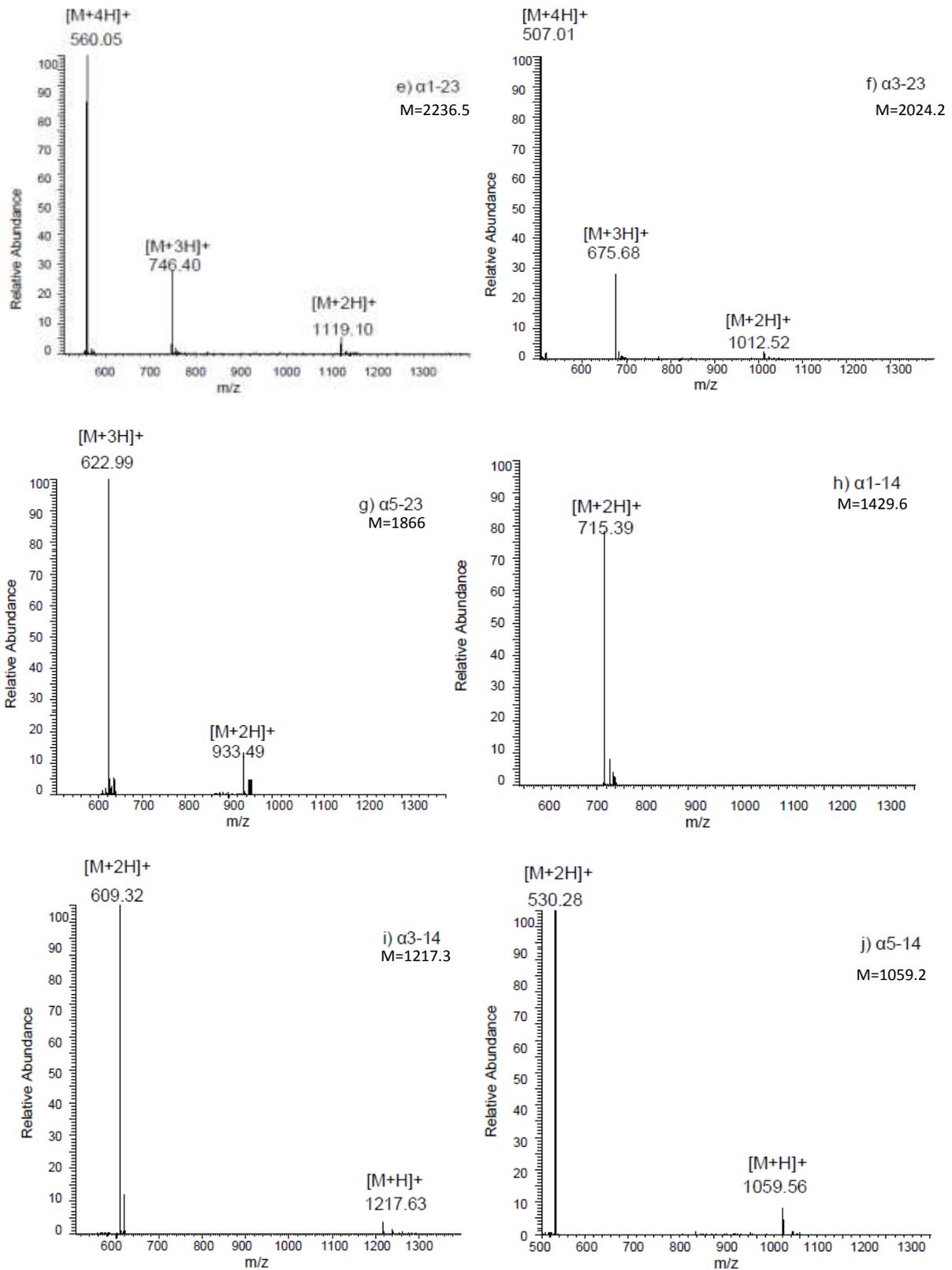


Figure 34: Identification des peptides de la famille α 1-32 par spectrométrie de masse (LC-ESI-MS). : α 1-32 (a), α 1-29 (b), α 1-28 (c), α 1-27 (d), α 1-23 (e), α 3-23(f), α 5-23(g), α 1-14(h), α 3-14(i) et α 5-14(j)

Les figures 33 et 34 montrent que pour la famille du peptide α 1-32 est composée de trois fractions pures et représentent respectivement les peptides α 1-32 (figure 34a), α 1-29 (figure 34b) et α 1-23 (figure 34e), d'une fraction contenant deux peptides de poids moléculaires très proches et correspondant aux fragments α 1-27 (figure 34d) et α 1-28 (figure 34c) et de cinq fractions contenant des peptides allant de 10 à 21 acides aminés, ce sont les peptides finaux formés à partir du peptide α 1-23 : α 3-23(figure 34f), α 5-23(figure 34g), α 1-14(figure 34h), α 3-14(figure 34i) et α 5-14(figure 34j). La masse moléculaire et la séquence d'acides aminés de chacun de ces peptides sont déjà données par le tableau 5 du Chapitre 1.

II-2- Identification et caractérisation des peptides de la famille α 107-141 issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine

Le profil chromatographique de l'hydrolysate de l'hémoglobine bovine est présenté par la figure 33 indiquant en **bleu** les fractions correspondant à la famille α 107-141, ces fractions ont été identifiées et caractérisées grâce à un couplage LC-ESI-MS et les résultats sont présentés dans le tableau 12 .

Tableau 12: Masses molaires, temps de retentions et séquences en acide aminé des peptides de la famille α 107-141

Peptide	Masse (Da)	Nombre d'acides aminés	Temps de rétention (min)	Séquence en acides aminés
α 107-141	3787,3	35	40,80	VTLA ¹¹⁰ SHLPSDFTPA ¹²⁰ VHAS LDKFLA ¹³⁰ NVSTVLTSKY ¹⁴⁰ R
α 107-136	3151,6	30	39,55	VTLA ¹¹⁰ SHLPSDFTPA ¹²⁰ VHAS LDKFLA ¹³⁰ NVSTVL
α 110-136	2838,2	27	38,49	A ¹¹⁰ SHLPSDFTPA ¹²⁰ VHASLD KFLA ¹³⁰ NVSTVL
α 110-128	2040,2	19	25,75	A ¹¹⁰ SHLPSDFTPA ¹²⁰ VHASLD KF
α 110-125	1649,8	16	24,53	A ¹¹⁰ SHLPSDFTPA ¹²⁰ VHASL
α 110-122	1778,5	13	22,89	A ¹¹⁰ SHLPSDFTPA ¹²⁰ VH
α 110-117	872,9	8	15,96	A ¹¹⁰ SHLPSDF
α 137-141	653,7	5	11,89	TSKY ¹⁴⁰ R

Le peptide correspondant au peptide α 107-141 (3787,3 Da) sur la figure 33 est observé à court temps d'hydrolyse (5 min) et a disparu rapidement, son temps de rétention est de 40,8 min. Cette fraction est vite hydrolysée en deux peptides finaux : le peptide α 110-117 de masse molaire 872,9 Da et le peptide α 137-141 de 653,7 Da correspondant à la néokyotorphine, un peptide connu pour ses propriétés analgésiques isolé par Zhao et *al.*, (1997), (Takagi et *al.*, 1982), et comme facteur stimulant la croissance de cellules tumorales (Blishchenko et *al.*, 2001). Et en cinq peptides intermédiaires : le peptide de 3151,6 Da correspond au fragment α 107-136 défini comme antibactérien par Daoud et *al.*, 2005, Nedjar-Arroume et *al.*, 2006, le peptide α 110-136 (2838,2 Da), le peptide α 110-128 (2040,2 Da), le peptide α 110-125 (1649,8 Da) potentialisant la bradykinine (Dubois et *al.*, 2005) et le peptide 1778,5 Da correspondant au fragment α 110-122. Ces peptides ont été identifiés par spectrométrie de masse, leurs temps de rétention, leurs séquences en acides aminés ainsi que leurs masses molaires sont présentés dans le tableau 12.

Les caractéristiques structurales de ces peptides ont été étudiées à l'aide du logiciel d'analyse de séquence protéique de réseau (<http://pbil.ibcp.fr>) et sont données dans le tableau 13.

Tableau 13: Caractéristiques structurales des peptides de la famille α 107-141

Peptide	Pourcentage en résidus hydrophobes (%)	Nombre de charges nettes positives à pH 7	Prédiction de structure secondaire
α107-141	42	3	47% helix α
α107-136	50	1	54% helix α
α110-136	46	1	40% helix α
α110-128	38	1	46% helix α
α110-125	40	1	42% helix α
α110-122	33	1	66% random coil
α110-117	28	1	71% random coil
α137-141	0	2	93% random coil

Le tableau 13 montre que tous les peptides de la famille α 107-141 sont chargés positivement à pH 7,0. Généralement, les peptides antimicrobiens avec une structure en « Random coil » et chargés positivement, peuvent en solution aqueuse se structurer au contact de la membrane biologique (Powers et Hancock, 2003, Corbier et *al.*, 2001).

III- Détermination de l'activité antibactérienne des familles des peptides antibactériens α 1-32 et α 107-141 issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine ou du cruor bovins

L'activité antibactérienne et la concentration minimale inhibitrice de la famille de peptides α 1-32 ont été testées contre quatre espèces de bactéries : *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* et *Micrococcus luteus*. Le tableau 14 montre la concentration minimale inhibitrice des peptides α 1-32, α 1-29, α 1-28, α 1-27 et α 1-23 et les résultats sont identiques à ceux trouvés pour le peptide α 1-32 synthétisé dans le premier chapitre (Hedhili et al., 2013). Ces cinq peptides ont montré une activité antibactérienne contre les espèces bactériennes testées (tableau 14).

Tableau 14 : CMI (μ M) de peptides antibactériens de la famille α 1-32 issus de l'hémoglobine ou du cruor bovins

Peptides CMI (μ M)	Bactérie Gram (-)		Bactérie Gram (+)	
	<i>S.enteritidis</i>	<i>E.coli</i>	<i>L.innocua</i>	<i>M.luteus</i>
α 1-32	38	154	38	90
α 1-29	27	54	27	54
α 1-28	27	54	27	54
α 1-27	38	54	27	38
α 1-23	27	54	54	100

Le tableau 14 confirme les résultats trouvés pour la famille de peptides antibactériens issus de l'hydrolyse du peptide α 1-32 synthétisé. Ces peptides gardent alors leur pouvoir antibactérien lors de l'hydrolyse pepsique du fragment α 1-32 issu de l'hémoglobine ou du cruor bovins.

La CMI des peptides de la famille α 107-141 produits à partir de la hydrolyse de la chaîne α de l'hémoglobine ou du cruor avec des quantités relativement importantes α 107-141, α 107-136 et α 137-14, a été déterminée contre les mêmes espèces de bactéries: *M. luteus* , *L. innocua* , *E. coli* et *S. enteritidis* et les résultats sont présentés dans le tableau 15.

Tableau 15: CMI (μM) de peptides antibactériens de la famille α 107-141 issus de l'hémoglobine ou du cruor bovins

Peptides CMI (μM)	Bactérie Gram (-)		Bactérie Gram (+)	
	<i>S.enteritidis</i>	<i>E.coli</i>	<i>L.innocua</i>	<i>M.luteus</i>
α 107-141	87	87	43	87
α 107-136	76	76	38	76
α 137-141	5	9	9	2

Le tableau 15 montre que le peptide le plus actif, de la famille α 107-141, est celui le plus court : α 137-141, avec une CMI 4,5 fois inférieure à celui du peptide α 107-141 contre *L. innocua*, 9,7 fois moins que celui du peptide α 107-141 contre *E. coli*, avec un CMI de 9 μM contre les deux souches, 43,5 fois moins que α 107-141 contre *M. luteus* (CMI de 2 μM), et 17,4 fois moins que α 107-141 contre *S. enteritidis* (CMI de 5 μM).

Quelle que soit la souche bactérienne testée une diminution de la viabilité cellulaire d'au moins 97 % a été mesurée, après 24 h d'incubation, à la concentration correspondant à la CMI de l'ensemble des peptides étudiés.

Ainsi, selon les espèces bactériennes cibles, il serait intéressant d'arrêter l'hydrolyse du peptide α 107-141 à la concentration la plus élevée du peptide présentant la meilleure activité contre cette espèce bactérienne. D'où l'intérêt de la modélisation cinétique de l'hydrolyse afin de prédire le moment où l'hydrolyse doit être arrêtée.

IV- Modélisation de la cinétique enzymatique du peptide α 1-32 issu de l'hydrolyse de l'hémoglobine ou du cruor bovins

IV-1- Détermination du schéma réactionnel de l'hydrolyse du peptide α 1-32 à partir de l'hémoglobine et du cruor bovines

Les résultats des analyses en RP-CLHP et LC-ESI-MS nous ont permis d'identifier et de quantifier les peptides de la famille α 1-32 générés lors de l'hydrolyse de l'hémoglobine ou du cruor bovins par la pepsine. Ces analyses à différents temps d'hydrolyse ont permis de suivre la disparition et l'apparition des peptides de la famille α 1-32 lors de l'hydrolyse de l'hémoglobine ou du cruor bovins, ce qui a permis de déterminer le schéma réactionnel des peptides de la famille α 1-32 à partir de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine dans les

conditions opératoires étudiées (pepsine comme enzyme, un rapport enzyme/substrat de 1/11, pH 4,5, 15° C).

Le schéma réactionnel établi est décrit dans la figure 35. Dans un premier temps, la chaîne α de l'hémoglobine ou du cruor bovins génère trois fragments : α 1-32, α 33-98 et α 107-141, puis le peptide α 1-32 s'hydrolyse en quatre peptides, à savoir α 1-29, α 1-28, α 1-27 et α 1-23. Ensuite, les peptides α 1-29, α 1-28 et α 1-27 génèrent le peptide α 1-23, qui se clive en cinq peptides finaux : α 3-23, α 5-23, α 1-14, α 3-14 et α 5-14. Le même schéma réactionnel a été confirmé pour l'hydrolyse réalisée à 23 et 37° C et à un pH de 3,5 et 5,5 (toutes les autres conditions étant les mêmes). Par conséquent, la température et le pH n'ont eu aucune influence sur le schéma réactionnel dans la gamme de 15 à 37° C et pH 3,5 à 5,5.

Le schéma réactionnel du peptide α 1-32 synthétisé a été déjà mis en place dans le précédent chapitre (Hedhili et *al.*, 2013), notre objectif actuel est de compléter ce dispositif en tenant compte de l'hydrolyse de tous les fragments de la chaîne α de l'hémoglobine bovine . Pour cela, nous avons considéré le schéma réactionnel du peptide synthétisé en mettant l'accent sur les peptides d'intérêt α 1-32, α 1-29, α 1-28, 1-27 et α 1-23. Pour simplifier le schéma de réaction et la modélisation, la constante k_{14} a été utilisé pour recueillir les fragments de la chaîne α autres que le peptide α 1-32 et la constante k_8 comprenant les peptides finaux du peptide α 1-23.

Ainsi, un schéma réactionnel de l'évolution des peptides de la famille α 1-32 au cours d'hydrolyse pepsique de la chaîne α de l'hémoglobine bovine a été proposé et est présenté par la figure 35, en tenant compte de toutes les combinaisons possibles d'apparition et de disparition des peptides de la famille α 1-32.

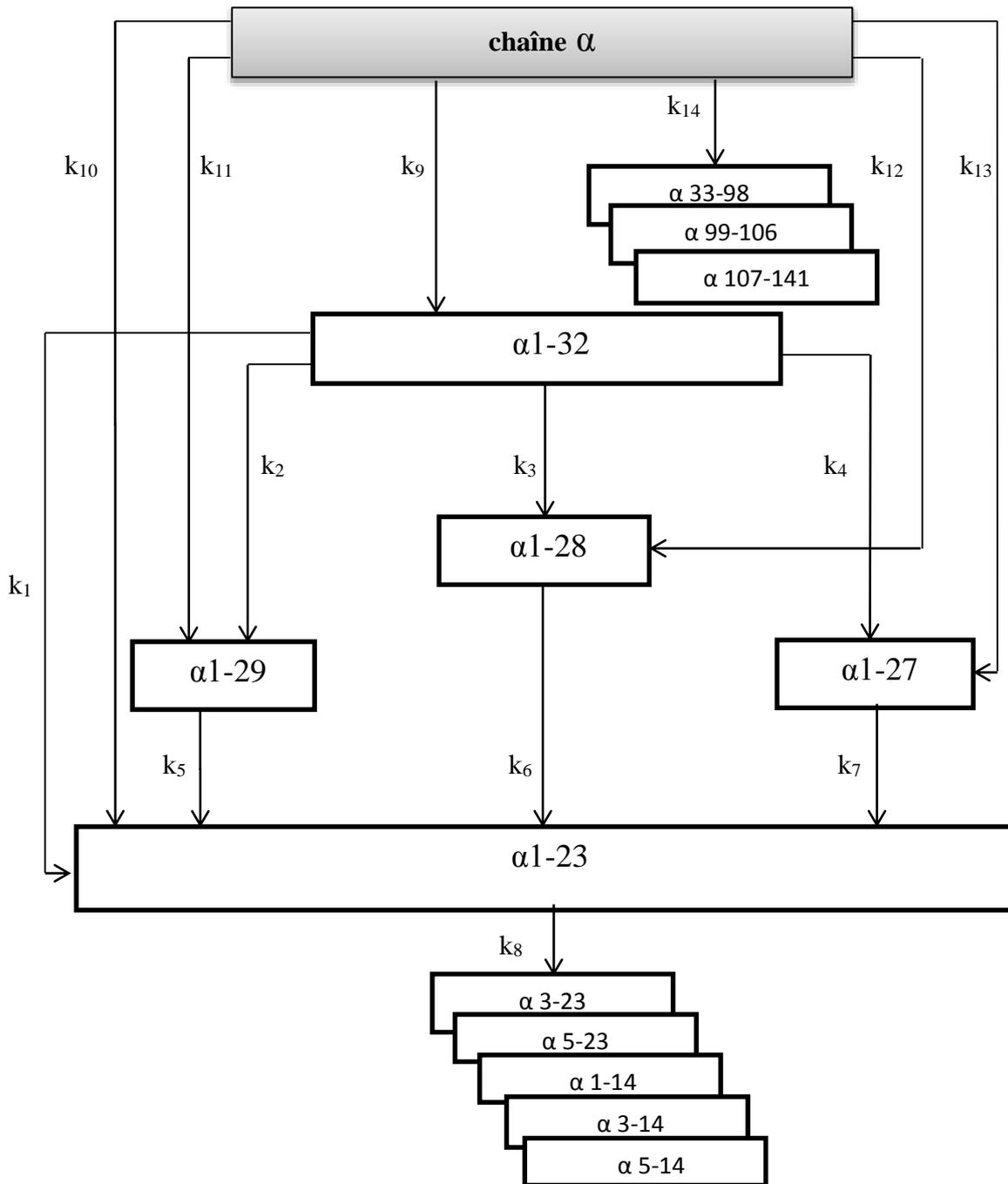


Figure 35: Schéma réactionnel de l'évolution des peptides au cours d'hydrolyse pepsique de la chaîne α de l'hémoglobine ou du cruor bovins

IV-2-Modélisation de la cinétique enzymatique d'hydrolyse du peptide α 1-32 issu de l'hémoglobine bovine

Un modèle mathématique décrivant la cinétique de l'hydrolyse du peptide synthétisé α 1-32 était déjà établi dans le premier chapitre (Hedhili et *al.*, 2013). Le but de ce chapitre est de proposer un modèle qui pourrait décrire avec précision la cinétique d'hydrolyse du peptide α 1-32 issu de l'hémoglobine bovine, et qui ne serait pas trop complexe, pour faciliter d'avantage son utilisation. Par conséquent, certaines hypothèses ont été formulées. Il a été supposé que les réactions enzymatiques sont irréversibles, l'effet de la concentration de l'enzyme a été négligé, en supposant qu'il y avait toujours une enzyme pour la réalisation de l'hydrolyse du substrat. Enfin, les réactions sont considérées de premier ordre. L'agitation a été considérée comme parfaite, le taux global d'apparition de peptide (disparition) a été considéré comme dépendant uniquement des réactions enzymatiques. Comme il s'agissait d'hypothèses, les constantes de vitesse ont été considérées comme des constantes apparentes.

Sur la base de ces hypothèses et sur le schéma réactionnel établi ci-dessous (figure 35), l'évolution de concentrations de peptides dans le temps a été décrite selon le système d'équations différentielles suivant :

$$\frac{d(\alpha_{1-32})}{dt} = -(k_9 + k_{10} + k_{11} + k_{12} + k_{13} + k_{14}) * \alpha$$

$$\frac{d\alpha_{1-32}}{dt} = k_9 * \alpha - (k_1 + k_2 + k_3 + k_4)\alpha_{1-32}$$

$$\frac{d\alpha_{1-29}}{dt} = k_{11} * \alpha + k_2\alpha_{1-32} - k_5\alpha_{1-29}$$

$$\frac{d\alpha_{1-28}}{dt} = k_{12} * \alpha + k_3\alpha_{1-32} - k_6\alpha_{1-28}$$

$$\frac{d\alpha_{1-27}}{dt} = k_{13} * \alpha + k_4\alpha_{1-32} - k_7\alpha_{1-27}$$

$$\frac{d\alpha_{1-23}}{dt} = k_{10} * \alpha + k_1\alpha_{1-32} + k_5\alpha_{1-29} + k_6\alpha_{1-28} + k_7\alpha_{1-27} - k_8\alpha_{1-23}$$

α : la concentration de la chaîne α de l'hémoglobine ou du cruor bovins

α_{1-32} : la concentration du peptide α_{1-32}

α_{1-29} : la concentration du peptide α_{1-29}

α_{1-28} : la concentration du peptide α_{1-28}

α_{1-27} : la concentration du peptide α_{1-27}

α_{1-23} : la concentration du peptide α_{1-23}

Ce système d'équations différentielles a été résolu et les équations de la concentration au cours du temps des peptides de la famille du peptide α 1-32 obtenus par l'hydrolyse pepsique l'hémoglobine bovine sont présentées dans le tableau 16.

Tableau 16: Équations de la concentration au cours du temps des peptides antibactériens de la famille du peptide α 1-32 issu de l'hémoglobine bovine

Peptides	Équations différentielles	Équations de la concentration au cours du temps d'hydrolyse
Chaîne α	$\frac{d\alpha}{dt} = -(k_9 + k_{11} + k_{12} + k_{13} + k_{10} + k_{14})\alpha$	$I_\alpha(t) = \alpha_0 e^{-a t}$ $\alpha_0 = 100\%$ (pourcentage de la chaîne à $t=0$) $a = k_9 + k_{10} + k_{11} + k_{12} + k_{13} + k_{14}$
α 1-32	$\frac{d\alpha_{1-32}}{dt} = k_9\alpha - (k_1 + k_2 + k_3 + k_4)\alpha_{1-32}$	$I_{1-32}(t) = \frac{C}{B - a} [(e^{-at} - e^{-Bt})]$ $B = k_1 + k_2 + k_3 + k_4$; $C = k_9\alpha_0$
α 1-29	$\frac{d\alpha_{1-29}}{dt} = k_{11}\alpha + k_2\alpha_{1-32} - k_5I\alpha_{1-29}$	$I_{1-29}(t) = \frac{-S}{m - B} [(e^{-Bt} - e^{-mt})]$ $+ \frac{L + S}{m - a} [(e^{-at} - e^{-mt})]$ $m = k_5$; $S = \frac{k_2 C}{B - a}$; $L = k_{11}\alpha_0$
α 1-28	$\frac{d\alpha_{1-28}}{dt} = k_{12}\alpha + k_3\alpha_{1-32} - k_6I\alpha_{1-29}$	$I_{1-28}(t) = \frac{-P}{n - B} [(e^{-Bt} - e^{-nt})]$ $+ \frac{D + P}{n - a} [(e^{-at} - e^{-nt})]$ $n = k_6$; $P = \frac{k_3 C}{B - a}$; $D = k_{12}\alpha_0$
α 1-27	$\frac{d\alpha_{1-27}}{dt} = k_{13}\alpha + k_4\alpha_{1-32} - k_7I\alpha_{1-29}$	$I_{1-27}(t) = \frac{-R}{H - B} [(e^{-Bt} - e^{-Ht})]$ $+ \frac{F + R}{H - a} [(e^{-at} - e^{-Ht})]$ $H = k_7$; $R = \frac{k_4 C}{B - a}$; $F = k_{13}\alpha_0$

<p>α 1-23</p>	$\frac{d\alpha_{1-23}}{dt} = k_{10}\alpha + k_1\alpha_{1-32} + k_5\alpha_{1-29} + k_6\alpha_{1-28} + k_7\alpha_{1-27} - k_8\alpha_{1-23}$	$I_{1-23}(t) = \frac{J + U + G + W + X}{K - a} [(e^{-at} - e^{-Kt})] - \frac{U + Q + V + Z}{K - B} [(e^{-Bt} - e^{-Kt})] - \frac{K - B}{G - Q} [(e^{-mt} - e^{-Kt})] - \frac{K - m}{W - V} [(e^{-nt} - e^{-Kt})] - \frac{K - n}{X - Z} [(e^{-Ht} - e^{-Kt})]$ <p> $K = k_8; U = \frac{k_1 C}{B - a}; F = k_{10} \alpha_0; G = \frac{m(L + S)}{m - a}; w = \frac{n(D + P)}{n - a}; X = \frac{H(F + R)}{H - a}; V = \frac{nk_{12}\alpha_0}{n - B}; Q = \frac{Sm}{m - B}; Z = \frac{HF}{H - B}$ </p>
--	---	--

Les équations de la concentration au cours du temps des peptides antibactériens de la famille du peptide α 1-32 issus de l'hémoglobine bovine présentées par le tableau 16 ont permis de prédire la concentration de chaque peptide et à chaque instant de l'hydrolyse.

Pour les données expérimentales, le pourcentage des peptides est calculé en se basant sur l'hypothèse que la somme de la surface de tous les peptides issus d'hydrolyse de la chaîne α est constante durant la cinétique de chaque hydrolyse. Cette approche permettrait de représenter l'évolution de chaque peptide dans l'hydrolysate en fonction du temps.

$$\% (\text{peptide cible}) = \frac{\text{Surface de pic}_{\text{peptide cible}}}{\text{la somme de surface de tous les peptides issus de la chaîne alpha}}$$

La cinétique de libération du peptide α 1-32 lors de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine et du cruor bovins a été étudiée à différentes températures et à différents pH. Les résultats expérimentaux ont été utilisés pour proposer un modèle mathématique décrivant la cinétique de la concentration des peptides générés. Les valeurs des constantes apparentes de vitesse (k_1 à k_{14}) ont été déterminées en minimisant l'écart quadratique moyen normalisé entre les données expérimentales et les prédictions du modèle.

Les rapports entre les constantes k_1, k_2, \dots, k_8 ont été précédemment établis en utilisant les résultats pour le peptide α 1-23 synthétisé (pour les mêmes conditions de pH et température). Le tableau 17 montre ces rapports pour différentes températures et le tableau 18 pour les différents pH. Il a été décidé de maintenir ces rapports constants dans le modèle cinétique de l'hydrolyse du peptide α 1-23 de la chaîne α (pour l'hémoglobine et le cruor bovins) pour diminuer le nombre de paramètres à estimer (en utilisant le modèle et les résultats expérimentaux). Ainsi, il reste à considérer l'un de ces huit constantes (k_1 , par exemple), en plus des constantes k_9 - k_{14} dans la procédure d'estimation paramétrique et à calculer les constantes k_2, k_3, \dots, k_8 en utilisant les rapports établis précédemment.

Tableau 17: Rapport entre la constante k_1 (constante de formation du peptide α 1-23 à partir du peptide α 1-32) et les autres constantes apparentes à différentes températures

T (K)	288	296	310
k_1/k_2	1,51	1,74	1,66
k_1/k_3	4,52	5,21	5,01
k_1/k_4	3,40	5,51	3,12
k_1/k_5	2,35	2,83	2,80
k_1/k_6	4,73	5,28	6,87
k_1/k_7	5,23	6,48	6,09
k_1/k_8	53,50	57,20	60,95

Tableau 18: Rapport entre la constante k_1 (constante de formation du peptide α 1-23 à partir du peptide α 1-32) et les autres constantes apparentes à différents pH

pH	3,5	4,5	5,5
k_1/k_2	1,77	1,74	1,72
k_1/k_3	5,30	5,21	5,12
k_1/k_4	5,28	5,51	5,35
k_1/k_5	2,86	2,83	2,82
k_1/k_6	5,38	5,28	5,29
k_1/k_7	5,83	6,48	6,68
k_1/k_8	55,43	57,20	57,25

Sur la base des données expérimentales et du schéma réactionnel établi, un modèle a été proposé pour décrire la cinétique de la concentration des peptides de la famille α 1-32 générés au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine et le cruor bovins.

IV-2-1- Effet de la température sur la cinétique de l'hydrolyse du peptide α 1-32 issu de l'hémoglobine et du cruor bovins

La cinétique enzymatique de la famille du peptide α 1-32 issu de l'hydrolyse de l'hémoglobine et du cruor bovins par la pepsine a été étudiée à différentes températures :

15°C, 23°C et 37° C (les autres conditions étant constantes : pH=4,5, E/S=1/11). Les valeurs des constantes apparentes de vitesse pour différentes températures pour la cinétique d'hydrolyse du peptide α 1-32 issu de l'hémoglobine et du cruor bovins sont présentées dans le tableau 19 et l'évolution de la concentration des peptides de la famille α 1-32 générés au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine est représentée par la figure 36 et celle du cruor est représentée par la figure 37 (modèle: lignes continues et expérimental: points).

L'équation de la dépendance des constantes apparentes de vitesse de la température a été établie au moyen de l'équation d'Arrhenius classique :

$$k = F \cdot e^{-E_a / R T}$$

où k est la constante de vitesse apparente (s^{-1} ou h^{-1}),

F est le facteur exponentiel (s^{-1} ou h^{-1}),

E_a est l'énergie d'activation ($J.mol^{-1}$),

R est la constante universelle des gaz parfaits ($J.mol^{-1}.K^{-1}$)

et T est la température (K).

La linéarisation de l'équation d'Arrhenius a été effectuée afin de déterminer la valeur de l'énergie d'activation. Le tableau 19 présente les valeurs obtenues pour des énergies d'activation et les coefficients de détermination (R^2).

Tableau 19: Valeurs des constantes apparentes de vitesse et paramètres de l'équation d'Arrhenius en fonction de la température du peptide α 1-32 issu de l'hémoglobine et du cruor bovins (pH 4,5 et E/S=1/11)

T (K)	288		296		310		Coefficient de détermination (R ²)		Énergie d'activation (J.mol ⁻¹)	
	Hémoglobine	cruor	Hémoglobine	cruor	Hémoglobine	cruor	Hémoglobine	cruor	Hémoglobine	cruor
k₁ (h⁻¹)	1,27	1,16	3,11	2,80	7,97	7,28	0,98	0,99	60 899,23	61 052,31
k₂ (h⁻¹)	0,84	0,77	1,79	1,61	4,79	4,38	0,96	0,99	58 136,88	58 289,96
k₃ (h⁻¹)	0,28	0,26	0,60	0,54	1,59	1,45	0,99	0,99	57 942,17	58 095,25
k₄ (h⁻¹)	0,37	0,34	0,56	0,51	2,56	2,33	0,98	0,96	66 517,10	66 670,18
k₅ (h⁻¹)	0,54	0,49	1,10	0,99	2,85	2,60	0,99	0,99	55 626,97	55 780,05
k₆ (h⁻¹)	0,27	0,24	0,59	0,53	1,16	1,06	0,98	0,97	48 152,95	48 306,03
k₇ (h⁻¹)	0,24	0,22	0,48	0,43	1,31	1,19	0,99	0,99	56 589,73	56 742,81
k₈ (h⁻¹)	0,02	0,02	0,05	0,05	0,13	0,12	0,98	0,99	56 589,23	56 742,31
k₉ (h⁻¹)	108,45	97,60	173,51	156,16	275,30	247,78	0,95	0,98	30 823,74	30 827,08
k₁₀ (h⁻¹)	17,65	15,82	24,60	22,14	55,23	49,61	0,99	0,99	39 023,87	39 084,32
k₁₁ (h⁻¹)	32,08	29,22	47,92	43,13	81,83	73,71	0,99	0,99	31 358,40	31 029,78
k₁₄ (h⁻¹)	66,23	59,53	71,83	64,65	77,14	69,50	0,98	0,97	5 025,44	5 104,70

Compte tenu des valeurs de R^2 présentées par le tableau 19, il est apparu que la variation des constantes de vitesse apparentes en fonction de la température est respectée par le modèle selon l'équation d'Arrhénius classique et cela pour l'hydrolyse de l'hémoglobine et du cruor bovins.

Comme prévu, il est apparu clairement que la cinétique a été accélérée, tout en augmentant la température. En effet, l'augmentation de la température engendre une augmentation des taux d'hydrolyse en même temps que la réaction, car une température plus élevée augmente la prise en charge du dépliement des protéines et augmente l'activité enzymatique en réduisant l'énergie d'activation pour la conversion du substrat en produit. Cependant, chaque protéase a une plage de température appropriée pour le maintien de l'activité enzymatique. La pepsine porcine libre a montré une grande stabilité à 40°C en utilisant une solution d'hémoglobine à 10 g.L⁻¹(Altun et Cetinus, 2007).

On peut également remarquer, d'après le tableau 19, que les constantes apparentes de vitesses de la cinétique de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine sont très proches de celles de la cinétique de l'hydrolyse du cruor bovin.

L'évolution de la concentration des peptides de la famille α 1-32 générés au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine et du cruor bovins à différentes températures est représentée dans les figures 36 et 37.

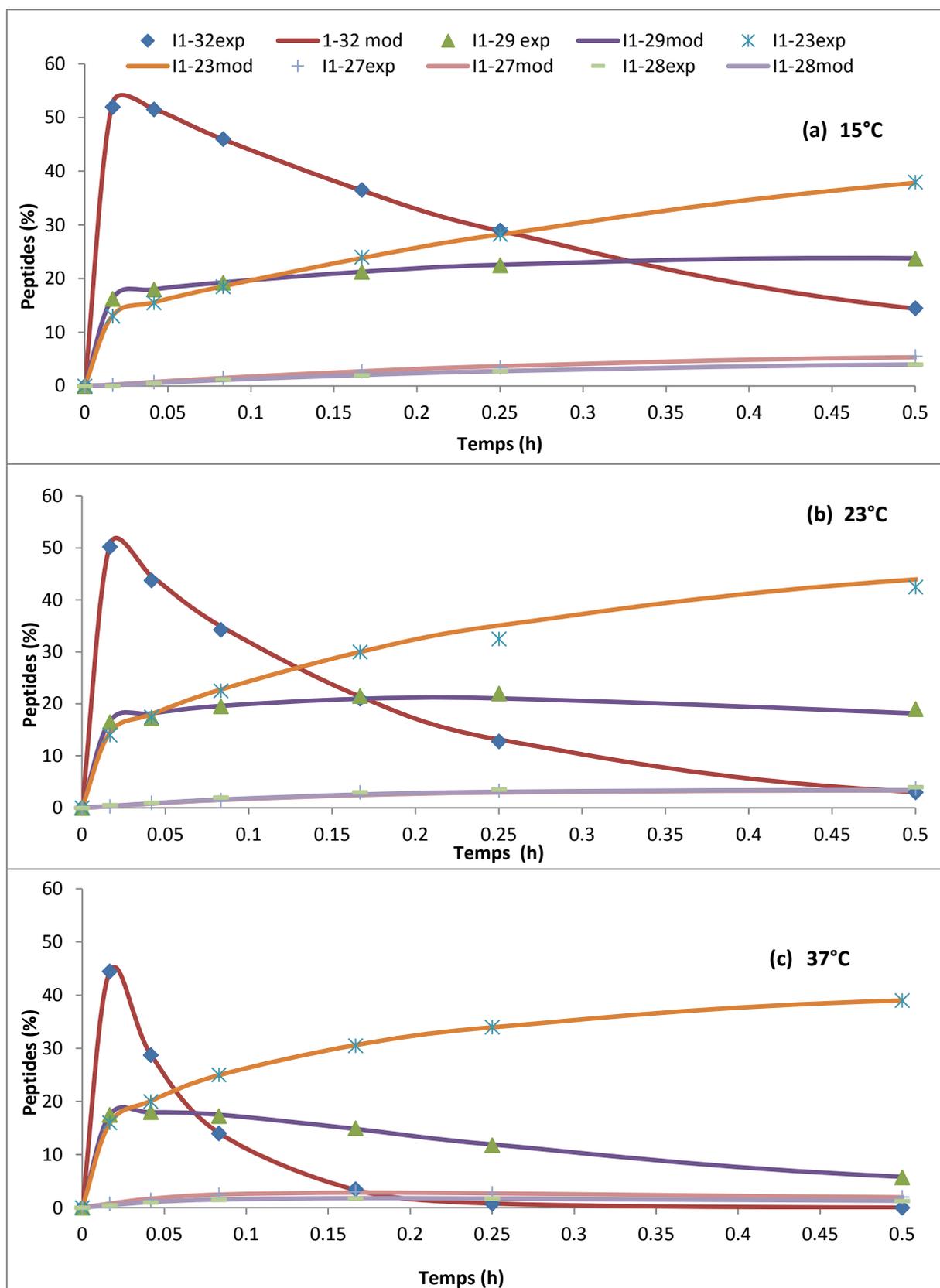


Figure 36: Évolution de la concentration des peptides de la famille α 1-32 générés au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine (modèle : lignes continues et expérimental : points) à différentes températures (a) à 15°C, (b) à 23°C et (c) à 37°C

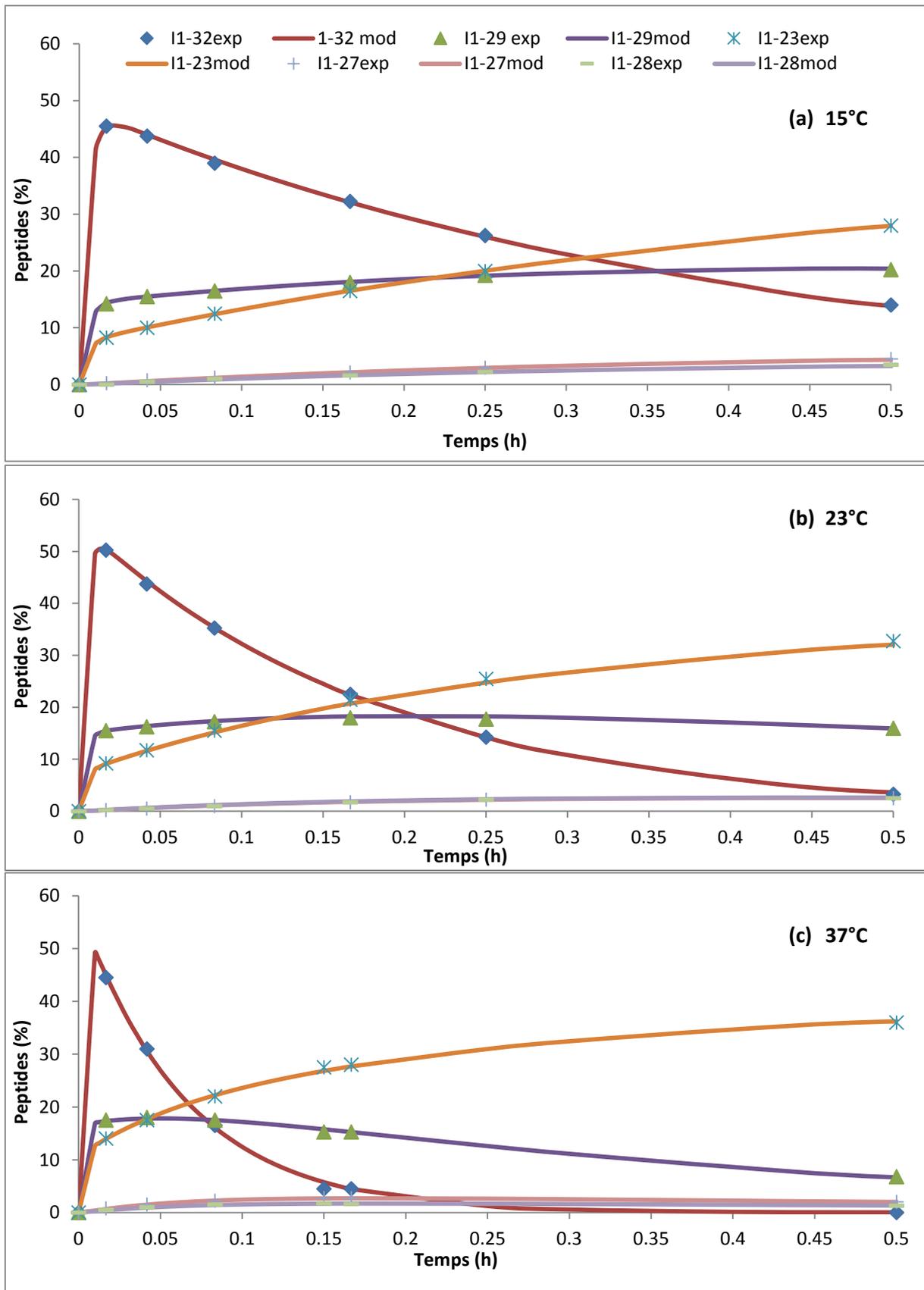


Figure 37 : Évolution de la concentration des peptides de la famille α 1-32 générés au cours de l'hydrolyse pepsique du cruor bovin (modèle : lignes continues et expérimental : points) à différentes températures (a) à 15°C, (b) à 23°C et (c) à 37°C

Les données expérimentales et celles du modèle pour la cinétique de concentration des peptides de la famille α 1-32 générés au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine et du cruor bovins présentées dans les figures 36 et 37 montrent que les résultats expérimentaux sont en bon accord avec et les prédictions du modèle et ce pour toutes les températures avec une moyenne de NRMSD de 1,79 %. Ainsi, le modèle proposé est apparu comme pertinent pour décrire la cinétique de l'évolution de concentrations des peptides de la famille α 1-32 issus de l'hémoglobine et du cruor bovins (pour les conditions d'exploitation étudiées).

IV-2-2- Effet du pH sur la cinétique de l'hydrolyse du peptide α 1-32 issu de l'hémoglobine et du cruor bovins

La cinétique enzymatique de la famille du peptide α 1-32 issu de l'hydrolyse de l'hémoglobine et du cruor bovins par la pepsine a été étudiée à différentes pH: 3,5; 4,5 et 5,5 (les autres conditions étant constantes: T=23°C, E/S=1/11).

L'évolution de la concentration des peptides de la famille α 1-32 issus de l'hydrolyse par la pepsine de l'hémoglobine et le cruor bovins sous différents pH: 3,5; 4,5 et 5,5 est représentée par la figure 38 et la figure 39.

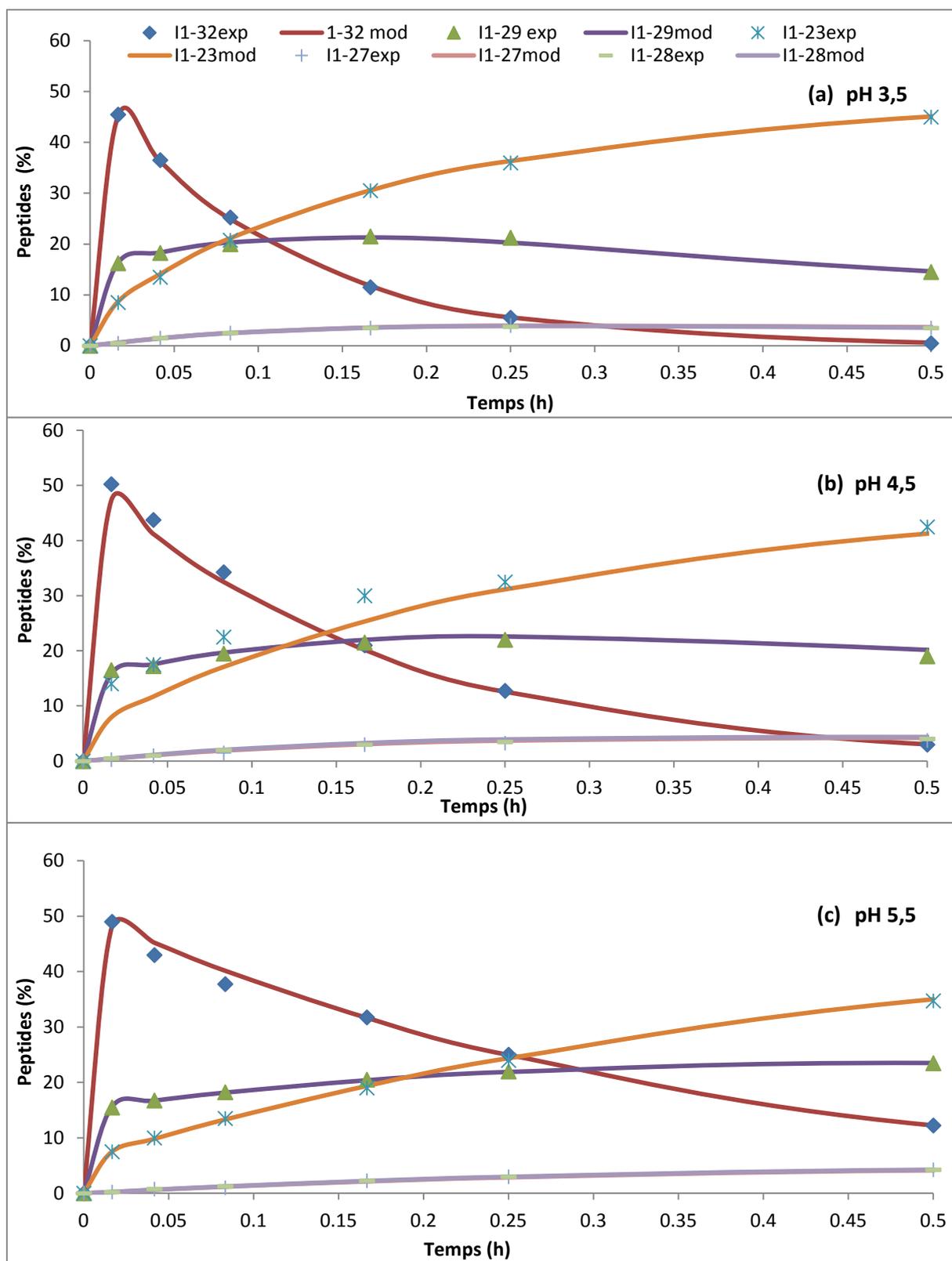


Figure 38: Évolution de la concentration des peptides de la famille α 1-32 générés au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine (modèle : lignes continues et expérimental : points) à différent pH (a) pH 3,5, (b) à pH 4,5 et (c) à pH 5,5

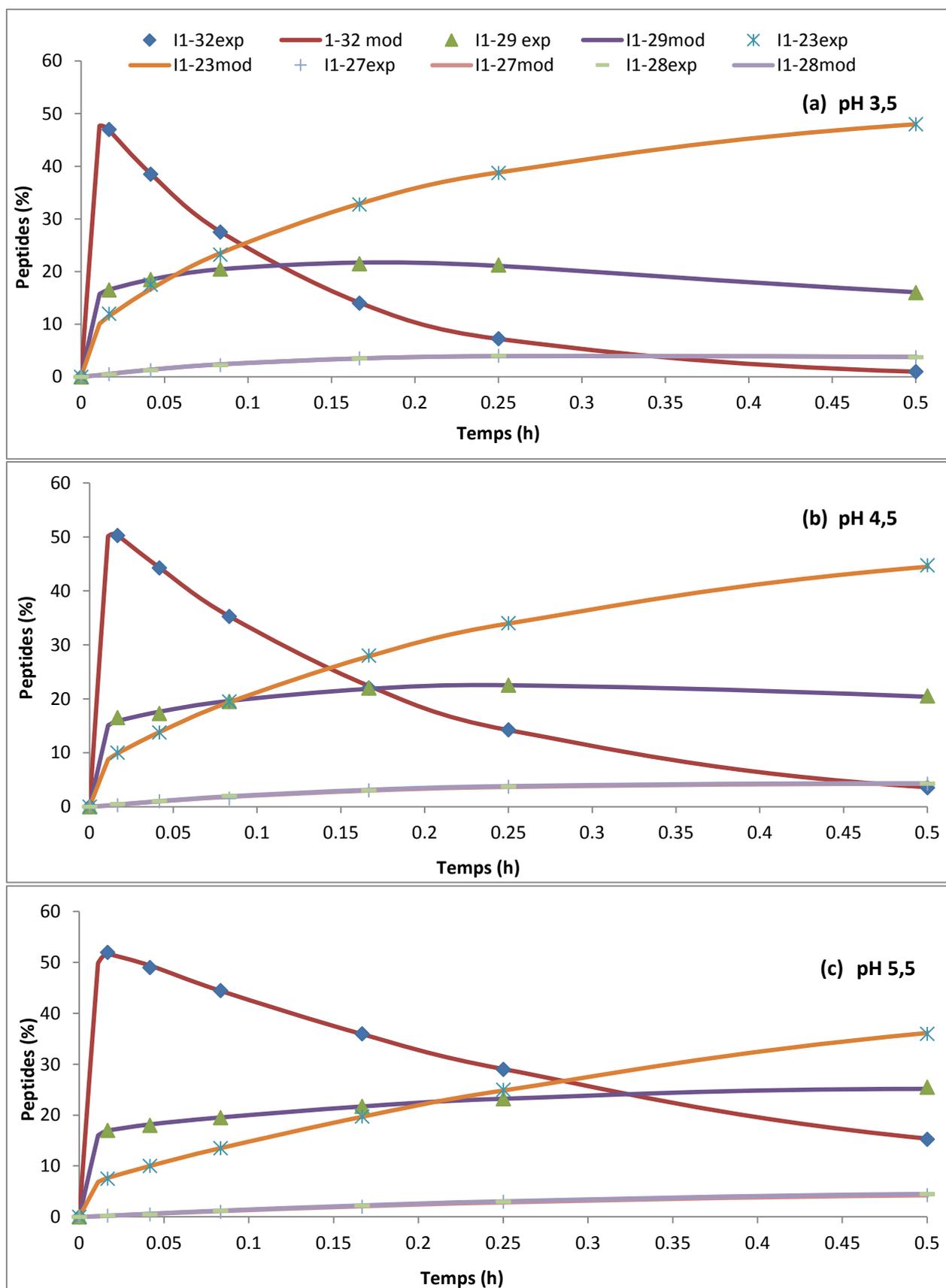


Figure 39 : Évolution de la concentration des peptides de la famille α 1-32 générés au cours de l'hydrolyse pepsique du cruor bovin (modèle : lignes continues et expérimental : points) à différent pH (a) pH 3,5, (b) à pH 4,5 et (c) à pH 5,5

La figure 38 et la figure 39 montrent que les données expérimentales de la cinétique l'hydrolyse de l'hémoglobine et le cruor bovins et les prédictions du modèle sont en bon accord pour les peptides de la famille α 1-32 générés lors de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine et le cruor bovins pour tous les pH avec une NRMSD moyenne de 2,05%. Les valeurs des constantes apparentes de vitesse à différents pH du peptide α 1-32 issu de l'hémoglobine sont données dans le tableau 20.

Tableau 20: Valeurs des constantes apparentes de la vitesse et paramètres de l'équation de la droite du pH en fonction des constantes du peptide α 1-32 issu de l'hémoglobine et du cruor bovins

pH	3,5		4,5		5,5		Coefficient de détermination (R^2)		Linéarisation			
	Hémoglobine	cruor	Hémoglobine	cruor	Hémoglobine	cruor	Hémoglobine	cruor	pente (a)		b	
k_1 (h^{-1})	4,63	4,19	3,11	2,80	1,45	1,32	0,99	0,99	-1,59	-1,43	10,22	9,23
k_2 (h^{-1})	2,62	2,30	1,79	1,61	0,84	0,72	0,98	0,99	-0,89	-0,79	5,74	5,09
k_3 (h^{-1})	0,87	0,79	0,60	0,54	0,28	0,26	0,99	0,96	-0,30	-0,26	1,91	1,71
k_4 (h^{-1})	0,88	0,78	0,56	0,51	0,27	0,24	0,99	0,99	-0,30	-0,27	1,93	1,74
k_5 (h^{-1})	1,62	1,45	1,10	0,99	0,51	0,46	0,99	0,99	-0,55	-0,50	3,57	3,20
k_6 (h^{-1})	0,86	0,79	0,59	0,53	0,27	0,26	0,99	0,99	-0,29	-0,27	1,89	1,72
k_7 (h^{-1})	0,79	0,75	0,48	0,43	0,22	0,19	0,99	0,99	-0,29	-0,28	1,80	1,73
k_8 (h^{-1})	0,08	0,08	0,05	0,05	0,03	0,02	0,99	0,99	-0,03	-0,03	0,19	0,17
k_9 (h^{-1})	181,95	162,39	173,51	156,16	149,65	132,98	0,93	0,99	-1,15	14,70	241,05	216,68
k_{10} (h^{-1})	29,00	26,10	24,60	22,14	18,64	16,07	0,99	0,94	-5,18	-5,02	47,39	44,01
k_{11} (h^{-1})	53,04	47,62	47,92	43,13	44,97	40,99	0,98	0,99	-4,03	-3,31	66,80	58,83
k_{14} (h^{-1})	81,00	72,60	71,83	64,65	60,00	54,69	0,99	0,99	-10,50	-8,96	118,19	104,28

Le tableau 20 et les figures 38 et 39 montrent que les cinétiques ont été décélérées avec l'augmentation de la valeur du pH, et que les vitesses les plus élevées sont à pH 3,5. Ceci est en accord avec les travaux de (Schlamowitz et Peterson, 1959) qui ont déclaré à ce sujet que la pepsine a une activité optimale à pH d'environ 1,5-3,5 avec des protéines dénaturées. En effet, chaque enzyme a un intervalle de pH approprié qui contribue à l'entretien de sa structure tridimensionnelle dans le site actif et fournit des groupes ionisables essentiels. Dubois et *al.*, (2005) ont montré que le changement de pH lors de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine, influence la vitesse de catalyse, et que certaines liaisons devenaient plus accessibles à la pepsine. Le pH 5,5, en présence d'urée, permet à la pepsine d'accéder plus facilement à la liaison C-terminale de la Leucine et d'augmenter le nombre de peptides antibactériens issus de ce clivage.

Il a été démontré dans le chapitre précédent que l'activité de la pepsine en fonction du pH est quasi linéaire pour un pH compris entre 3,5 et 5,5.

L'équation de la dépendance des constantes des vitesses apparentes en fonction du pH a été établie par l'équation d'une droite (tableau 20) :

$$k = a * x + b$$

où k est la constante de vitesse apparente (s^{-1}), x est le pH, a est la pente de la courbe b est l'ordonnée à l'origine.

VI-2-3- Effet du rapport enzyme/substrat sur la cinétique d'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 issu de l'hémoglobine et du cruor bovins

L'évolution de la concentration des peptides issus de l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 issu de l'hémoglobine et du cruor bovins est étudiée avec différents rapports enzyme/substrat (les autres conditions étant T= 23°C, pH=4,5): 1/5; 1/11 et 1/20 (mole/mole) (correspondant respectivement aux rapports 1/50, 1/100 et 1/200 pour le peptide α 1-32 synthétisé puisque dans l'hémoglobine, il y a environ dix fois plus de liaisons peptidiques à hydrolyser par la pepsine). Les valeurs des constantes apparentes de vitesse à différents rapports enzyme/substrat sont données dans le tableau 21.

Tableau 21: Valeurs des constantes apparentes de vitesse à différents rapports E/S (T=23°C, pH=4,5)

E/S	1/5		1/11		1/20	
	Hémoglobine	cruor	Hémoglobine	cruor	Hémoglobine	cruor
k₁ (h⁻¹)	3,15	2,81	3,11	2,80	2,95	2,66
k₂ (h⁻¹)	1,82	1,62	1,79	1,61	1,68	1,63
k₃ (h⁻¹)	0,63	0,54	0,60	0,54	0,57	0,51
k₄ (h⁻¹)	0,58	0,52	0,56	0,51	0,50	0,47
k₅ (h⁻¹)	1,08	0,98	1,10	0,99	1,05	0,96
k₆ (h⁻¹)	0,58	0,54	0,59	0,53	0,54	0,50
k₇ (h⁻¹)	0,46	0,45	0,48	0,43	0,46	0,41
k₈ (h⁻¹)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
k₉ (h⁻¹)	174,48	156,14	173,51	156,16	168,83	149,35
k₁₀ (h⁻¹)	24,62	22,15	24,60	22,14	23,37	21,03
k₁₁ (h⁻¹)	48,05	43,25	47,92	43,13	45,52	41,97
k₁₄ (h⁻¹)	72,91	64,77	71,83	64,65	69,24	61,42

Les résultats présentés par le tableau 21, montrent que les cinétiques ont été légèrement accélérées avec l'augmentation de la valeur du rapport enzyme/substrat de 1/20 à 1/11. On remarque également que la vitesse de la cinétique est restée constante pour l'intervalle du rapport E/S entre 1/5 et 1/11. Ce qui peut être expliqué par le fait qu'à une certaine concentration d'enzyme, la vitesse de la cinétique reste constante puisqu'il y aura suffisamment d'enzyme pour hydrolyser les liaisons peptidiques, ainsi l'augmentation de sa concentration sera sans effet sur la vitesse d'hydrolyse de l'hémoglobine et du cruor bovins. Ces observations sont en accord avec les hypothèses posées au début de notre travail qui suggèrent que les réactions enzymatiques mises en jeu lors de l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32, sont irréversibles et que l'effet de la concentration de l'enzyme est négligeable en considérant qu'il y avait toujours assez d'enzyme pour la réalisation de l'hydrolyse du substrat.

IV-2-4- Validation du modèle de la cinétique enzymatique d'hydrolyse du peptide α 1-32 issu de l'hémoglobine et du cruor bovins

Le modèle proposé a permis de prédire la cinétique de l'hydrolyse du peptide α 1-32 issu de l'hydrolyse de l'hémoglobine et du cruor bovins, les constantes apparentes de vitesse de

réaction et les concentrations des peptides d'intérêt à chacune des températures entre 15 et 37°C et à chaque pH compris entre 3,5 et 4,5.

Pour valider les prédictions du modèle, deux hydrolyses de l'hémoglobine et du cruor bovins ont été effectuées une à 30° C (pH= 4,5 et E/S=1/11), et une à pH 5 (T=23°C et E/S=1/11). Les résultats obtenus ont été comparés aux valeurs prédites pour la même température et le même pH à l'aide du modèle mathématique. La cinétique prédite par le modèle et les résultats expérimentaux sont présentés par les figures 40 et 42 pour la température et les figures 41 et 43 pour le pH.

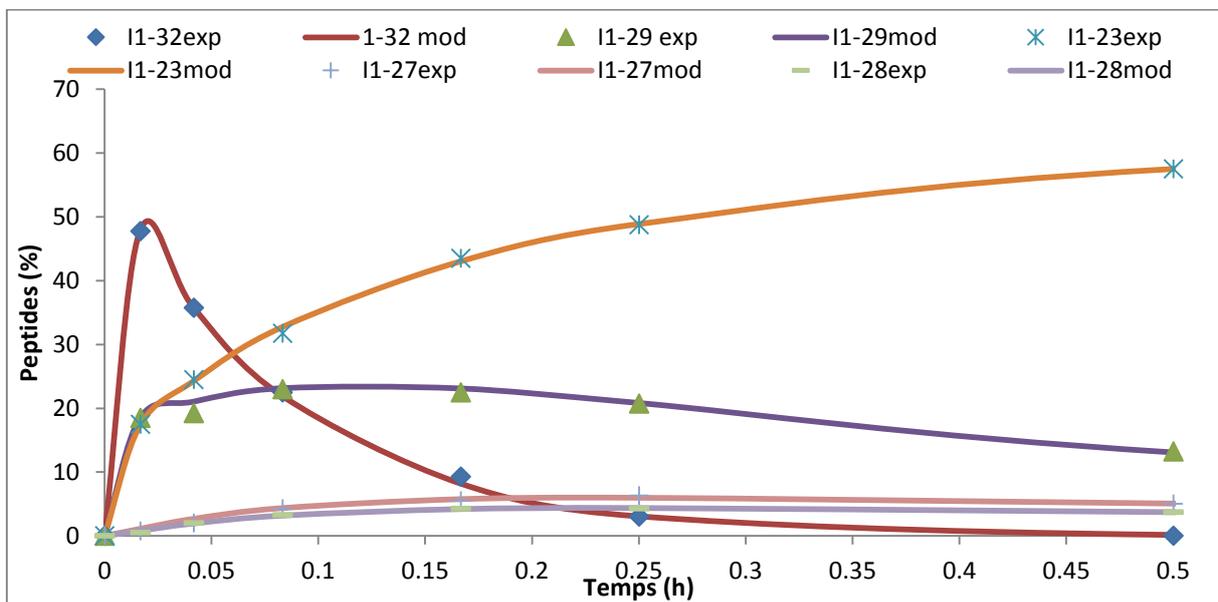


Figure 40: Comparaison des cinétiques prédites (lignes) et expérimentales (motifs) à une température de 30°C des peptides générés à partir du peptide α 1-32 au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine (E/S=1/11, pH=4,5)

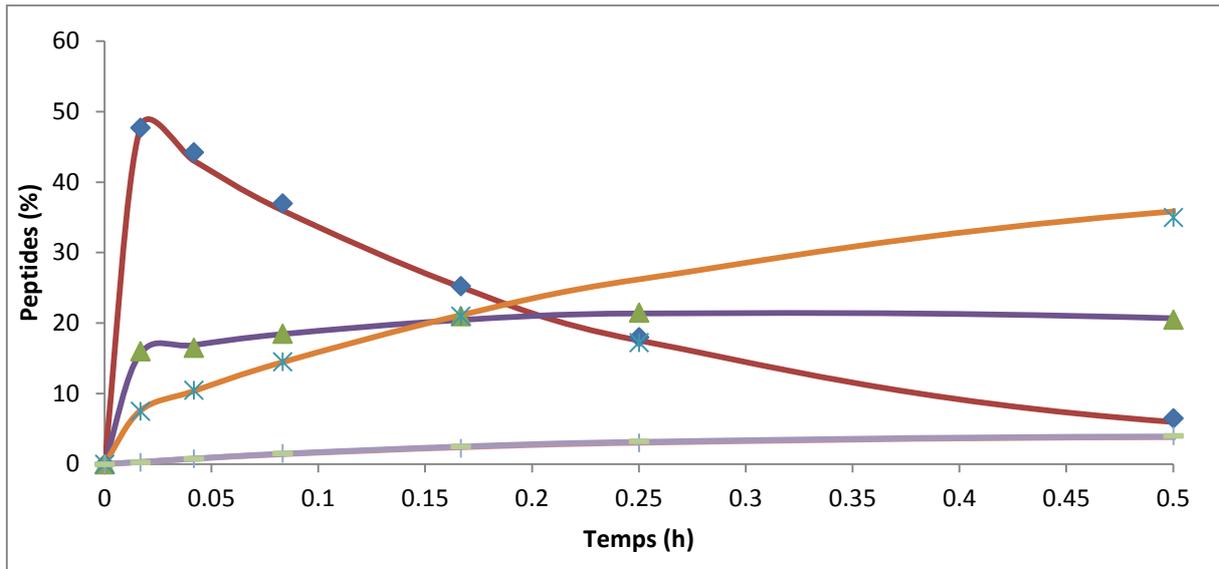


Figure 41: Comparaison des cinétiques prédites (lignes) et expérimentales (motifs) à un pH 5 des peptides générés à partir du peptide α 1-32 au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine (E/S=1/11, T = 23°C)

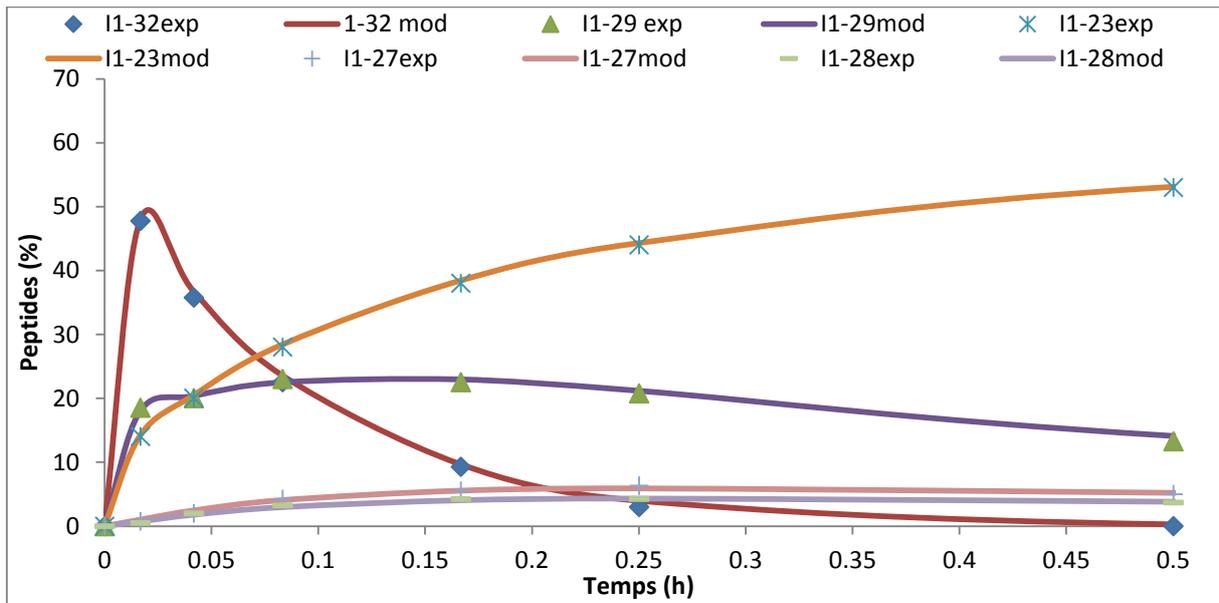


Figure 42: Comparaison des cinétiques prédites (lignes) et expérimentales (motifs) à une température de 30°C des peptides générés à partir du peptide α 1-32 au cours de l'hydrolyse du cruor bovin (E/S=1/11, pH=4,5)

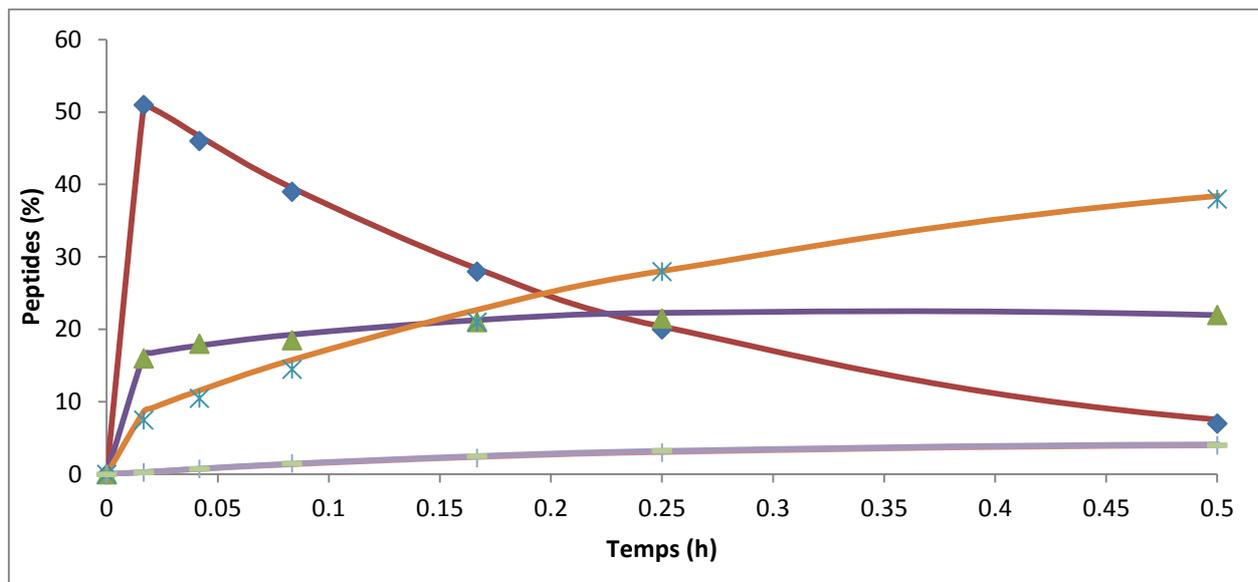


Figure 43: Comparaison des cinétiques prédites (lignes) et expérimentales (motifs) à un pH 5 des peptides générés à partir du peptide α 1-32 au cours de l'hydrolyse du cruor bovin (E/S=1/11, T=23°C)

Comme les montrent les figures 40-43, les résultats expérimentaux obtenus sont en très bon accord avec ceux prédits par le modèle (NRMSD entre 1,81 et 2,13%). Cette validation a confirmé que le modèle proposé est en mesure de prédire l'évolution de la concentration des peptides étudiés au cours de l'hydrolyse à la pepsine de l'hémoglobine et du cruor bovins à une température donnée dans l'intervalle de 15 à 37 ° C et à un pH donné dans la plage de 3,5 à 5,5.

Au cours de ce paragraphe, on a présenté les résultats de la modélisation pour l'hémoglobine et le cruor bovins, et une très grande similitude était observée pour les résultats des deux substrats. Pour le reste de ce chapitre, on présentera seulement les résultats pour l'hémoglobine bovine.

V- Modélisation de la cinétique d'hydrolyse de la famille α 107-141 issue de l'hydrolyse de l'hémoglobine et du cruor bovins

V-1- Détermination du schéma réactionnel de la famille α 107-141 issu de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine

Les analyses de l'hydrolysate de l'hémoglobine bovine par CLHP et par spectrométrie de masse ont permis d'identifier les peptides de la famille α 107-141 et de suivre l'apparition et la disparition des différents peptides de cette famille, grâce à ces résultats un schéma réactionnel de l'hydrolyse du peptide α 107-141 a pu être établi (figure 44).

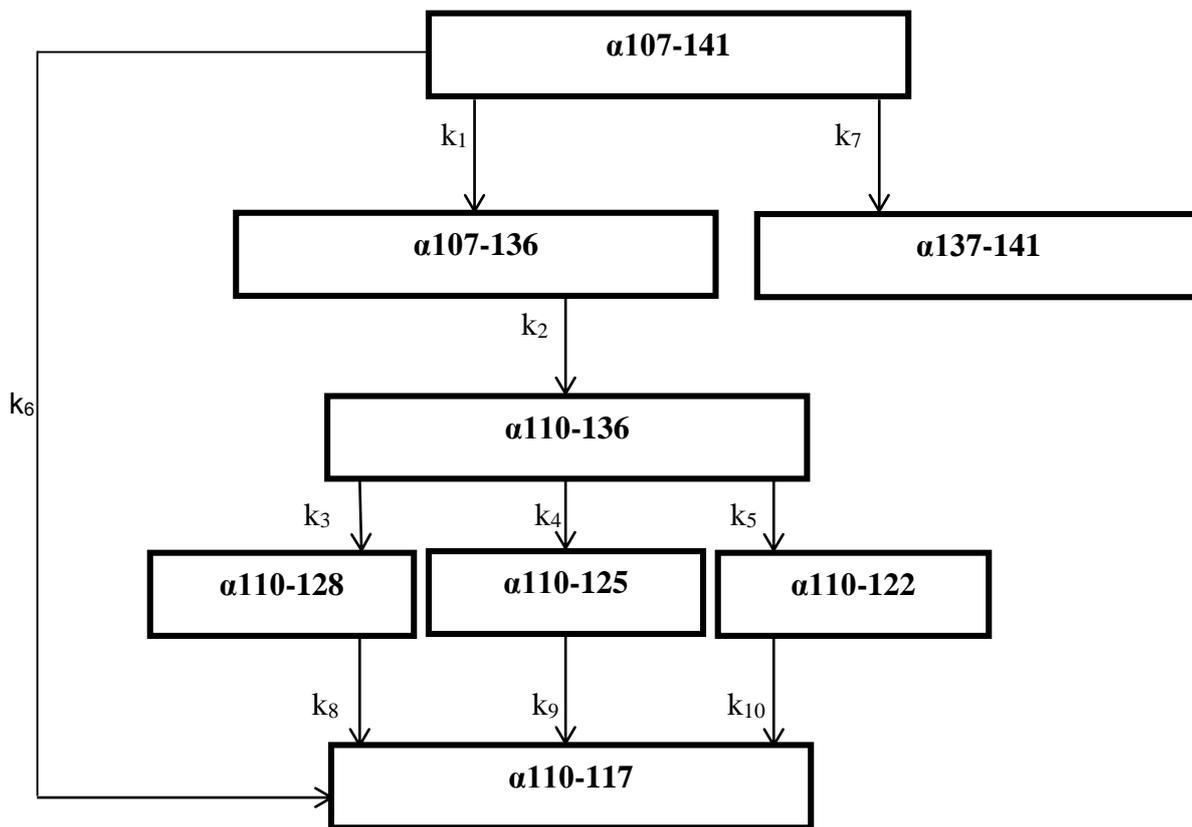


Figure 44: Schéma réactionnel de l'hydrolyse du peptide α 107-141

Le schéma réactionnel présenté par la figure 44 montre que lors de l'hydrolyse pepsique, le fragment α 107-141 de la chaîne α de l'hémoglobine bovine se clive en premier temps pour donner un peptide final α 137-141 et un peptide intermédiaire α 107-136, ce dernier va perdre sous l'effet de la pepsine trois acides aminés en C-terminal pour donner le peptide α 110-136 qui va s'hydrolyser rapidement en trois peptides α 110-128, α 110-125 et α 110-122 qui vont donner finalement un peptide finale α 110-117.

V-2- Modèle cinétique de l'hydrolyse de la famille des peptides dérivés du peptide α 107-141 issu de l'hémoglobine ou du cruor bovins

Le but de cette partie de travail était de généraliser le modèle mathématique trouvé pour la famille α 1-32 sur la famille du peptide α 107-141, un modèle qui pourrait décrire avec précision la cinétique d'hydrolyse du peptide α 107-141. Les mêmes hypothèses décrites précédemment sont prises en considérations et sur la base de ces hypothèses et grâce au schéma réactionnel établi ci-dessous (figure 44), l'évolution des concentrations de peptides dérivés du peptide α 107-141 issu de l'hémoglobine ou du cruor bovins dans le temps a été décrite selon le système d'équations différentielles suivant:

$$\frac{d\alpha_{107-141}}{dt} = -(k_1 + k_7)\alpha_{107-141}$$

$$\frac{d\alpha_{137-141}}{dt} = k_7\alpha_{107-141}$$

$$\frac{d\alpha_{107-136}}{dt} = k_1\alpha_{107-141} - k_2\alpha_{107-136}$$

$$\frac{d\alpha_{110-136}}{dt} = k_2\alpha_{107-136} - (k_3 + k_4 + k_5 + k_6)\alpha_{110-136}$$

$$\frac{d\alpha_{110-128}}{dt} = k_3\alpha_{110-136} - k_8\alpha_{110-128}$$

$$\frac{d\alpha_{110-125}}{dt} = k_4\alpha_{110-136} - k_9\alpha_{110-125}$$

$$\frac{d\alpha_{110-122}}{dt} = k_5\alpha_{110-136} - k_{10}\alpha_{110-122}$$

$$\frac{d\alpha_{110-117}}{dt} = k_6\alpha_{110-136} + k_8\alpha_{110-128} + k_9\alpha_{110-125} + k_{10}\alpha_{110-122}$$

α : la concentration de la chaîne α de l'hémoglobine ou du cruor bovins

$\alpha_{107-141}$: la concentration du peptide $\alpha_{107-141}$

$\alpha_{137-141}$: la concentration du peptide $\alpha_{137-141}$

$\alpha_{107-136}$: la concentration du peptide $\alpha_{107-136}$

$\alpha_{110-136}$: la concentration du peptide $\alpha_{110-136}$

$\alpha_{110-128}$: la concentration du peptide $\alpha_{110-128}$

$\alpha_{110-125}$: la concentration du peptide $\alpha_{110-125}$

$\alpha_{110-122}$: la concentration du peptide $\alpha_{110-122}$

$\alpha_{110-117}$: la concentration du peptide $\alpha_{110-117}$

La résolution de ce système d'équations différentielles a permis l'obtention des équations de la concentration au cours du temps des peptides de la famille du peptide α 107-141 obtenus par l'hydrolyse pepsique l'hémoglobine ou du cruor bovins qui sont présentées par le tableau 22.

Tableau 22 : Équations de la concentration au cours du temps des peptides de la famille du peptide α 107-141 obtenus par l'hydrolyse pepsique l'hémoglobine ou du cruor bovins

Peptides	Équations différentielles	Équations de la concentration au cours du temps d'hydrolyse
α 107-141	$\frac{d\alpha_{107-141}}{dt} = -(k_1 + k_7)\alpha_{107-141}$	$I_{107-141}(t) = I_0 e^{-(k_1+k_7)t}$ Avec $I_0=100\%$ (pourcentage du peptide α 107-141 à $t=0$)
α 137-141	$\frac{d\alpha_{137-141}}{dt} = k_7\alpha_{107-141}$	$I_{137-141}(t) = \frac{-k_7 I_0}{(k_1+k_7)} (e^{-(k_1+k_7)t}) + K_{\alpha_{137-141}} \text{ avec } K_{\alpha_{137-141}} = -I_{137-141}(t=0)$
α 107-136	$\frac{d\alpha_{107-136}}{dt} = k_1\alpha_{107-141} - k_2\alpha_{107-136}$	$I_{107-136}(t) = \frac{k_1 I_0}{(k_2) - (k_1 + k_7)} [(e^{-(k_1+k_7)t} - e^{-k_2 t})]$
α 110-136	$\frac{d\alpha_{110-136}}{dt} = k_2\alpha_{110-136} - (k_3 + k_4 + k_5 + k_6)\alpha_{110-136}$	$I_{110-136}(t) = X(e^{-(k_1+k_7)t} - e^{-(k_3+k_4+k_5+k_6)t}) - Y(e^{-(k_2)t} - e^{-(k_3+k_4+k_5+k_6)t})]$ $X = \frac{k_2 k_1 I_0}{[k_2 - (k_1+k_7)][(k_3+k_4+k_5+k_6) - (k_1+k_7)]}; Y = \frac{k_2 k_1 I_0}{[k_2 - (k_1+k_7)][(k_3+k_4+k_5+k_6) - (k_2)]}$
α 110-128	$\frac{d\alpha_{110-128}}{dt} = k_3\alpha_{110-136} - k_8\alpha_{110-128}$	$I_{110-128}(t) = \frac{A}{(k_8) - (k_1 + k_7)} [(e^{-(k_1+k_7)t} - e^{-k_8 t})]$ $+ \frac{B}{(k_8) - (k_3 + k_4 + k_5 + k_6)} [(e^{-(k_3+k_4+k_5+k_6)t} - e^{-k_8 t})]$ $+ \frac{C}{(k_8) - (k_2)} [(e^{-(k_2)t} - e^{-k_8 t})]$ $+ \frac{D}{(k_8) - (k_3 + k_4 + k_5 + k_6)} [(e^{-(k_3+k_4+k_5+k_6)t} - e^{-k_8 t})]$ $A = k_3 X; B = -A; C = -k_3 Y; D = -C$

$\alpha_{110-125}$	$\frac{d\alpha_{110-125}}{dt} = k_4\alpha_{110-136} - k_9\alpha_{110-125}$	$I_{110-125}(t) = \frac{E}{(k_9) - (k_1 + k_7)} [(e^{-(k_1+k_7)t} - e^{-k_9t})]$ $+ \frac{F}{(k_9) - (k_3 + k_4 + k_5 + k_6)} [(e^{-(k_3+k_4+k_5+k_6)t} - e^{-k_9t})]$ $+ \frac{G}{(k_9) - (k_2)} [(e^{-(k_2)t} - e^{-k_9t})]$ $+ \frac{H}{(k_9) - (k_3 + k_4 + k_5 + k_6)} [(e^{-(k_3+k_4+k_5+k_6)t} - e^{-k_8t})]$ <p>$E = k_4X; F = -E; G = -k_4Y; H = -G$</p>
$\alpha_{110-122}$	$\frac{d\alpha_{110-122}}{dt} = k_5\alpha_{110-136} - k_{10}\alpha_{110-128}$	$I_{110-122}(t) = \frac{I}{(k_{10}) - (k_1 + k_7)} [(e^{-(k_1+k_7)t} - e^{-k_{10}t})]$ $+ \frac{J}{(k_{10}) - (k_3 + k_4 + k_5 + k_6)} [(e^{-(k_3+k_4+k_5+k_6)t} - e^{-k_{10}t})]$ $+ \frac{K}{(k_{10}) - (k_2)} [(e^{-(k_2)t} - e^{-k_{10}t})]$ $+ \frac{L}{(k_{10}) - (k_3 + k_4 + k_5 + k_6)} [(e^{-(k_3+k_4+k_5+k_6)t} - e^{-k_{10}t})]$ <p>$I = k_5X; J = -I; K = -k_5Y; L = -K$</p>
$\alpha_{110-117}$	$\frac{d\alpha_{110-117}}{dt} = k_6\alpha_{110-136} + k_8\alpha_{110-128}$ $+ k_9\alpha_{110-125} + k_{10}\alpha_{110-122}$	$I_{110-117}(t) = k_6X \left(\frac{e^{-(k_3+k_4+k_5+k_6)t}}{(k_3 + k_4 + k_5 + k_6)} - \frac{e^{-(k_1+k_7)t}}{(k_1 + k_7)} \right)$ $- k_6Y \left(\frac{e^{-(k_3+k_4+k_5+k_6)t}}{(k_3 + k_4 + k_5 + k_6)} - \frac{e^{-(k_2)t}}{(k_2)} \right)$ $+ \frac{Ak_8}{(k_8) - (k_1 + k_7)} \left[\left(\frac{e^{-(k_8)t}}{(k_8)} - \frac{e^{-(k_1+k_7)t}}{(k_1 + k_7)} \right) \right]$ $+ \frac{Bk_8}{(k_8) - (k_3 + k_4 + k_5 + k_6)} \left[\left(\frac{e^{-(k_8)t}}{(k_8)} - \frac{e^{-(k_3+k_4+k_5+k_6)t}}{(k_3 + k_4 + k_5 + k_6)} \right) \right]$

$$\begin{aligned}
& + \frac{Ck_8}{(k_8) - (k_2)} \left[\left(\frac{e^{-(k_8)t}}{(k_8)} - \frac{e^{-(k_2)t}}{(k_2)} \right) \right] \\
& \quad + \frac{Dk_8}{(k_8) - (k_3 + k_4 + k_5 + k_6)} \left[\left(\frac{e^{-(k_8)t}}{(k_8)} - \frac{e^{-(k_3+k_4+k_5+k_6)t}}{(k_3 + k_4 + k_5 + k_6)} \right) \right] \\
& + \frac{Ek_9}{(k_9) - (k_1 + k_7)} \left[\left(\frac{e^{-(k_9)t}}{(k_9)} - \frac{e^{-(k_1+k_7)t}}{(k_1 + k_7)} \right) \right] \\
& \quad + \frac{Fk_9}{(k_9) - (k_3 + k_4 + k_5 + k_6)} \left[\left(\frac{e^{-(k_9)t}}{(k_9)} - \frac{e^{-(k_3+k_4+k_5+k_6)t}}{(k_3 + k_4 + k_5 + k_6)} \right) \right] \\
& + \frac{Gk_9}{(k_9) - (k_2)} \left[\left(\frac{e^{-(k_9)t}}{(k_9)} - \frac{e^{-(k_2)t}}{(k_2)} \right) \right] \\
& \quad + \frac{Hk_9}{(k_9) - (k_3 + k_4 + k_5 + k_6)} \left[\left(\frac{e^{-(k_9)t}}{(k_9)} - \frac{e^{-(k_3+k_4+k_5+k_6)t}}{(k_3 + k_4 + k_5 + k_6)} \right) \right] \\
& + \frac{Ik_{10}}{(k_{10}) - (k_1 + k_7)} \left[\left(\frac{e^{-(k_{10})t}}{(k_{10})} - \frac{e^{-(k_1+k_7)t}}{(k_1 + k_7)} \right) \right] \\
& \quad + \frac{Jk_{10}}{(k_{10}) - (k_3 + k_4 + k_5 + k_6)} \left[\left(\frac{e^{-(k_{10})t}}{(k_{10})} - \frac{e^{-(k_3+k_4+k_5+k_6)t}}{(k_3 + k_4 + k_5 + k_6)} \right) \right] \\
& + \frac{Kk_{10}}{(k_{10}) - (k_2)} \left[\left(\frac{e^{-(k_{10})t}}{(k_{10})} - \frac{e^{-(k_2)t}}{(k_2)} \right) \right] \\
& \quad + \frac{Lk_{10}}{(k_{10}) - (k_3 + k_4 + k_5 + k_6)} \left[\left(\frac{e^{-(k_{10})t}}{(k_{10})} - \frac{e^{-(k_3+k_4+k_5+k_6)t}}{(k_3 + k_4 + k_5 + k_6)} \right) \right]
\end{aligned}$$

$+K_{\alpha_{110-117}}$

avec $K_{\alpha_{110-117}} = -I_{110-117}$ à $t = 0$

La cinétique du peptide α 107-141 issu de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine a été étudiée à différentes températures, à différents pH et à différents rapports E/S. Les résultats expérimentaux obtenus ont été utilisés pour proposer un modèle mathématique décrivant la cinétique de la concentration des peptides de la famille α 107-141 générés lors de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine. Les valeurs des constantes apparentes de vitesse (k_1 à k_{10}) ont été déterminées grâce aux données expérimentales, en minimisant la NRMSD. Les résultats pour les valeurs des constantes apparentes de vitesse pour différentes températures et différents pH sont donnés dans le tableau 23 et le tableau 24.

Tableau 23: Valeurs des constantes apparentes de vitesse et paramètres de l'équation d'Arrhenius en fonction de la température du peptide α 107-141 issu de l'hémoglobine bovine

T (K)	288	296	310	Coefficient de détermination (R^2)	Énergie d'activation ($J.mol^{-1}$)
k_1 (h^{-1})	66,18	97,90	143,23	0,99	3 071,67
k_2 (h^{-1})	35,77	52,80	85,25	0,97	3 487,11
k_3 (h^{-1})	1,38	2,13	3,23	0,98	3 368,43
k_4 (h^{-1})	7,60	10,92	17,74	0,99	3 414,36
k_5 (h^{-1})	4,96	7,39	11,84	0,99	3 489,11
k_6 (h^{-1})	4,89	7,20	12,45	0,96	3 772,76
k_7 (h^{-1})	28,71	41,97	61,39	0,99	3 026,34
k_8 (h^{-1})	0,04	0,07	0,11	0,98	4 036,70
k_9 (h^{-1})	0,0012	0,0006	0,0016	0,99	1 990,64
k_{10} (h^{-1})	0,0109	0,0188	0,0199	0,97	2 249,30

Tableau 24: Valeurs des constantes apparentes de vitesse et paramètres de l'équation de la droite en fonction du pH du peptide α 107-141 issu de l'hémoglobine bovine

pH	3,5	4,5	5,5	Coefficient de détermination (R ²)	linéarisation	
					Pente (a)	b
k₁ (h⁻¹)	145,98	97,90	48,66	0,96	-48,660	316,486
k₂ (h⁻¹)	77,39	52,80	25,80	0,92	-25,796	168,078
k₃ (h⁻¹)	2,92	2,13	0,97	0,93	-0,975	6,396
k₄ (h⁻¹)	16,09	10,92	5,36	0,99	-5,365	34,936
k₅ (h⁻¹)	10,67	7,39	3,56	0,95	-3,558	23,217
k₆ (h⁻¹)	10,58	7,20	3,53	0,93	-3,527	22,977
k₇ (h⁻¹)	63,25	41,97	21,08	0,96	-21,083	13,976
k₈ (h⁻¹)	0,09	0,07	0,03	0,99	-0,032	0,205
k₉ (h⁻¹)	0,008	0,0006	0,003	0,92	-0,003	0,017
k₁₀ (h⁻¹)	0,0271	0,0188	0,009	0,92	-0,009	0,059

L'étude de l'effet de la température et du pH sur la cinétique du peptide α 107-141 issu de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine (tableau 23 et 24) montre que les cinétiques ont été accélérées lorsqu'on augmente la température et ont été ralenties, avec l'augmentation du pH. La température et le pH n'ont pas eu d'influence sur l'ordre d'apparition des peptides et par conséquent sur le schéma réactionnel.

V-2-1- Effet de la température sur la cinétique d'hydrolyse du peptide α 107-141

La cinétique de l'hydrolyse du peptide α 107-141 par la pepsine a été étudiée à différentes températures : 15°C, 23°C et 37°C (les autres conditions étant constants pH=4,5 ; E/S=1/11). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 45 (motifs : résultats expérimentaux, lignes continues : résultats de modélisation). Comme prévu, il est apparu clairement que la cinétique a été accélérée par l'augmentation la température.

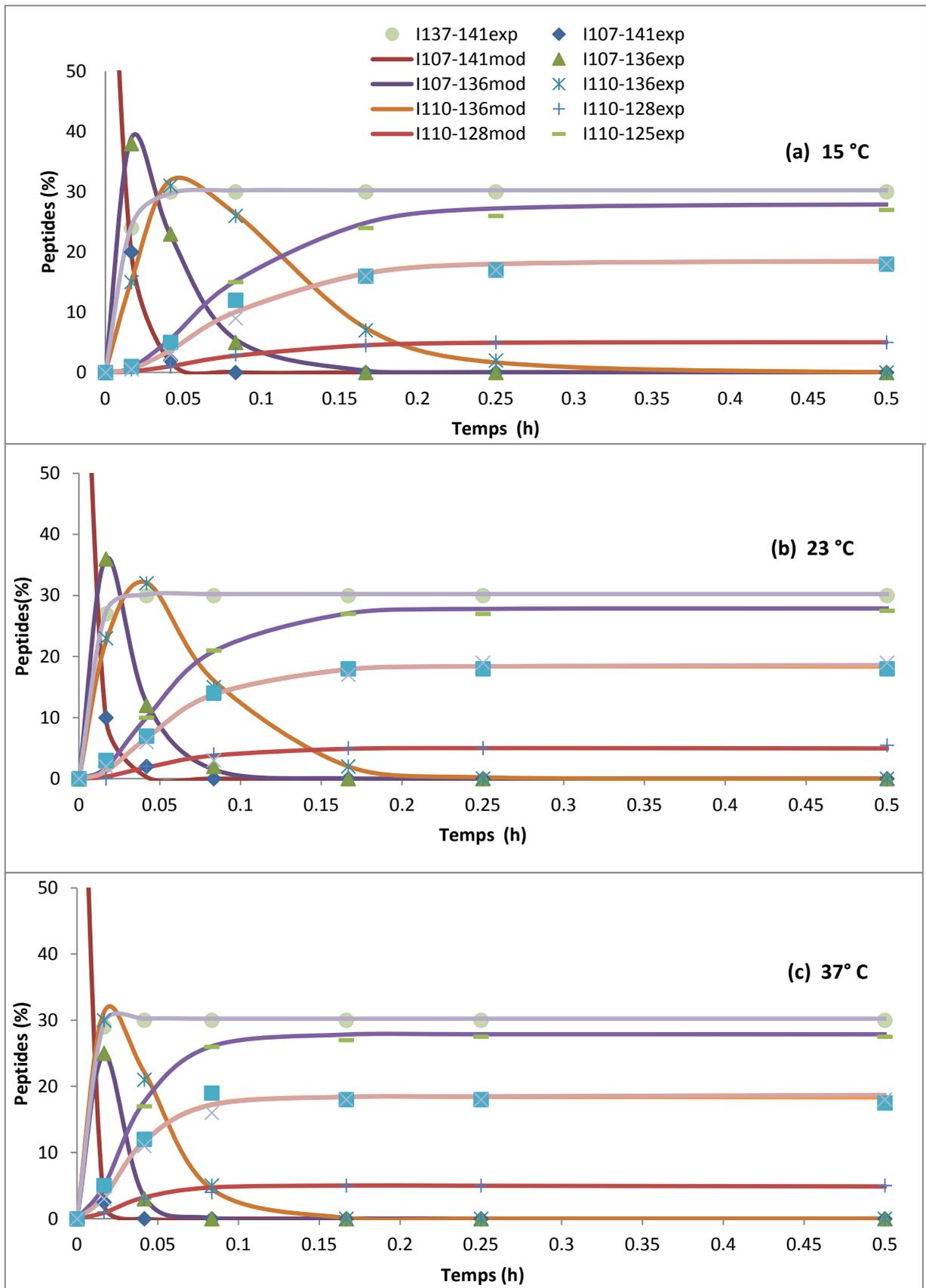


Figure 45: Évolution de la concentration des peptides de la famille α 107-141 générés au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine (modèle : lignes continues et expérimental : points) à différentes températures (a) 15°C ; (b) 23°C et (c) 37°C

Les données expérimentales et celles du modèle pour la cinétique de concentration des peptides de la famille α 107-141 présentés dans la figure 45 montrent que les résultats expérimentaux et les prédictions du modèle sont en bon accord pour toutes les températures étudiées avec une NRMSD moyenne de 2,67 %. Par conséquent, le modèle proposé est apparu comme pertinent pour décrire les cinétiques de concentration des peptides de la famille α 107-141 lors de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine (pour les conditions opératoires testées).

L'équation de la dépendance des constantes apparentes de vitesse en fonction de la température a été établie par l'équation d'Arrhenius comme décrit précédemment et les valeurs d'énergie d'activation sont présentées par le tableau 23.

Les valeurs des R^2 présentées par le tableau 23 (0,92-0,99) montrent que la cinétique d'hydrolyse par la pepsine des peptides de la famille α 107-141 issus de l'hémoglobine bovine suit bien l'équation d'Arrhenius.

V-2-2- Effet du pH sur la cinétique de l'hydrolyse du peptide α 107-141 issu de l'hydrolyse par la pepsine de l'hémoglobine bovine

L'évolution de la concentration des peptides de la famille α 107-141 issus de l'hydrolyse par la pepsine de l'hémoglobine bovine à différent pH : 3,5 ; 4,5 et 5,5 ($T=23^\circ$ C, $E/S=1/11$) est représentée par la figure 46. Les résultats ont montré que les cinétiques ont été décélérées avec l'augmentation de la valeur du pH, et que la vitesse d'hydrolyse est la plus élevée à un pH de 3,5.

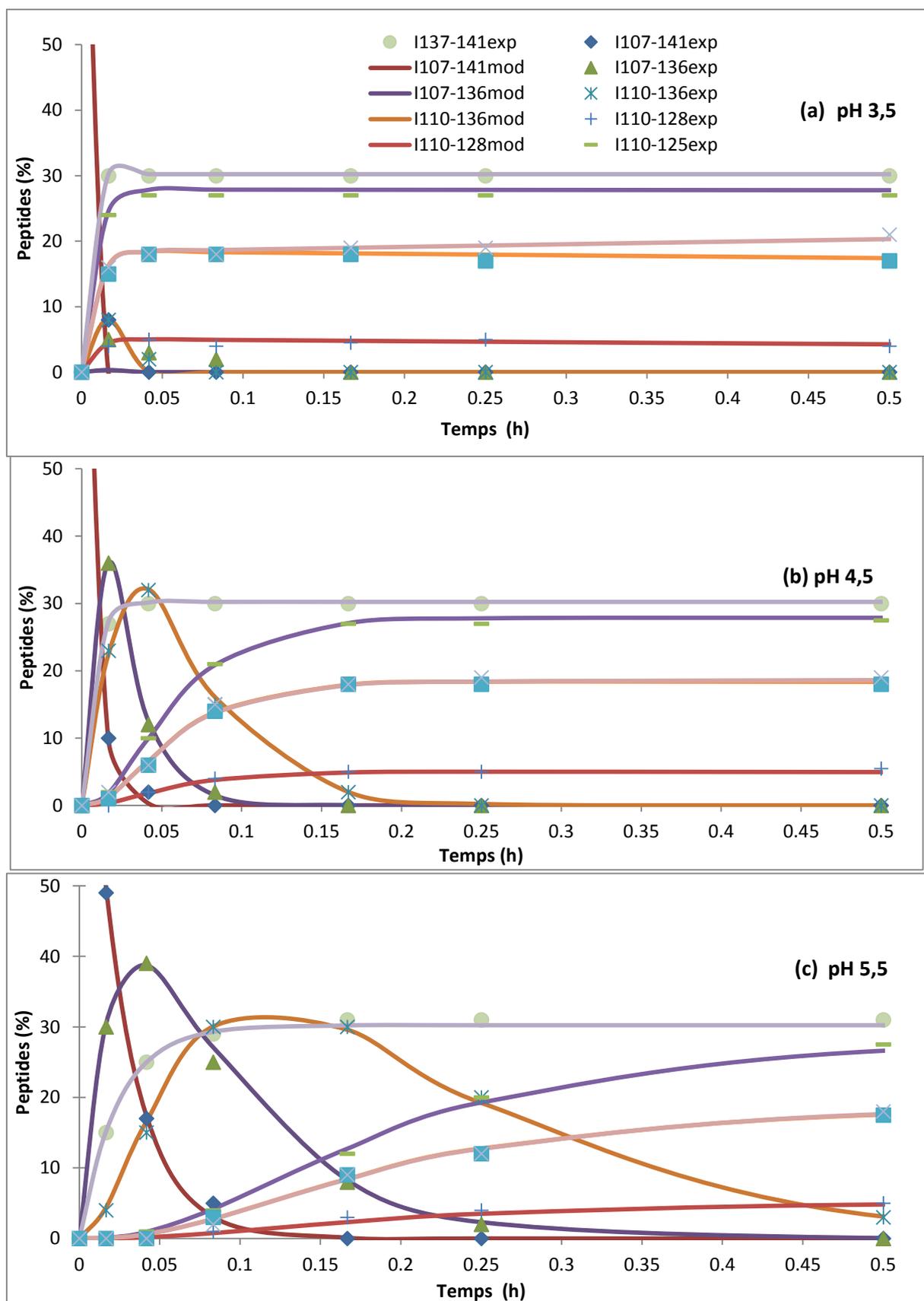


Figure 46: Évolution de la concentration des peptides de la famille α 107-141 générés au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine (modèle : lignes continues et expérimental : points) à différent pH (a) pH 3,5 (b) ; à pH 4,5 et (c) à pH 5,5

La figure 46 montre que les données expérimentales de la cinétique d'hydrolyse des peptides de la famille α 107-141 et les prédictions du modèle sont en bon accord pour tous les pH étudiés avec une moyenne de NRMSD de 4,03 %. Ce modèle a permis de déterminer les équations de la dépendance des constantes apparentes de vitesse en fonction du pH.

L'équation de la dépendance des constantes apparentes de vitesse en fonction du pH a été établie par l'équation d'une droite (tableau 24).

Sur la base des données expérimentales et du schéma réactionnel établi, un modèle a été proposé pour décrire la cinétique de la concentration des peptides générés lors de l'hydrolyse de peptides α 107-141. Un bon accord a été observé entre le modèle et la cinétique expérimentale pour les trois températures et les trois pH étudiés.

V-2-3- Effet du rapport enzyme/substrat sur la cinétique d'hydrolyse pepsique du peptide α 107-141 issu de l'hémoglobine ou du cruor bovins

L'évolution de la concentration des peptides obtenus lors de l'hydrolyse pepsique du peptide α 107-141 issu de l'hémoglobine et du cruor bovins est étudiée avec différents rapports enzyme/substrat : 1/5; 1/11 et 1/20 (les autres conditions étant T=23° C, pH=4,5). Les valeurs des constantes apparentes de vitesse à différents rapports enzyme/substrat sont données dans le tableau 25.

Tableau 25 : Valeurs des constantes apparentes de vitesse à différents rapports E/S (T=23°C, pH=4,5)

E/S	1/5	1/11	1/20
k₁ (h⁻¹)	98,39	97,90	95,94
k₂ (h⁻¹)	53,06	52,80	51,74
k₃ (h⁻¹)	2,14	2,13	2,09
k₄ (h⁻¹)	10,97	10,92	10,70
k₅ (h⁻¹)	7,43	7,39	7,24
k₆ (h⁻¹)	7,24	7,20	7,06
k₇ (h⁻¹)	42,18	41,97	41,13
k₈ (h⁻¹)	0,0704	0,0700	0,0686
k₉ (h⁻¹)	0,0060	0,0060	0,0059
k₁₀ (h⁻¹)	0,0189	0,0188	0,0184
k₁₁ (h⁻¹)	98,39	97,90	95,94
k₁₄ (h⁻¹)	53,06	52,80	51,74

Les résultats présentés par le tableau 25, montrent que, comme dans le cas du peptide α 1-32, les cinétiques ont été très légèrement accélérées avec l'augmentation de la valeur du rapport enzyme/substrat de 1/20 à 1/11 et que la vitesse de la cinétique est restée constante pour l'intervalle du rapport E/S entre 1/5 et 1/11. Ces observations sont en accord avec les hypothèses émises au début de notre travail qui suggèrent que les réactions enzymatiques mises en jeu lors de l'hydrolyse pepsique du peptide α 107-141, sont irréversibles et que l'effet de la concentration de l'enzyme est négligeable en considérant qu'il y avait toujours assez d'enzyme pour la réalisation de l'hydrolyse du substrat.

V-2-4- Validation du modèle de la cinétique enzymatique d'hydrolyse du peptide α 107-141 issu de l'hémoglobine bovine

Le modèle proposé a permis de prédire les constantes de réaction d'hydrolyse du peptide α 107-141 et les concentrations des peptides d'intérêt à chacune des températures entre 15 et 37°C et à chaque pH compris entre 3,5 et 4,5. Pour valider les prédictions du modèle, des expériences ont été effectuées à 30°C (pH=4,5 et E/S=1/11) ou à un pH de 5 (T=23°C et E/S=1/11). Les résultats obtenus ont été comparés aux valeurs prédites en utilisant le modèle mathématique pour la même température et du même pH. Les données expérimentales et celles proposées par le modèle pour la cinétique des peptides de la famille α 107-141 sont présentés par la figure 47 ((a) la température et (b) pH).

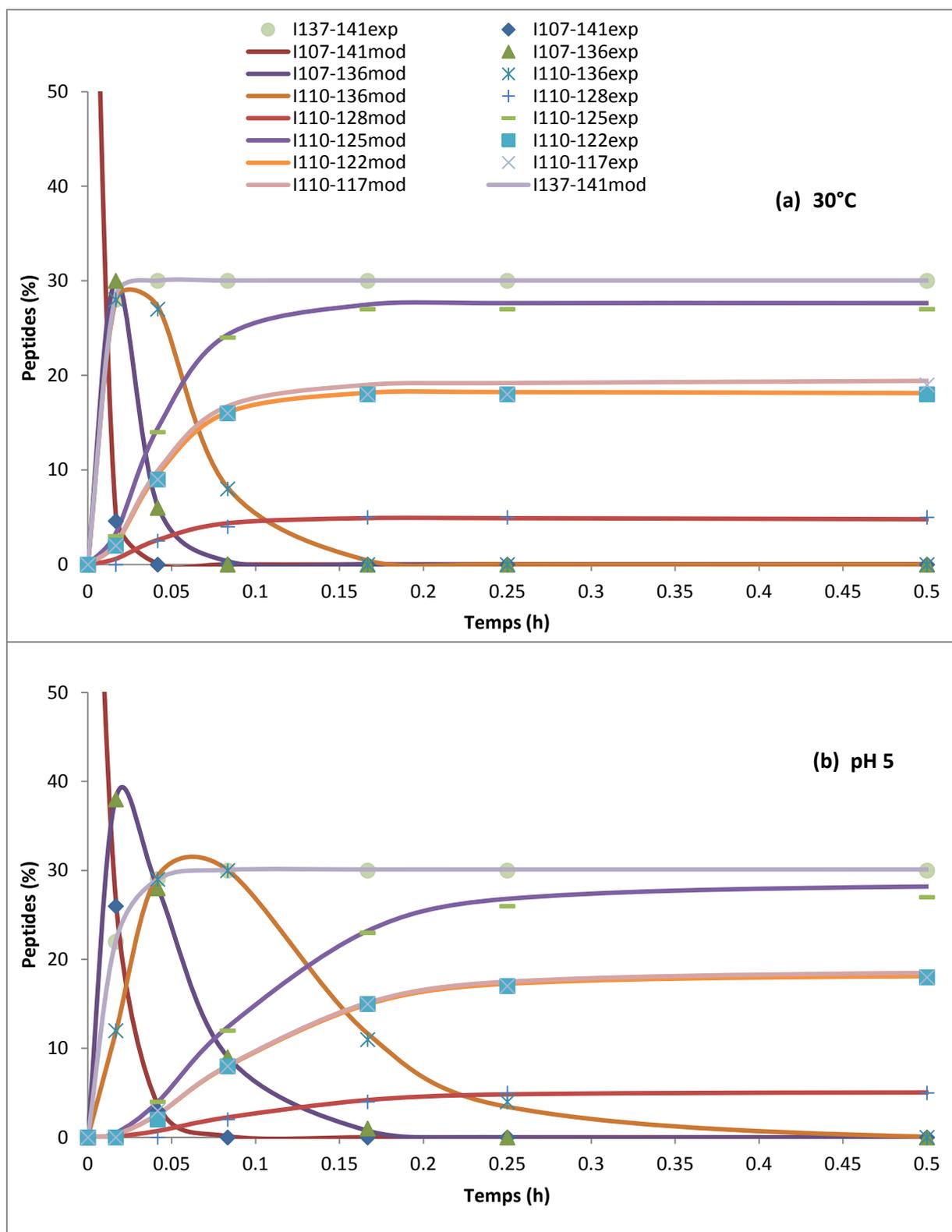


Figure 47: Comparaison des cinétiques prédites (lignes) et expérimentales (motifs) à une température de 30°C (a) (E/S= 1/11, pH=4,5) et un pH 5 (b) (E/S=1/11, T=23°C) des peptides générés à partir du peptide α 107-141 au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine

La figure 47 montre que les résultats expérimentaux obtenus sont en très bon accord avec les valeurs prédites par le modèle (NRMSD = 2,10%). Cette validation a confirmé que le modèle proposé est en mesure de prédire l'évolution de la concentration des peptides étudiés au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine à une température donnée dans l'intervalle de 15 à 37 ° C et à un pH donné dans la plage de pH 3,5 à 5,5.

Conclusion

Nous avons pu montrer dans ce chapitre que dans les conditions dénaturantes (urée 6M), l'hémoglobine bovine, purifiée ou à partir du cruor bovin, s'hydrolyse selon un mécanisme « Zipper », aboutissant ainsi à une forte population peptidique de nature variable.

Deux familles de ces peptides : α 107-141 et α 1-32, qui ont présenté une activité antibactérienne contre quatre souches bactériennes, ont pu être identifiées et caractérisées par CLHP et SM. Ainsi, on a pu déterminer les schémas réactionnels décrivant les réactions parallèles et consécutives qui ont lieu au cours de l'hydrolyse pepsique de ces deux familles actives à partir de l'hémoglobine et cruor bovins.

Un modèle mathématique basé sur le mécanisme proposé, a été développé pour décrire la cinétique de l'hydrolyse des peptides des familles α 107-141 et α 1-32 issus de l'hémoglobine ou du cruor.

L'équation d'Arrhenius a été utilisée pour étudier l'effet de la température sur les coefficients cinétiques, permettant le calcul des énergies d'activation pour les différentes réactions impliquées dans le mécanisme. L'effet du pH et du rapport E/S était également étudié et le modèle trouvé a démontré une augmentation linéaire de la vitesse d'hydrolyse en diminuant le pH (entre 3,5 et 5,5) et une vitesse invariable avec le rapport E/S. La validation du modèle a pu évaluer sa capacité à prévoir la cinétique de l'hydrolyse des peptides de la famille α 107-141 et de la famille α 1-32 issus de l'hémoglobine et du cruor bovins dans la plage de température de 15 à 37° C (un rapport enzyme/substrat 1/11 et à pH 4,5) et dans l'intervalle de pH entre 3,5 et 5,5 (un rapport enzyme/substrat 1/11 et à 23°C). Ce modèle mathématique permettra de définir les conditions optimales pour la production de divers peptides ayant une activité antibactérienne à partir de l'hydrolyse des peptides α 107-141 et α 1-32 issus de l'hémoglobine ou du cruor bovins.

**CHAPITRE 3 : ÉTUDE STRUCTURE-FONCTION DES
PEPTIDES ANTIBACTÉRIENS α 1-32 ET α 137-141
ISSUS DE L'HYDROLYSE PEPSIQUE DE
L'HÉMOGLOBINE BOVINE ET LEUR
VALORISATION EN EMBALLAGE ACTIF**

I- Compréhension de mécanismes d'action et caractérisation de la relation structure fonction des peptides antibactériens α 1-32 et α 137-141 issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine

La relation entre la structure des peptides antibactériens et leurs activités ont fait l'objet de nombreuses études, mais il existe peu de données sur les bases moléculaires régissant la spécificité propre de chaque peptide (Gennaro et Zanetti, 2000 ; Tossi et *al.*, 2000; Powers et Hancock, 2003). En effet, chaque peptide a un spectre d'activité distinct. La taille, la charge, la séquence en acides aminés, l'hydrophobicité, l'amphiphilie ou encore le degré de structuration sont des facteurs spécifiques à chaque peptide (Boman et *al.*, 1987; Gennaro et Zanetti, 2000).

Plusieurs techniques classiques sont utilisées pour mettre en évidence l'activité antibactérienne d'un peptide, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide. La plupart des peptides antibactériens ont une action directe sur la membrane des bactéries, mais certains agissent au niveau intra-cytoplasmique (Andres et Dimarcq, 2007). L'endommagement de la membrane cytoplasmique peut se traduire par la fuite des molécules cytoplasmiques comme l'ATP, une réduction voire une annulation du potentiel membranaire et du pH intracellulaire et aussi par une sortie massive du potassium intra et extracellulaire (Chihib et *al.*, 1999a; Ultée et *al.*, 2000).

L'ion potassium (K^+) est un élément indispensable pour les fonctions biologiques des micro-organismes procaryotes, et de toutes les cellules vivantes, il se trouve à des concentrations relativement élevées pouvant atteindre des teneurs de 1 M chez de nombreuses bactéries (Richey et *al.*, 1987). Son transport du milieu intracellulaire au milieu extracellulaire est énergie dépendant et se fait via des pompes à potassium qui se trouvent au niveau de la membrane cytoplasmique. En effet, toutes les cellules vivantes rejettent dans le milieu extracellulaire les ions Na^+ et accumulent les ions K^+ qui sont impliqués dans la régulation du pH intracellulaire (Bakker, 1993) ; ils sont activateurs de certaines enzymes (Svelter, 1970), et interviennent dans la régulation de la pression de turgescence chez les procaryotes (Epstein, 1986). Plusieurs fonctions vitales chez les bactéries sont assurées par la membrane plasmique à savoir la perméabilité sélective, le maintien du gradient de concentration, la synthèse du peptidoglycane, le transport de nutriments (Hancock et Chapple, 1999 ; Yeaman et Yount,

2003). De ce fait l'intégrité de la membrane cytoplasmique est nécessaire pour garantir à la fois la survie et la croissance de la cellule, ainsi la fuite des ions et des métabolites est synonyme d'une perturbation de la perméabilité et d'endommagement de la membrane cytoplasmique (Chihib et *al.*, 1999b; Yeaman et Yount, 2003). Le caractère hydrophobe de la bicouche lipidique rend la membrane cytoplasmique pratiquement imperméable aux ions inorganiques comme le K^+ et le Na^+ . Le potassium représente l'ion majoritaire dans la cellule, toute perturbation des concentrations du K^+ se traduit par une perturbation de la perméabilité de la membrane cytoplasmique et donc la mort directe ou indirecte de la bactérie. Ainsi, l'ion K^+ est considéré comme un bon marqueur d'endommagements ou de perturbations de la perméabilité de la membrane cytoplasmique. (Matsuzaki et *al.*, 1997; Chihib et *al.*, 1999abc; Hancock et *al.*, 1999). C'est dans cette optique que l'ion potassium a été utilisé comme marqueur des perturbations de la perméabilité membranaire pour étudier le mode d'actions des peptides antibactériens α 1-32 (peptide avec un grand nombre d'acides aminés avec une charge globale positive, un grand pourcentage de résidus hydrophobes et une structure secondaire en hélice α) et α 137-141 (petit peptide chargé positivement, avec un pourcentage élevé de structure en «Random coil») issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine. les peptides présentant les mêmes caractéristiques que les peptides antimicrobiens répertoriés dans la littérature. Ils contiennent un grand nombre d'acides aminés avec une charge globale positive, un grand pourcentage de résidus hydrophobes et une structure secondaire en hélice α (Powers et Hancock, 2003 ; Nedjar-Arroume et *al.*, 2008).

L'objectif de ce travail est d'étudier la relation structure-fonction des peptides antibactériens α 1-32 et α 137-141 de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine en évaluant l'effet de ces peptides sur la perméabilisation de la paroi bactérienne en étudiant la cinétique d'efflux d'ion K^+ extracellulaires . La bactérie utilisée pour ces fins est *Listeria innocua* qui est une bactérie Gram + sensible à l'action des peptides α 1-32 et α 137-141. Ajoutés à une solution concentrée de la *Listeria innocua* ces peptides peuvent entraîner une perte de potassium intracellulaire à travers la membrane bactérienne due aux pores causés à ce niveau. L'intensité de la fuite de potassium dans le milieu extracellulaire est directement liée à l'activité, au mode d'action du peptide ainsi qu'au nombre d'acides aminés, et à l'état de chaînes latérales (libres ou bloquées). Un film de polyéthylène basse densité, traité avec le plasma froid, greffé avec les deux peptides antibactérien α 1-32 et α 137-141 a ensuite été utilisé pour étudier leur activité antibactérienne contre *Listeria innocua* et *Salmonella enteridis*, ce qui souligne

l'intérêt de leur utilisation dans un emballage bioactif pour la conservation des aliments contre le développement de bactéries pathogènes.

I-1- Étude de la structure et des propriétés des peptides antibactériens α 1-32 et α 137-141 issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine

L'hémoglobine est une protéine «modèle» au sein du laboratoire ProBioGEM, de nombreuses études ont déjà été réalisées, dont notamment l'étude de l'obtention des peptides antibactériens à partir de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine. Plusieurs peptides antibactériens ont été obtenus, identifiés et classés en groupes selon leur structure. Le premier groupe regroupe les peptides présentant les mêmes caractéristiques que les peptides antimicrobiens répertoriés dans la littérature. Ils contiennent un grand nombre d'acides aminés avec une charge globale positive, un grand pourcentage de résidus hydrophobes et une structure secondaire en hélice α (Powers et Hancock, 2003 ; Nedjar-Arroume et *al.*, 2008). Le deuxième groupe est différent des antimicrobiens classiques. Il regroupe les petits peptides (5 à 9 acides aminés) chargés positivement, ne présentant pas ou peu de résidus hydrophobes, avec un pourcentage élevé de structure en «Random coil» et pouvant se structurer en solution aqueuse au contact de la membrane biologique (Corbier et *al.*, 2001 ; Powers et Hancock, 2003; Nedjar-Arroume et *al.*, 2008 ; Catiau et *al.*, 2011a,b).

Pour ce présent chapitre, nous nous sommes intéressés à l'étude de la relation structure-fonction de deux peptides appartenant à ces deux groupes et dont la cinétique de libération lors de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine était déjà modélisée pendant les deux premiers chapitres, le peptide α 1-32 qui appartient au premier groupe et le peptide α 137-141 qui appartient au deuxième. Afin de préciser la partie active du peptide α 137-141 des tests ont été également effectués sur les peptides synthétisés α 138-141 (SKYR) et α 139-141 (KYR).

-Le peptide α 1-32 possède 32 acides aminés (VLSAADKGNVKA AWGKVGGHA AEYGAEALERM), 58% de structure en hélice α , 46% de résidus hydrophobe et une charge = +1 à pH 7. La Structure tridimensionnelle du peptide α 1-32 est donnée par la figure 48 (www.acdlabs.com).

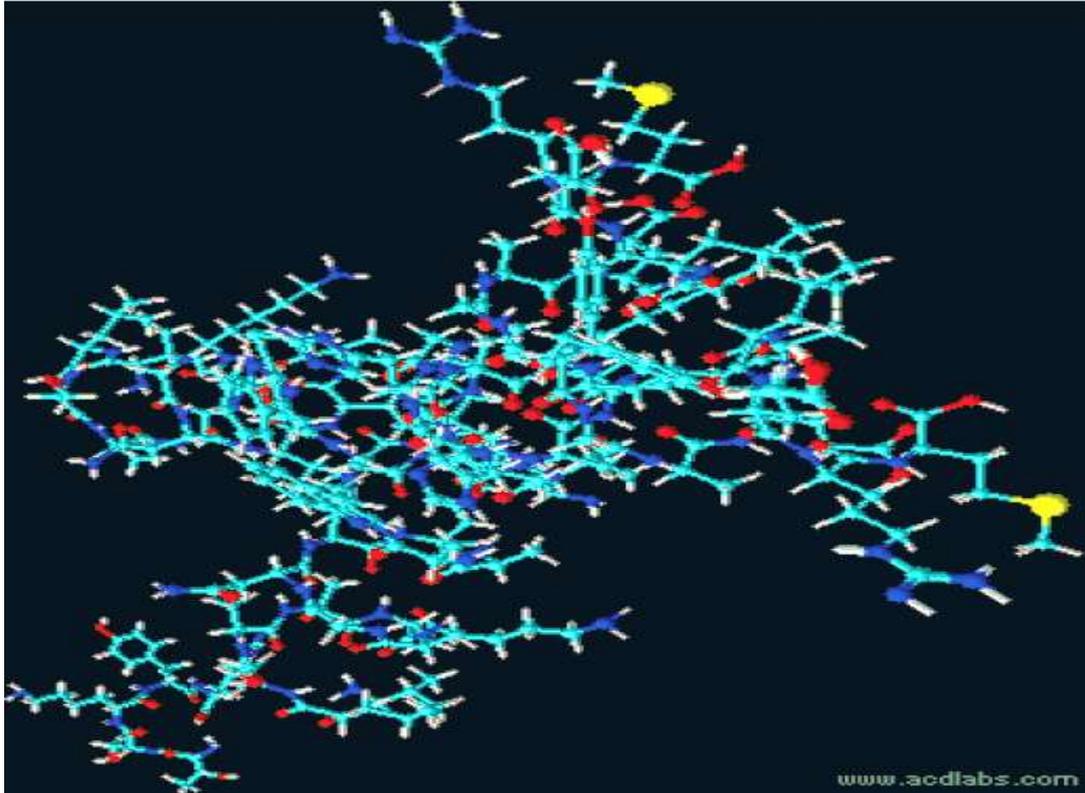
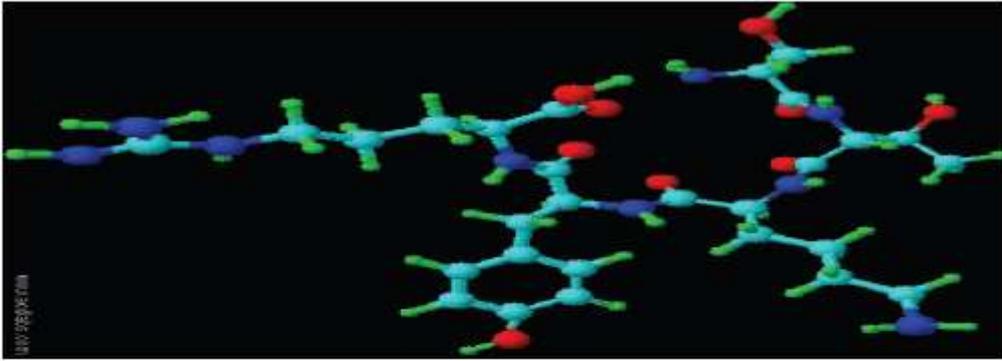
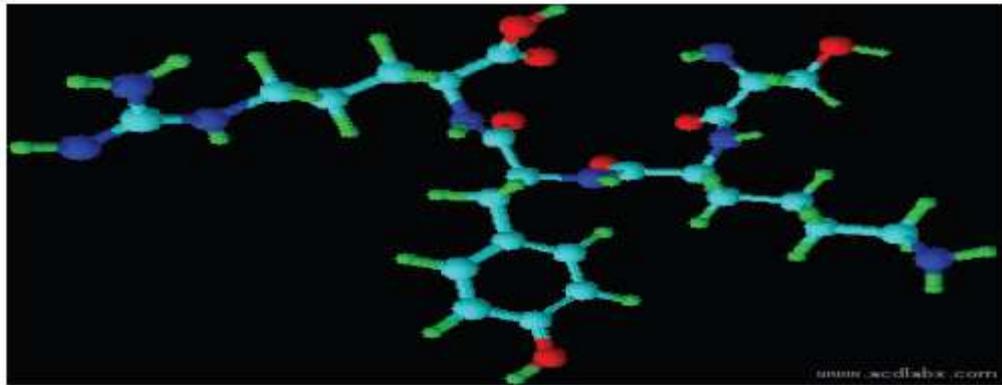


Figure 48: Structure tridimensionnelle du peptide α 1-32 (www.acdlabs.com)

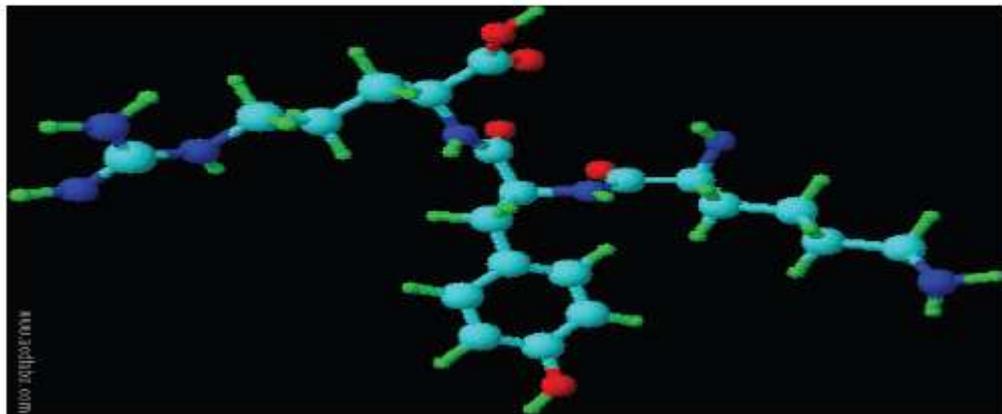
-Le peptide α 137-141 est un peptide contenant 5 acides aminés (TSKYR), 93% de structure « Random coil », ne possédant pas de résidus hydrophobes et a une charge = +2 à pH 7. Les Structures tridimensionnelles du peptide α 137-141 et de ses dérivés (α 138-141 (SKYR) et α 139-141 (KYR) sont données par la figure 49 (www.acdlabs.com).



(a) α 137-141



(b) α 138-141



(c) α 139-141

Figure 49: Structure tridimensionnelle du peptide α 137-141 (a) et ses dérivés (b) α 138-141 (SKYR) et (c) α 139-141 (KYR) (www.acdlabs.com)

I-2- Étude de l'hydrosolubilité et la liposolubilité des peptides antibactériens α 1-32 et α 137-141 issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine

Les molécules liposolubles traversent plus facilement la membrane cytoplasmique que les molécules polaires (Shargel et *al.*, 2004). Le coefficient de partage octanol/eau (P), qui est

habituellement présenté après avoir été transformé logarithmiquement (log P), est un indicateur du caractère lipophile d'une substance. Il est calculé à partir du rapport de concentrations du peptide soluble dans l'octanol et dans l'eau par l'équation :

$$\log P = \log [\text{octanol}] / [\text{eau}] \quad (\text{Bernier, 2008}).$$

Les coefficients de partage log P du peptide α 1-32 et du peptide α 137-141(TSKYR) et de ses dérivés α 138-141 et α 139-141 (SKYR et KYR) ont été déterminés à l'aide d'un logiciel de simulation informatique (www.acdlabs.com) qui permet de prédire ce coefficient de partage correspondant en se basant sur les groupements ionisables.

Plus la valeur log P est négative, plus le peptide est hydrophile et plus sa valeur est élevée et positive, plus le peptide est lipophile. Le tableau 26 présente les valeurs calculées de log de P du peptide α 1-32 et du peptide α 137-141 et de ses dérivés α 138-141 et α 139-141.

Tableau 26: Valeurs calculées de log P

Peptides	α 1-32	α 137-141	α 138-141	α 139-141
log P	-7,11 ± 1,16	-2,78±0,85	- 2,28±0,79	-1,36±0,69

Le tableau 26 montre que les peptides α 137-141, α 138-141 et α 139-141 sont hydrophiles et ils se dissolvent dans l'eau et que le peptide α 139-141 est le plus lipophile ce qui favorisera sa diffusion à travers la membrane bactérienne par rapport aux peptides α 137-141 et α 138-141. Par contre le peptide α 1-32 est le plus hydrophile d'entre eux sa diffusion à travers la membrane sera beaucoup plus difficile que celle des peptides α 137-141, α 138-141 et α 139-141.

I-3- Étude de l'activité antibactérienne des peptides issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine

L'activité antimicrobienne du peptide α 1-32 et du peptide α 137-141 et de ses dérivés α 138-141 et α 139-141 a été testée en milieu liquide sur microplaque dans du milieu Müller-Hinton liquide contenant des concentrations décroissantes de peptides antibactériens. L'activité antibactérienne est détectée par l'absence de croissance dans les puits contenant la souche bactérienne et le peptide à la concentration testée.

Les CMI des peptides antibactériens testés contre quatre souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Salmonella enteritidis* et *Micrococcus luteus* sont données par le tableau 27.

Tableau 27: CMI en μM des peptides antibactériens contre quatre souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Salmonella enteritidis* et *Micrococcus luteus*

Peptides	α 1-32	α 137-141	α 138-141	α 139-141
<i>Escherichia coli</i>	154	9	4	1
<i>Listeria innocua</i>	38	4	2	1
<i>Salmonella enteritidis</i>	38	5	2	1
<i>Micrococcus luteus</i>	90	9	4	1

Les quatre peptides α 1-32, α 137-141, α 138-141 et α 139-141 ont montré une activité antibactérienne vis-à-vis des quatre souches bactériennes testées. Plus la taille du peptide diminue, plus CMI est petite et plus le peptide est actif.

I-4- Détermination de la partie active du peptide α 137-141

Afin de comprendre le mécanisme d'action du peptide antibactérien α 137-141 les fonctions chimiques présentes sur les résidus des acides aminés ont été modifiées en remplaçant la tyrosine par la phénylalanine pour comprendre le rôle du groupement OH, en bloquant l'extrémité N terminale et/ou l'extrémité C terminale du peptide : par l'ajout d'un groupement acétyle au niveau du N terminal de la thréonine et/ou en ajoutant un groupement amine au niveau du C terminal de l'arginine.

La compréhension du mécanisme d'action du peptide antibactérien et la caractérisation de leur relation structure-fonction permettra d'améliorer l'activité antimicrobienne de ce peptide et d'orienter d'une manière sélective la réaction protéasique vers l'obtention des peptides les actifs.

L'activité du peptide α 137-141 libre et modifié, a été évaluée en utilisant un milieu Mueller Hinton gélosé préalablement contaminé par : *L. innocua*, *E. coli*, *S. enteritidis* et *M. luteus*. L'activité antimicrobienne est évaluée par l'apparition d'une zone d'inhibition au tour du puits de dépôt du peptide et les résultats sont donnés par le tableau 28.

Tableau 28: Activité du peptide α 137-141 modifié contre les quatre souches bactériennes *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Salmonella enteritidis* et *Micrococcus luteus*

	<i>L.innocua</i>	<i>S. enteridis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E.coli</i>
TSKYR	+	+	+	+
TSKFR	-	-	-	-
TSKYR Ct bloqué	-	-	-	-
TSKYR Nt bloqué	-	-	-	-
TSKYR Nt bloqué et Ct bloqué	-	-	-	-

Le tableau 28 montre que le peptide α 137-141 libre présente une activité antibactérienne contre les quatre souches bactériennes. Cependant, quand la Tyrosine est substituée par la Phénylalanine ou quand l'extrémité N-terminale et/ou l'extrémité C-terminale du peptide sont bloquées, il perd complètement son activité antibactérienne.

II- Étude de la perméabilisation de la paroi bactérienne du *Listeria innocua*

Le principe de cette étude est de suivre la concentration des ions K^+ dans le surnageant d'une suspension cellulaire concentrée de *L. innocua* en présence de peptides antibactériens afin de comprendre le mode d'action de ces peptides et leurs effets sur la perméabilisation de la paroi bactérienne.

II-1- Étude du rôle du glucose dans le transport intermembranaire du potassium

L'évolution de la concentration du potassium extracellulaire dans une suspension bactérienne de *Listeria innocua* incubée à 30°C avec et sans glucose (5g.L⁻¹) a été étudié afin de déterminer le rôle du glucose dans le transport intermembranaire de cet ion.

La figure 50 montre l'évolution de la concentration de K^+ extracellulaire dans une suspension cellulaire concentrée de *Listeria innocua* en présence et en absence du glucose (5g.L⁻¹) à 30°C.

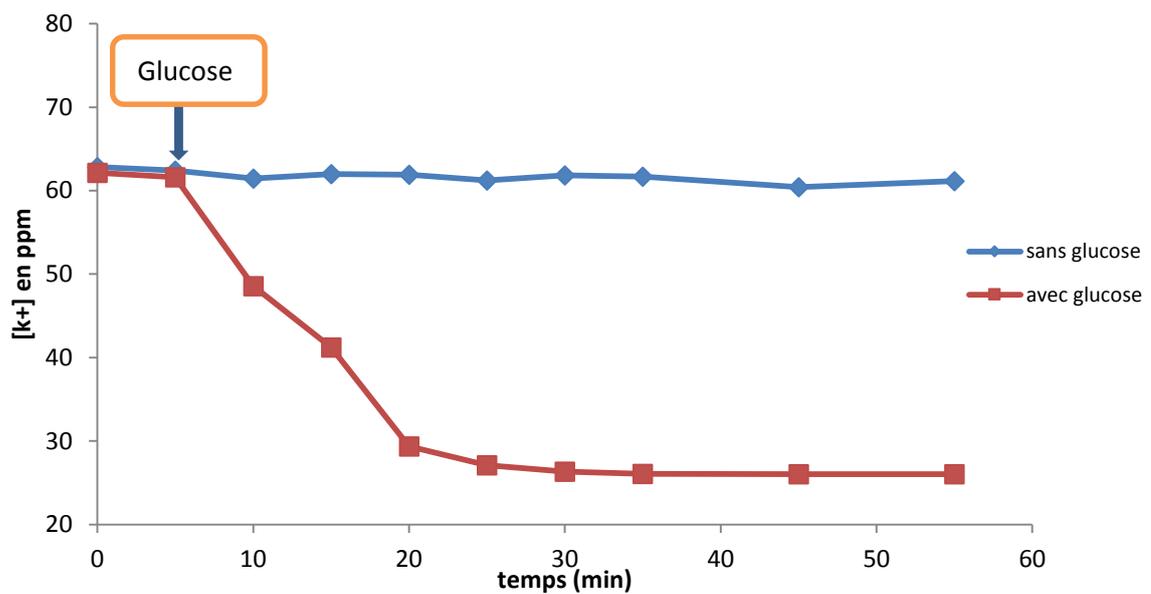


Figure 50: Évolution de la concentration extracellulaire de l'ion K^+ dans une suspension cellulaire concentrée de *Listeria innocua* avec et sans glucose ($5g.L^{-1}$), les cellules sont incubées à $30^{\circ}C$

Les résultats de la figure 50 montrent que l'addition du glucose aux cellules à 5 min d'incubation, induit un appauvrissement du milieu en ion K^+ . La consommation du glucose permet aux cellules la synthèse de l'ATP ce qui provoque l'activation des systèmes de transport des ions K^+ . Dans le milieu extracellulaire, la concentration de cet ion passe ainsi de 62 à 25 ppm en 25 min de la cinétique. Cependant, en absence de glucose la bactérie était incapable de pomper le K^+ extracellulaire. Ceci montre que le transport du potassium est énergie dépendant comme été montré pour d'autres bactéries comme *Petinatus frisingensis* (Chihib et al., 1999a).

II-2- Étude de l'effet des peptides antibactériens α 1-32 et α 137-141 issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine sur le transport intermembranaire du potassium chez *Listéria innocua*

Pour étudier l'effet des peptides antibactériens α 1-32 et α 137-141 issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine sur le transport intermembranaire du potassium chez *Listéria innocua*, les peptides antibactériens sont injectés à 20 min dans la suspension bactérienne de *Listeria innocua* incubée à $30^{\circ}C$ avec glucose ($5g.L^{-1}$). La cinétique des mouvements de K^+ à travers la membrane cellulaire de *L. innocua* été suivie pendant 65 min.

Ceci permet de mettre en évidence le pouvoir perméabilisant ou non des peptides testés (figure 51).

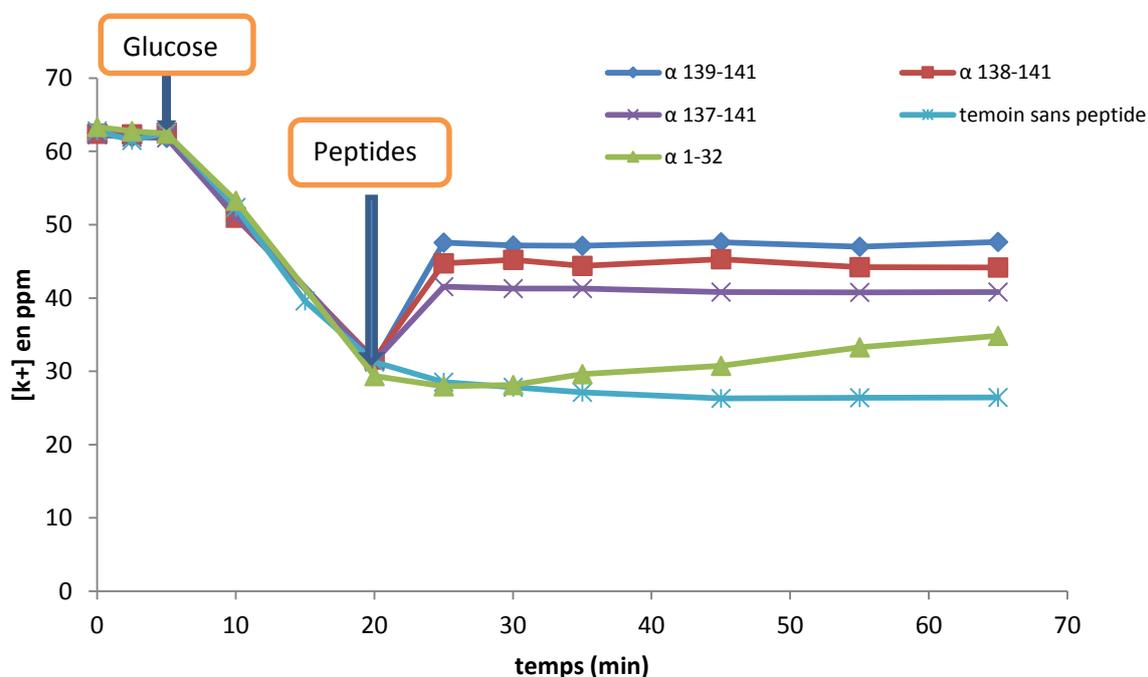


Figure 51: Évolution de la concentration extracellulaire des ions potassium dans une suspension cellulaire de *Listeria innocua*
T=5min : glucose (5g.L⁻¹) à T=20 min : peptides antibactériens

Les résultats de la figure 51 montrent que l'addition des peptides engendre une sortie massive et rapide des ions potassium intracellulaires pour tous les peptides testés sauf pour le peptide α 1-32.

Les résultats obtenus montrent que le peptide α 1-32 qui appartient au premier groupe de peptides (grand nombre d'acides aminés, charge globale positive, un grand pourcentage de résidus hydrophobes et une structure secondaire en hélice α) est moins actif que les peptides du deuxième groupe de peptides (petits peptides, chargés positivement, ne présentant pas ou peu de résidus hydrophobes et ayant un pourcentage élevé de structure en «Random coil») : le peptide α 137-141 et ses dérivés. Ces derniers ont une activité antibactérienne vis-à-vis des quatre souches bactériennes testées mais avec une différence d'intensité d'action : le peptide qui a 3 acides aminés est plus actif que celui de 4 acides aminés qui plus actif que le peptide qui a 5 acides aminés. Ces résultats sont en accord avec ceux présentés par Catiau et

al., 2011a qui montrent que le peptide α 137-141 et ses dérivés sont capables d'endommager la membrane bactérienne et que l'activité de ces peptides sur les liposomes (vésicules artificielles formée par des bicouches lipidiques jouant le rôle de la membrane bactérienne) était dépendante de valeurs de CMI. Ainsi, les valeurs de la CMI les plus basses ont conduit à la plus grande activité sur les liposomes. Ceci confirme la capacité de ces peptides à interagir avec la membrane bactérienne. La spécificité d'action propre de chaque peptide est en relation directe avec la taille, la charge, la séquence en acides aminés, l'hydrophobicité, l'amphiphilie ou encore le degré de structuration (Powers et Hancock, 2003). La modification de l'un de ces paramètres entraîne des changements plus ou moins significatifs de l'activité antimicrobienne (Dathe et *al.*, 2001).

Les peptides KYS, SKYR et TSKYR ont un effet immédiat sur la concentration extracellulaire de K^+ . Le peptide KYR semble être le peptide qui perméabilise le plus la membrane cellulaire de *L. innocua*. La concentration extracellulaire en ion K^+ augmente de 16 mg.L^{-1} lorsque le peptide est ajouté. Cependant, la concentration en ions K^+ n'augmente que de 12 mg.L^{-1} et 10 mg.L^{-1} lorsque les peptides SKYR et TSKYR sont ajoutés aux suspensions cellulaires.

II-3- Rôle des fonctions N-terminale et C-terminale dans l'activité antibactérienne du peptide α 137-141 issu de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine

La caractérisation de la relation structure-fonction du peptide α 137-141 avec la fonction C et/ou N-terminale bloquée(s) était également étudiée et l'évolution de la concentration des ions K^+ extracellulaires en présence de ce peptide modifié est présentée par la figure 52.

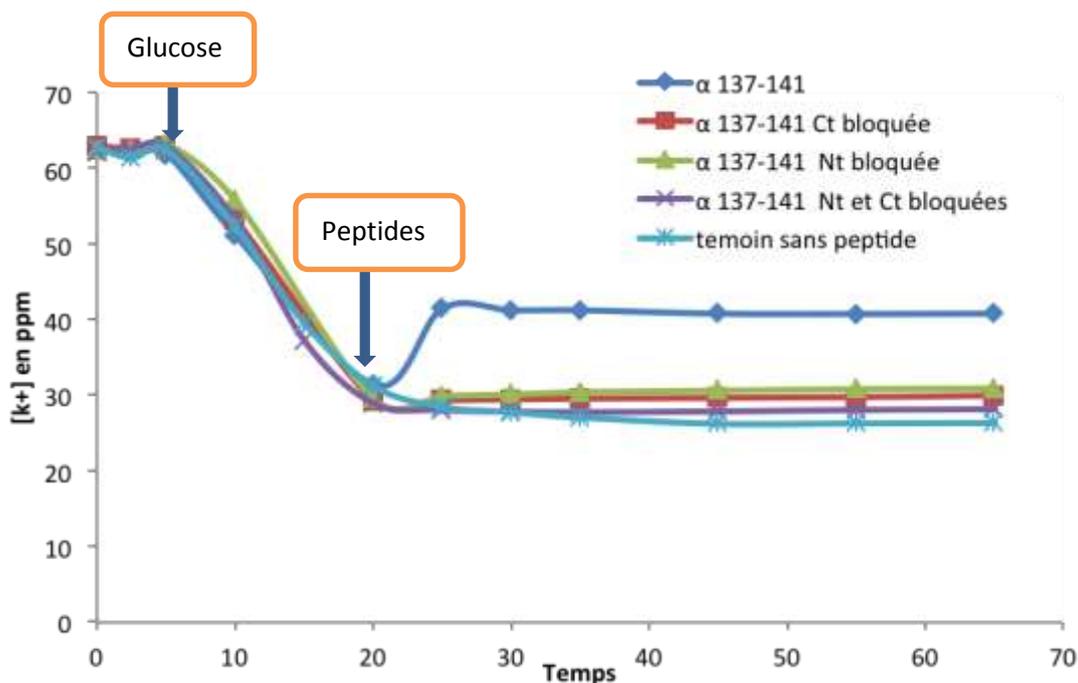


Figure 52: Évolution de la concentration des ions K^+ extracellulaires en présence du peptide α 137-141 avec la fonction C-terminale ou N-terminale bloquée et N et C-terminale bloquées

La figure 52 montre que le blocage du côté C ou N terminal du peptide α 137-141 affecte la quantité des ions K^+ libérée après l'ajout du peptide antibactérien. En effet, une très légère augmentation de la concentration ($1-2 \text{ mg.mL}^{-1}$) a été mesurée. Cependant, quand les côtés C et N terminaux sont bloqués aucune augmentation dans la concentration en ions potassium extracellulaires. Ces résultats montrent l'importance de la structure native du peptide dans l'activité antibactérienne.

Les modes d'action des peptides antibactériens sont très divers, ils sont capables soit de s'adsorber sur la cellule bactérienne et traverser l'enveloppe, plusieurs mécanismes de perméabilisation sont déjà étudiés (He et al., 1996; Matsuzaki et al., 1996; Bechinger et Lohner, 2006), soit de pénétrer dans la cellule et perturber son fonctionnement par action sur des cibles intracellulaires (Hale et Hancock, 2007).

Le mécanisme d'action du peptide α 137-141 est probablement celui d'une perméabilisation de la membrane entraînant une inhibition de la souche bactérienne *L. innocua*, par la fuite du contenu cellulaire notamment les ions potassium à travers la formation des pores.

L'attraction se fait par des interactions électrostatiques entre le peptide et les phospholipides chargés négativement de la bactérie (Jenssen et al., 2006). Lopez et al., (2006) ont montré que le peptide α 137-141 (TSKYR) pouvait interagir avec les membranes biologiques. Cette

interaction induit un changement de conformation du groupement phénolique de la tyrosine, permettant à la néokyotorphine de se fixer sur un récepteur membranaire. Ce qui explique la perte de l'activité antimicrobienne quand la Tyrosine était remplacée par la Phénylalanine dans le peptide. L'interaction se fait par l'intermédiaire de deux acides aminés, la Lysine et l'Arginine qui apportent les charges positives par leur groupement latérale hydrophile nécessaire pour interagir avec les charges négatives des phospholipides des acides lipoteichoïques présents à la surface de *L. innocua*. Ce qui explique la perte partielle ou totale de l'activité antimicrobienne quand on bloque les extrémités N-terminale et/ou C-terminale du peptide α 137-141. Catiau *et al.*, (2011a) ont étudié l'activité antibactérienne des deux peptides KYR et SKYR synthétisés et ont montré que le peptide possédant la plus courte séquence (KYR) a la CMI la plus faible. Ainsi, la séquence KYR est le déterminant antibactérien minimal de la chaîne α de l'hémoglobine bovine. Cette étude a montré également que la présence de la Tyrosine et de deux acides aminés chargés positivement sont importants pour l'activité antibactérienne et que tous les peptides testés ayant cette séquence minimale (KYR) pourraient avoir un effet antimicrobien.

La pénétration au cœur hydrophobe de la membrane se fait par le caractère amphiphile du peptide qui perfore la bicouche lipidique (Teixeira *et al.*, 2012). Il a été démontré que les peptides ont la capacité de se lier entre eux, en orientant leur domaine hydrophobe et hydrophile de façon à s'assembler. Cette aptitude à se lier est à l'origine de la formation des pores dans les membranes des bactéries (Yeaman et Yount., 2003). La croissance de l'activité antibactérienne est due principalement à la taille et au caractère lipophile de chaque peptide. Teixeira *et al.*, (2012) ont rapporté que l'interaction d'une molécule avec la membrane est en relation directe avec ses propriétés lipophiles et leur masse moléculaire. Plus le peptide est lipophile et de petite taille, plus il diffuse à travers la membrane (Teixeira *et al.*, 2012). Le blocage de l'une ou des deux fonctions latérales empêche le peptide de s'intégrer avec la membrane suite à la perte de son caractère amphiphile et de sa structuration en hélice α . En effet, il existe un état de surface, nommé «état S» et un «état I», lors de la formation de pores (Huang, 2000). L'«état S» correspond à un état inactif, où les peptides sont en petit ratio et ils sont à plat sur la membrane de la bactérie (Chen *et al.*, 2003). Lorsque ce ratio augmente, les peptides vont s'orienter perpendiculairement à la membrane, et s'y insérer : ils vont ainsi former des pores transmembranaires, et sont alors dans un «état I». Pour créer un pore, il faut l'action simultanée de plusieurs peptides (Brogden, 2005).

Pour le peptide α 1-32, le phénomène observé n'est pas le même que pour le peptide α 137-141 et ses dérivés. La quantité de potassium qui sort augmente graduellement au cours du temps. Il n'y a pas un effet direct sur la membrane. Le mécanisme d'action est probablement celui d'une perturbation d'une fonction intracellulaire, le peptide passe donc la membrane plasmique, puis interagit avec l'ADN, l'ARN et/ou des enzymes, et il peut inhiber différentes voies de synthèses.

III- Valorisation des peptides antibactériens en emballage actif

Les emballages antibactériens représentent actuellement une technique très intéressante pour maîtriser le risque microbiologique liée à certains produits alimentaires qui ont subi des traitements modérés de conservation. Cette alternative permettra aussi d'augmenter la durée de vie des aliments en réduisant ou en remplaçant les conservateurs chimiques utilisés à cet effet (sulfites, nitrites, acides organiques...). L'objectif de ce chapitre est d'évaluer l'activité antibactérienne d'un film polyéthylène basse densité traité par le plasma froid et fonctionnalisé par les peptides antibactériens α 1-32 et α 137-141 afin de l'utiliser en emballage antibactérien.

III-1- Évaluation qualitative de l'activité antibactérienne du film polyéthylène basse densité fonctionnalisé par les peptides antibactériens α 1-32 ou α 137-141

Les essais préliminaires réalisés lors de cette étude ont pour objectif d'étudier la possibilité de l'utilisation des peptides antibactériens α 1-32 et α 137-141, issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine, pour fonctionnaliser des surfaces modèles utilisant comme matériau d'emballage le polyéthylène basse densité (PEBD) traité avec du plasma à froid avec le gaz Ar/O₂ comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes.

Les emballages actifs, en particulier les films d'emballages antimicrobiens est un concept innovant en emballage alimentaire, le développement des micro-organismes nuisibles à la surface des aliments est contrôlé grâce à l'application par enduction, à la surface d'un film à base de polyéthylène, d'une solution de peptides antibactériens α 1-32 et α 137-141 à une concentration de 19 mg.mL⁻¹.

La bio-activité de ces films requiert le relargage des molécules antimicrobiennes dans le milieu contenant les germes nuisible testés : *Listeria innocua* et *Salmonella enteridis*.

La détermination de l'activité antimicrobienne des films traités avec les peptides antibactériens α 1-32 et α 137-141 a été effectuée sur boîte de Petri sur milieu Mueller-Hinton glucosé inondée avec la suspension bactérienne : *Listeria innocua* ou *Salmonella enteridis*.

L'activité antimicrobienne est détectée par l'absence de croissance bactérienne sous le carré occupé par le film et ses contours comme le montre la photo 2.

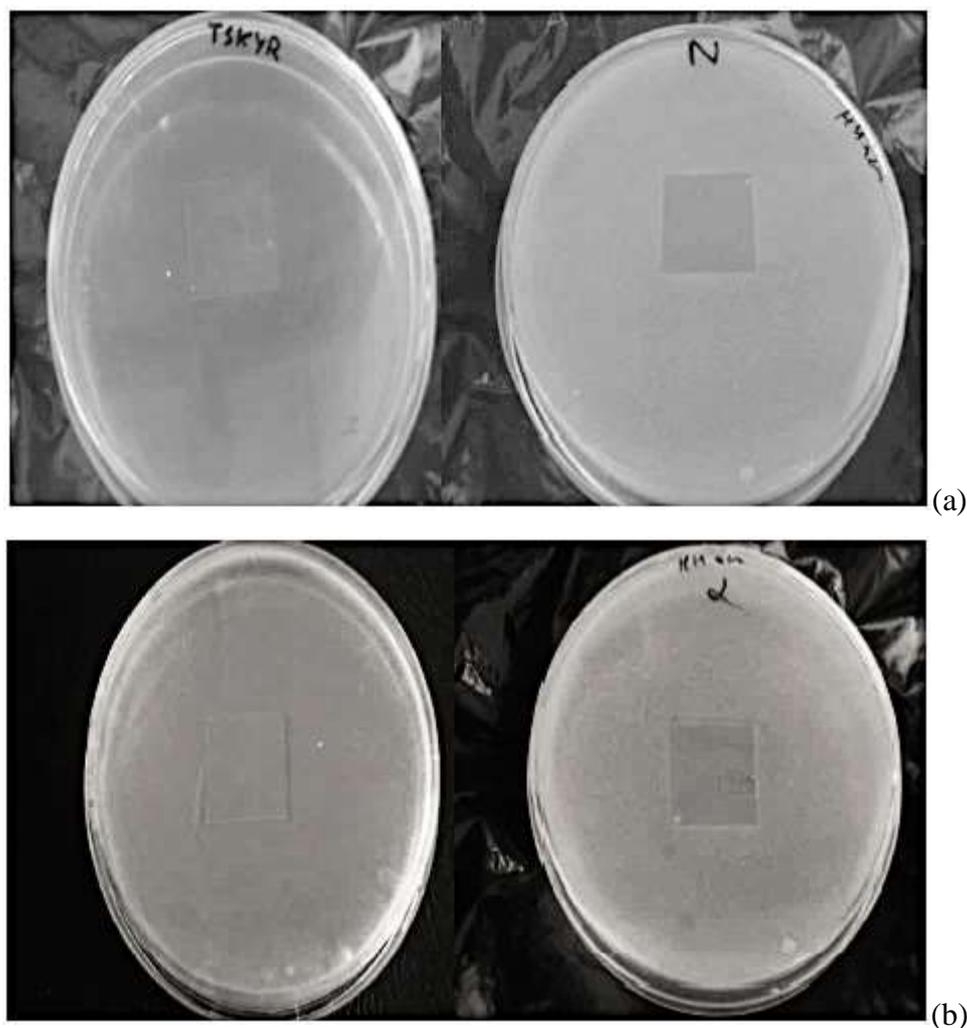


Photo 2: Activité des films fonctionnés par les peptides α 1-32 (a) et α 137-141 (b) sur *L.innocua* (à gauche) et *S. enteridis* (à droite)

Les essais antibactériens qualitatifs (photo 2) réalisés après adsorption des peptides antibactériens α 1-32 et α 137-141 sur PEBD contre *L. innocua* et *S. enteridis* montrent que ces films présentent une zone d'inhibition autour et sous les films fonctionnalisés par les peptides antibactériens étudiés. Ces résultats montrent que les peptides testés ont gardé leur

activité antimicrobienne vis-à-vis *Listeria innocua* et *Salmonella enteridis* après leur adsorption sur les films de PEBD.

III-2- Évaluation quantitative de l'activité antibactérienne du film polyéthylène basse densité fonctionnalisé par les peptides antibactériens α 1-32 ou α 137-141

Ce test a permis d'étudier l'évolution de la charge bactérienne au cours du temps en présence du film fonctionnalisé par un peptide antibactérien, mis en contact avec 50 mL du milieu MH contenant 250 μ L d'une suspension bactérienne de *Listeria innocua* à 10^9 UFC.mL⁻¹ le tout incubé sous agitation à température ambiante. Des prélèvements de 1 mL sont effectués dans chaque flacon dans un intervalle de temps de 5 et 30 min. Le dénombrement a été réalisé sur du milieu LB gélosé après des dilutions de 10^{-3} et 10^{-4} pour chaque prélèvement. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 29.

Tableau 29: Cinétique de l'activité antibactérienne du film polyéthylène basse densité fonctionnalisé par les peptides antibactériens α 1-32 et α 137-141 en milieu liquide sur *L.innocua*

Dilution	témoins (sans film)		Avec film α 137-141		Avec film α 1-32	
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-4}
Nombre de colonies T = 0 min	127	33	127	33	127	33
Nombre de colonies T = 5 min	134	36	72	9	100	15
Nombre de colonies T = 30 min	139	40	68	7	89	12

Le tableau 29 montre que le nombre de colonies diminue rapidement dans les boîtes contenant le prélèvement effectué dans le flacon contenant le film traité avec le peptide α 137-141, il passe de 33 colonies à t=0min à 9 colonies à t=5min, puis il se stabilise à t=30 min où il passe à 7 colonies. Le même effet est observé pour les boîtesensemencées avec la suspension prélevée dans le flacon contenant le film traité avec le peptide α 1-32, le nombre de colonies passe de 33 à t=0 min à 15 à t=5 min, puis 12 colonies à t=30 min.

Le témoin sans peptide manifeste une légère augmentation de la charge microbienne au cours de 30 min d'incubation, par contre le peptide α 137-141 montre une activité d'inhibition très importante vis-à-vis de *Listeria innocua*, avec un taux d'inhibition à $t = 5$ min égale à 72 %, et de 78 % à $t = 30$ min, alors que celui de α 1-32 est de 54 % à $t = 5$ min et de 36 % à $t = 30$ min.

Cela montre que l'application par enduction des peptides antibactériens α 1-32 et α 137-141 à la surface d'un film à base de polyéthylène traité par le plasma froid n'affecte pas son pouvoir antimicrobien vis-à-vis de *Listeria innocua*.

La fonctionnalisation des emballages par des agents antimicrobiens a fait l'objet de plusieurs publications (Vojdani et Torres, 1990 ; Han et Floros, 1998). Des composés actifs ont été incorporés aux polymères comme, les enzymes antimicrobiennes telles que la lactoperoxydase, les peptides antimicrobiens, les phénols comme les hydroquinones et la catéchine, les esters d'acide gras, les composés phénoliques antioxydants, les antibiotiques et les métaux comme le cuivre (Hotchkiss, 1997). Les bactériocines ont été également incorporées comme agents antimicrobiens dans les polymères. La plupart des études rapportées dans la littérature ont fait appel à la nisine pour sa disponibilité sur le marché (Cha et al., 2003; Sanjurjo et al., 2006; Karam et al., 2013).

Conclusion

Nous avons montré au cours de ce chapitre la relation structure fonction des peptides de deux familles antibactériennes issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine et la possibilité de les valoriser en emballage actif.

Cette étude a consisté à une mise en évidence du mode d'action du peptide α 1-32 et du peptide α 137-141 et ses dérivés (α 138-141 α 139-141) contre *Listeria innocua* par la détermination de la cinétique de potassium extracellulaire, qui est considéré comme un bon marqueur de la perméabilité de la membrane. On a pu ainsi démontrer que l'intensité de la fuite du potassium vers le milieu extracellulaire est en relation directe avec le type du peptide, son nombre d'acides aminés, et l'état des fonctions latérales (libres ou bloquées). En effet, l'action antibactérienne du peptide α 137-141 a augmenté en diminuant le nombre d'acides aminés jusqu'à atteindre le déterminant antibactérien minimal (α 139-141 : KYR). Pour obtenir une image plus claire de cette relation et l'importance de l'hydrophobie et

amphiphilicité du peptide sur le pouvoir antibactérien, nous avons choisi de travailler avec le peptide α 137-141 peptide dont les deux fonctions latérales libres et avec le N et / ou C - terminal bloqué. Le blocage de l'une ou des deux fonctions induit une perte partielle ou totale de son activité antimicrobienne. La néokyotorphine et ses deux peptides dérivés α 138-141 α 139-141 agissent au niveau de la membrane des bactéries ce qui provoque sa perméabilité au potassium par conséquent son inhibition. La néokyotorphine pour qu'elle soit active, il faut la présence de la tyrosine et que ses fonctions latérales N et C terminales soient libres.

Le mode d'action du peptide α 1-32 est différent de celui de la α 137-141, il n'agit probablement pas sur la membrane mais sur des cibles intracellulaires.

Les tests qualitatif et quantitatif de l'activité antibactérienne du film polyéthylène basse densité fonctionnalisé par les peptides antibactériens α 1-32 ou α 137-141 montrent que les deux peptides gardent leur activité contre *Listeria innocua* et *Staphylococcus aureus* après leurs adsorption sur des films en polyéthylène basse densité d'où l'intérêt de les utiliser comme emballages bioactifs pour la préservation des aliments contre le développement des bactéries pathogènes.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale

Dans ces travaux, la cinétique de l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 synthétisé a été étudiée à différentes températures (15°C, 23°C et 37°C), à différents pH (3,5 ; 4,5 et 5,5) et à différents rapports enzyme/substrat (1/50, 1/100 et 1/200). Les peptides intermédiaires et finaux ont été identifiés et leurs activités antibactériennes ont été évaluées contre quatre souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Salmonella enteritidis* et *Micrococcus luteus*. L'évolution de la concentration des peptides générés a permis de proposer un schéma réactionnel décrivant les réactions consécutives et parallèles qui ont lieu au cours de l'hydrolyse pepsique de ce peptide. Un modèle mathématique, par rapport au dispositif proposé, a été développé pour décrire la cinétique des peptides générés pendant l'hydrolyse du peptide α 1-32. Les constantes apparentes de vitesse des principales réactions ont été identifiées sur la base des données expérimentales, leur dépendance à la température été établie à l'aide des équations de type Arrhenius et leur dépendance au pH été établie à l'aide d'équation d'une droite.

La validation du modèle proposé a été effectuée par la comparaison des résultats prédits par modèle de la cinétique d'hydrolyse du peptide α 1-32 à une température donnée ou à pH donné avec les résultats expérimentaux, deux hydrolyses du peptide α 1-32, ont été effectuées une à 30°C (pH= 4,5 et E/S=1/100), et une à pH 5 (T=23°C et E/S=1/100). Les résultats trouvés ont pu confirmer la capacité du modèle proposé de prévoir la cinétique de l'hydrolyse du peptide α 1-32 synthétisé dans la plage de température de 15 à 37°C (un rapport enzyme/substrat 1/100 et à pH 4,5) et dans l'intervalle de pH entre 3,5 et 5,5 (un rapport enzyme/substrat 1/100 et à 23°C). Ce modèle mathématique peut permettre de définir les conditions optimales pour la production de divers peptides intermédiaires et finaux ayant une activité antibactérienne à partir de l'hydrolyse pepsique du peptide α 1-32 synthétisé.

Ce modèle a été ensuite généralisé sur deux familles de peptides antibactériens issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine purifiée ou à partir du cruor bovin: α 1-32 et α 107-141 après une étude de leurs schémas réactionnels et de leurs activités antibactériennes, un modèle mathématique décrivant la cinétique d'hydrolyse de chaque peptide a été établi et une très bonne corrélation entre les résultats expérimentaux et les prédictions du modèle a été observée.

Nous avons pu montrer dans ce travail que dans les conditions dénaturantes (urée 6M), l'hémoglobine bovine, purifiée ou à partir du cruor bovin, s'hydrolyse selon un mécanisme « Zipper », aboutissant ainsi à une forte population peptidique de nature variable.

Deux familles de ces peptides : α 107-141 et α 1-32, qui ont présenté une activité antibactérienne contre quatre souches bactériennes, ont pu être identifiées et caractérisées par CLHP et SM. Ainsi, on a pu déterminer les schémas réactionnels décrivant les réactions qui ont lieu au cours de l'hydrolyse pepsique de ces deux familles bactériennes à partir de l'hémoglobine bovine.

Un modèle mathématique basé sur le mécanisme proposé, a été développé pour décrire la cinétique de l'hydrolyse des peptides des familles α 107-141 et α 1-32 issus de l'hémoglobine ou du cruor.

Le calcul des énergies d'activation pour les différentes réactions impliquées dans le mécanisme était effectué grâce à l'équation d'Arrhenius qui a permis d'étudier l'effet de la température sur les différents coefficients cinétiques. L'effet du pH et du rapport E/S était également étudié et le modèle trouvé a démontré une augmentation linéaire de la vitesse d'hydrolyse en diminuant le pH (entre 3,5 et 5,5) et une vitesse invariable avec le rapport E/S. La validation du modèle a pu évaluer sa capacité à prévoir la cinétique de l'hydrolyse des peptides de la famille α 107-141 et de la famille α 1-32 issus de l'hémoglobine et du cruor bovins dans la plage de température de 15 à 37° C (un rapport enzyme/substrat 1/11 et à pH 4,5) et dans l'intervalle de pH entre 3,5 et 5,5 (un rapport enzyme/substrat 1/11 et à 23°C). Ce modèle mathématique permettra de définir les conditions optimales pour la production de divers peptides ayant une activité antibactérienne à partir de l'hydrolyse des peptides α 107-141 et α 1-32 issus de l'hémoglobine ou du cruor bovins.

Le modèle pourrait être généralisé à l'ensemble de peptides actifs issus de l'hydrolyse de l'hémoglobine et du cruor bovins, et de plus larges gammes de conditions expérimentales (température, pH et rapport enzyme/substrat), permettant d'estimer la production de peptides actifs sur la base de la quantité d'hémoglobine ou du cruor bovins utilisés, la prédiction de l'obtention d'un peptide ayant une activité biologique et des procédés établis pour la production de n'importe quel peptide actif.

L'étude structure-fonction des peptides antibactériens α 1-32 et α 107-141 a permis la compréhension du mode d'action de ces deux peptides au contact d'une bactérie de type *Listeria innocua* en étudiant la cinétique d'ion K^+ extracellulaire.

On a pu ainsi démontrer que l'intensité de la fuite du potassium vers le milieu extracellulaire est en relation directe avec le type du peptide, son nombre d'acides aminés, et l'état des fonctions latérales (libres ou bloquées). En effet, l'activité antibactérienne du peptide α 137-141 a augmenté en diminuant le nombre d'acides aminés jusqu'à atteindre le déterminant antibactérien minimal (α 139-141 : KYR). La néokyotorphine et ses deux peptides dérivés α 138-141 α 139-141 agissent au niveau de la membrane des bactéries ce qui provoque sa perméabilité au potassium par conséquent son inhibition. La néokyotorphine pour qu'elle soit active, il faut la présence de la tyrosine et que ses fonctions latérales N et C terminales soient libres. Le mode d'action du peptide α 1-32 est différent de celui de la α 137-141, il n'agit probablement pas sur la membrane mais sur des cibles intracellulaires.

Le procédé de fonctionnalisation d'un film polyéthylène basse densité, traité par le plasma froid, par des peptides antibactériens issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine a permis d'évaluer la possibilité de produire un emballage actif en utilisant ces peptides.

Perspectives

Les principales perspectives de recherche qui apparaissent à l'issue de cette thèse concernent la généralisation du modèle mathématique trouvé lors de ce travail sur l'ensemble des peptides actifs issus de l'hydrolyse pepsique de la chaîne α et β de l'hémoglobine bovine purifiée ou à partir d'un coproduit de l'abattoir : le cruor bovin ou sur d'autres sources protéiques. À cet effet, la réalisation d'une modélisation tenant compte des différents paramètres cinétiques (température, pH et ratio enzyme/substrat) dans une même équation pourrait être envisagée afin de mieux maîtriser ce modèle mathématique. On peut également envisager l'étude de l'effet d'autres facteurs sur l'hydrolyse comme la concentration en sel, les solvants...

En ce qui concerne l'activité antimicrobienne des films fonctionnalisés elle devra être vérifiée sur d'autres souches pathogènes telle que *Listeria monocytogenes* et validée sur des aliments réels, ainsi que dans les vraies conditions de stockage de l'industrie agro-alimentaire.

Il sera également intéressant d'étudier la possibilité de fonctionnaliser des films polyéthylène basse densité par des peptides antibactériens issus de l'hydrolyse de coproduit de l'abattoir (le cruor) afin de les utiliser en emballage actif pour les produits carnés et augmenter ainsi leur résistance aux attaques bactériennes et leur DLC (Date limite de consommation).

References bibliographiques

1. Aasen I. M., Markussen S., Moretro T., Katla T., Axelsson, L., Naterstad K. Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *Int J Food Microbiol.* 2003. 87(1-2), p 35-43.
2. Adler-Nissen J. Enzymatic hydrolysis of proteins in food. A-5901-GB, Novo-Nordisk A/S Novo Allé DK- 2880 Bagsvaerd. 1987.
3. Adler-Nissen J. Enzymatic hydrolysis of soy protein for nutritional fortification of low pH food. *Ann. Nutr. Aliment.* 1978. 32(2-3), p 205-216.
4. Altun G. D., Cetinus S. A. Immobilization of pepsin on chitosan beads. *Food Chemistry.* 2007.100(3), p964-971.
5. Andersson M., Boman A., Boman H. G. Ascaris nematodes from pig and human make three antibacterial peptides: isolation of cecropin P1 and two ASABF peptides. *Cell Mol Life Sci.* 2003. 60(3), p 599-606.
6. Andres E., Dimarcq J. L. Cationic antimicrobial peptides: from innate immunity study to drug development. Up date. *Med Mal Infect.* 2007. 37(4), 194-199.
7. Andreu D., Rivas L. Animal antimicrobial peptides: An overview. *Peptide Science.* 1998. 47(6), p 415-433.
8. Appendini P., Hotchkiss J. H. Review of antimicrobial food packaging. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2002. 3(2), p113-126.
9. Bachère E., Gueguen Y., Gonzalez M., de Lorgeril J., Garnier J., Romestand B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol Rev.* 2004.198, p 149-168.
10. Baek H. H., Cadwallader K. R. Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products. *J Food Sci.* 1995. 60(5), p 929-935.
11. Bakker E. P. Cell K⁺ and K⁺ transport systems in prokaryotes : Alkali Cation

Transport Systems in Prokaryotes. CRC Press, Boca Raton. 1993. p, 205-224.

12. 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, p 215-218.
13. Baumann G., Mueller P. A molecular model of membrane excitability. *J Supramol Struct.* 1974. 2(5-6), p 538–557.
14. Bechinger B., Kinder R., Helmle M., Vogt T. C., Harzer U., Schinzel S. Peptide structural analysis by solid-state NMR spectroscopy. *Biopolymers.* 1999. 51(3), p174-190.
15. Bechinger B., Lohner K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta.* 2006. 1758(9), p1529-1539.
16. Bechinger B., Zasloff M., Opella S. J. Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Sci.* 1993. 2(12), p 2077-2084.
17. Berkowitz B. A., Bevins C. L., Zasloff, M. A. Magainins: A new family of membrane-active host defense peptides. *Biochem Pharmacol.* 1990. 39(4), p 625-629.
18. Bernier D. Etude et modélisation de la cinétique orale de l'amoxicilline chez le porcelet sevré. Mémoire en vue de l'obtention du grade de Maître sciences (M.Sc.) en sciences vétérinaires. *Université de Montréal.* 2008. pp121.
19. Bessalle R., Haas H., Gorla A., Shalit I., Fridkin M. Augmentation of the antibacterial activity of magainin by positive-charge chain extension. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992. 36(2), p 313-317.
20. Blishchenko E. Y., Kalinina O. A., Sazonova O. V., Khaidukov S. V., Egorova N. S., Surovoy A. Y., Philippova M. M., Vass A. A., Karelin A. A., Ivanov V.T. Endogenous fragment of hemoglobin, neokytorphin, as cell growth factor. *Peptides.* 2001. 22(12), 1999-2008.
21. Blondelle S. E., Lohner K., Aguilar M. Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological

- specificity. *Biochim Biophys Acta*. 1999. 1462(1-2), p 89-108.
22. Boman H. G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med*. 2003. 254 (3), p 197-215.
 23. Boman H. G. Gene-Encoded Peptide Antibiotics and the Concept of Innate Immunity: An Update Review. *Scand J Immunol*. 1998. 48 (1), p 15-25.
 24. Boman H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol*. 1995. 13: 61-92.
 25. Boman H. G., Hultmark D. Cell-free immunity in insects. *Annu Rev Microbiol*. 1987. 41, p 103-126
 26. Breukink E., de Kruijff B. The lantibiotic nisin, a special case or not? *Biochim Biophys Acta*. 1999. 1462 (1-2), p 223–234.
 27. Brogden K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*. 2005. 3(3), p 238-250.
 28. Bulet P., Stöcklin R., Menin, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev*. 2004. 198, p169-184.
 29. Catiau L., Traisnel J., Delval-Dubois V., Chihib N. E., Guillochon D., Nedjar-Arroume N. Minimal antimicrobial peptidic sequence from hemoglobin alpha-chain: KYR. *Peptides*. 2011 a .32 (4), p 1463-1468.
 30. Catiau L., Traisnel J., Chihib N. E., Le Flem G., Blanpain A., Melnyk O., Guillochon D., Nedjar-Arroume N. RYH: a minimal peptidic sequence obtained from beta-chain hemoglobin exhibiting an antimicrobial activity. *Peptides*. 2011 b. 32(7), p 1463-1468.
 31. Cha D. S., Cooksey K., Chinnan M. S., Park H. J. Release of nisin from various heat-pressed and cast films. *LWT-food sci technol*. 2003. 36 (2), p 209-13.
 32. Chen F. Y., Lee M. T., Huang H.W. Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. *Biophys J*. 2003. 84(6), p 3751-3758.
 33. Chihib N. E., Crepin T., Delattre G., Tholozan J. L. Involvement of cell envelope in

nisin resistance of *Pectinatus frisingensis*, a Gram-negative, strictly anaerobic beer-spoilage bacterium. *FEMS Microbiology Letters*. 1999 c. 177, p 167-175.

34. Chihib N. E., Monnerat L., Membré J. M., Tholozan J. L. Nisin, temperature and pH modification effects on growth and viability of *Pectinatus frisingensis*, a Gram-negative, strictly anaerobic beer-spoilage bacterium. *Journal of Applied Microbiology*. 1999 b. 87, p 438-446.
35. Chihib N. E., Tholozan J. L. Effect of rapid cooling and acidic pH on cellular homeostasis of *Pectinatus frisingensis*, a strictly anaerobic beer-spoilage bacterium. *Int J Food Microbiol*. 1999a. 48 (3), p 191-202.
36. 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.
37. Coma V. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Sci*. 2008. 78(1-2), p90-103.
38. Constantinides A., Adu-Amankwa B. Enzymatic modification of vegetable protein: mechanism, kinetics, and production of soluble and partially soluble protein in a batch reactor. *Biotechnol. Bioeng*. 1980. 22(8), p 1543-1565.
39. Corbier C., Krier F., Mulliert G., Vitoux B., Revol-Junelles A. M. Biological activities and structural properties of the atypical bacteriocins mesenterocin 52b and leucocin b-ta33a. *Appl Environ Microbiol*. 2001. 67 (4), p 1418-1422.
40. 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.
41. Cudic M., Otvos L. Jr. L. Intracellular Targets of Antibacterial Peptides. *Curr Drug Targets*. 2002. 3(2), p 101-106.
42. Cuq B., Gontard N., Guilbert S. Edible films and coatings as active layers. In: M.L. Rooney (ed) *Active Food Packaging*. Blackie, Glasgow. 1995. pp 111-142.
43. Daffre S., Bulet P., Spisni A., Ehret-Sabatier L., Rodrigues E. G., Travassos L. R.

Bioactive natural peptides. *Studies in Natural Products Chemistry* . 2008. 35, p 597-691.

44. Dagan A., Efron L., Gaidukov L., Mor A., Ginsburg H. In vitro antiplasmodium effects of dermaseptin S4 derivatives. *Antimicrob Agents and Chemother.* 2002. 46(6), p1059-1066.
45. Dailloux S., Djelveh G., Peyron A., Oulion C. Rheological behavior of blood plasmas concentrated by ultrafiltration and by evaporation in relation to liquid-gel transition temperature. *J Food Eng.* 2002. 55, p 35-39.
46. Daoud R., Dubois V., Bors-Dodita L., Nedjar-Arroume N., Krier F., Chihib N. E., Mary P., Kouach M., Briand G., Guillochon D. New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin. *Peptides.* 2005. 26 (5), p 713-719.
47. 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(2-3), p 146-150.
48. 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 (1-2), p 71-87.
49. 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 letters* .1997. 403, p 208-212.
50. Delgado R., Castro A. J., Vazquez M. A Kinetic assessment of the enzymatic hydrolysis of potato (*Solanum tuberosum*). *LWT-Food Sci Technol.* 2009 .42 (4), p 797-804.
51. Devlieghere F., Vermeulen A., Debevere J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiol.* 2004. 21(6), p 703-714.
52. Diamant G., Beckloff N., Weinberg A., Kisich K.O. The roles of antimicrobial

peptides in innate host defense. *Curr Pharm Des.* 2009. 15(21), p 2377-2392.

53. Diniz F. M., Martin A. M. Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. *Int J Food Sci Technol.* 1996. 31(5), p 419-426.
54. Dubois V., Nedjar-Arroume N., Guillochon D. Influence of pH on the appearance of active peptides in the course of peptic hydrolysis of bovine haemoglobin. *Prep Biochem Biotechnol.* 2005. 35(2), p 85-102.
55. Ehrenstein G., Lecar H. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q Rev Biophys.* 1977. 10 (1), p 1-34.
56. Eisenberg D. Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. *Annu Rev Biochem .* 1984. 53, p 595-623.
57. Epstein W. Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev.* 1986. 39 (1-2), p 73-78.
58. Etienne O. Développement d'interfaces à propriétés antimicrobiennes par la fonctionnalisation de multicouches de polyélectrolytes. Thèses de doctorat, *Université Louis Pasteur. Strasbourg I.* 2004. pp 186.
59. Findrik Z., Presecki A. V., Vasić-Racki D. Mathematical modeling of maltose hydrolysis in different types of reactor. *Bioprocess Biosyst Eng .*2010. 33 (3), p 299-307.
60. Froidevaux R., Krier F., Nedjar-Arroume N., Vercaigne-Marko D., Kosciarz E., Ruckebusch C., Dhulster P., Guillochon D. Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. *FEBS Lett.* 2001. 491(1-2), p 159-163.
61. Ganz T., Lehrer R. I. Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol.* 1998. 10(1), p 41-44.
62. Gazit E., Miller I. R., Biggin P. C., Sansom M. S., Shaif, Y. Structure and Orientation of the Mammalian Antibacterial Peptide Cecropin P1 within Phospholipid Membranes. *J Mol Biol .* 1996. 258 (5), p 860-870.

63. Gennadios A., Hanna M. A., Kurth L. B. Application of edible coating on meats, poultry and seafoods: a review. *LWT-Food Sci Technol.* 1997. 30 (4), p 337-350.
64. Gennaro R., Zanetti M. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers.* 2000. 55(1), p 31-49.
65. Gil G., Herminia D., Juan C. P. Kinetic modelling of corncob autohydrolysis. *Process Biochem.* 2001. 36 (6), p 571-78.
66. 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), p169-79.
67. Goldberg S., Doyle R. J., Rosenberg M. Mechanism of enhancement of microbial cell hydrophobicity by cationic polymers. *J Bacteriol.* 1990. 172 (10), p 5650-5654.
68. Gómez-Juárez C., Castellanos R., Ponce-Noyola T., Calderón, V., Figueroa J. Protein recovery from slaughterhouse wastes. *Bioresour Technol.* 1999. 70, p 129-133.
69. Gontard N., Les emballages actifs, Handook, Edition Tec & Doc Lavoisier, Paris. 2000. p 1-243.
70. González-Tello P., Camacho F., Jurado E., Guadix E.M. A simple method for obtaining kinetic equations to describe the enzymatic hydrolysis of biopolymers. *J Chem Tech Biotechnol.* 1996. 67 (3), p 286-290.
71. González-Tello P., Camacho F., Jurado E., Páez M. P., Guadix E. M. Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kinetics models. *Biotechnol Bioeng.* 1994. 44(4), p 523-528.
72. Guérard F., Dufossé L., De La Broise D., Binet A. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *J. Mol. Cat. B: Enz.* 2001. 11(4-6), p 1051-1059.
73. Guerard F., Guimas L., Binet A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *J. Mol. Cat. B: Enz.* 2002. 19-20, p 489-498.
74. Guilbert S., Cuq B., *L'emballage des denrées alimentaires de grande consommation,*

Tec & Doc Lavoisier, Paris. 1998. p 472-531.

75. Hagelstein A. E., Hoover D. G., Paik J. S. Potential of antimicrobial nylon as a food package. *IFT Annual Meeting Book of Abstracts*. 1995. p 7-10.
76. Hale J. D., Hancock R. E. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007. 5(6), p 951-959.
77. Han J. H., Floros J. D. Potassium sorbate diffusivity in American processed and Mozzarella cheeses. *J Food Sci*. 1998. 63(3), p 435-437.
78. Hancock R. E. W., Chapple D. S. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999. 43(6), p 1317-1323.
79. Hancock R. E., Sahl H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new antiinfective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* . 2006. 24(12), p 1551-1557.
80. Hancock R. E., Scott M. G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000. 97(16), p 8856-8861.
81. Hardwick J. E., Glatz C. E. Enzymatic hydrolysis of corn gluten meal. *J Agric Food Chem*. 1989. 37(4), p 1188-1192.
82. He K., Ludtke S. J., Worcester D. L., Huang H. W. Neutron scattering in the plane of membranes: structure of alamethicin pores. *Biophys J*. 1996.70(6), p 2659-2666.
83. Hedhili K., Vauchel P., Dimitrov K., Kriaa K., Chataigne G., Hani K., Dhulster P., Nedjar-Arroume N. Mechanism and kinetics modeling of the enzymatic hydrolysis of α 1-32 antibacterial peptide. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2013. [Epub ahead of print].
84. Henning S., Metz R., Hammes W. P. New Aspects for the Application of Nisin to Food-Products Based on Its Mode of Action. *Int. J. Food Microbiol*. 1986. 3(3), p 135-141.
85. Hirsh D. J., Hammer J., Maloy W. L., Blazyk J., Schaefer J. Secondary structure and location of a magainin analogue in synthetic phospholipid bilayers. *Biochemistry* .1996. 35(39), p 12733-12741.

- 86.** Hoffmann J. A., Kafatos F. C., Janeway C. A., Ezekowitz R. A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*. 1999. 284(5418), p 1313-1318.
- 87.** Hotchkiss J. H. Food-packaging interactions influencing quality and safety. *Food Addit Contam* .1997. 14(6-7), p 601-607.
- 88.** Hotchkiss J. H. Safety considerations in active packaging. in: "Active Packaging." M. Rooney. ed. Blackie Academic & Professional. London. 1995. p. 238-255.
- 89.** Huang H. W. Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry*. 2000. 39(29), p 8347-8352.
- 90.** Huang H. W. Deformation free energy of bilayer membrane and its effect on gramicidin channel lifetime. *Biophys. J*. 1986. 50(6), p1061-1071
- 91.** Huang H. W. Elasticity of Lipid Bilayer Interaction with Amphiphilic Helical Peptides. *J. Phys II France*. 1995.5 (10), p 1427-1431.
- 92.** 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. *Biopoly*. 1997. 43(2), p 171-188.
- 93.** Jenssen H., Hamill P., Hancock R. E. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 2006. 19 (3), p 491-511.
- 94.** Jung D. S., Bodyfelt F. W., Daeschel M. A. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in Inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. *J Dairy Sci*. 1992. 75(2), p387-393.
- 95.** Karam L., Jama C., Mamede A. S., Fahs A., Louarn G., Dhulster P., Chihib N. E. Study of nisin adsorption on plasma-treated polymer surfaces for setting up materials with antibacterial properties . *React Funct Polym*. 2013. 73(11), p 1473-79.
- 96.** Katla T., Moretro T., Aasen I. M., Holck A., Axelsson L., Naterstad K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of sakacin P and/or live *Lactobacillus sakei* cultures. *Food Microbiol*. 2001. 18, p 431-439.
- 97.** Kristinsson H. G., Rasco B. A. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo*

salar) muscle proteins by alkaline proteases and visceral serine protease mixture. *Process Biochem.* 2000. 36(1-2), p 131-139.

98. Labuza T. P., Breene W. M. Applications of active packaging for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods. *J Food Process Pres.* 1989. 13(1), 1-69
99. Labuza T.P. An introduction to active packaging for foods. *Food Technol.* 1996. 50(4), p 68-71.
100. Lai Y., Gallo R. L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defenses. *Trends Immunol.* 2009. 30(3), p 131-41.
101. Lantz I., Glämsta E. L., Talbäck L., Nyberg F. Hemorphins derived from hemoglobin have an inhibitory action on angiotensin converting enzyme activity. *FEBS Letters.* 1991. 287(1-2), p 39-41.
102. Lebrun F., Bazus A., Dhulster P., Guillochon D. Solubility of heme in heme-iron enriched bovine haemoglobin hydrolysates. *J Agric Food Chem.* 1998. 46(12), p 5017-5025.
103. Liepke C., Baxmann S., Heine C., Breithaupt N., Standker L., Forssmann W. G. 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.
104. Lignot B., Froidevaux R., Nedjar-Arroume N., Guillochon D. Solvent effect on kinetics of appearance of neokytorphin VVh4 and a bradykinin-potentiating peptide in the course of peptic hydrolysis of bovine haemoglobin. *Biotechnol Appl Biochem.* 1999. 30(3), p 201-207.
105. Linder M., Fanni J., Parmentier M., Sergent M., Phan-Tan-Luu R. Protein recovery from veal bones by enzymatic hydrolysis. *J Food Sci.* 1995. 60(5), p 949-958.
106. Linderstrom-Lang K. the initial phases of the enzymatic degradation of proteins. *Bull Soc Chim Biol (Paris).* 1953. 35(1-2), p100-16.
107. 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(3), p 649-655.

108. Margot A., Flaschel E., Renken A. Empirical kinetic models for tryptic whey-protein hydrolysis. *Process Biochem.* 1997. 32 (3), p 217-223.
109. Márquez M. C., Vázquez M. A. Modeling of enzymatic protein hydrolysis. *Process Biochem.* 1999. 35(1-2), p 111-117.
110. Martinez-Araiza G., Castano-Tostado E., Amaya-Llano S. L., Regalado-Gonzalez C., Martinez-Vera C., Ozimek L. Modeling of enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Food Bioprocess Technol.* 2012. 5(6), p 2596-2601.
111. 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), 1-10.
112. Matsuzaki K., Harada M., Funakoshi S., Fujii N., Miyajima K. Physicochemical determinants for the interactions of magainins 1 and 2 with acidic lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta.* 1991. 1063(1), p 162-170.
113. Matsuzaki K., Murase O., Fujii N., Miyajima K. An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry.* 1996. 35(35), p 11361-11368.
114. Matsuzaki M., Sugishita K.I., Harada M., Fujii N., Miyajima K. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochem Biophys Acta* , 1997. 1327(1), p 119-130.
115. Ming X. T., Weber G. H., Ayres J. W., Sandine W. E. Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. *J Food Sci.* 1997. 62(2), p 413-415.
116. 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.
117. Moreno M. C. M., Cuadrado V. F. Enzymatic hydrolysis of vegetable proteins:

mechanism and kinetics. *Process Biochem.* 1993. 28(7), p 481-490.

118. Multon J. L., Bureau G. L'emballage des denrées alimentaires de grande consommation. Éditeur : Tech & Doc .1997. p 1120.
119. Nedjar-Arroume N., Dubois-Delval V., Adje E. Y., Traisnel J., Krier F., Mary P., Kouach M., Briand G., Guillochon D. Bovine hemoglobin: an attractive source of antibacterial peptides. *Peptides.* 2008. 29(6), p 969-977.
120. Nedjar-Arroume N., Dubois-Delval V., Miloudi K., Daoud R., Krier F., Kouach M., Briand G., Guillochon D. Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. *Peptides.* 2006. 27(9), p 2082-2089.
121. Nyberg F., Sanderson K., Glamsta E. L. The hemorphins: a new class of opioid peptides derived from the blood protein hemoglobin. *Biopolymers* .2001. 43(2), p 147-156.
122. Oren Z., Shai Y. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers.* 1998. 47(6), p 451-463.
123. Payne J. W., Jakes R., Hartley B. S. The primary structure of alamethicin. *Biochem J.* 1970. 117(4), p 757-766.
124. PBIL Database (Copyright 1998-2004) Institut de Biologie et Chimie des Proteines, Universite Claude Bernard Lyon1, France. <http://pbil.ibcp.fr>
125. Perutz M. F. Hemoglobin structure and respiratory transport. *Sci Am.* 1978. 239(6), p 92-125.
126. Peschel A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol.* 2002. 10(4), p 179-186.
127. Piot J. M., Zhao Q. Y., Guillochon D., Ricart G., Thomas D. Isolation and characterization of a bradykinin potentiating peptide from a bovine peptic hemoglobin hydrolysate. *FEBS Lett.* 1992. 299(1), p 75-79.
128. Piot J. M., Zhao Q., Guillochon D., Ricart G., Thomas D. Isolation and characterization of two opioid peptides from a bovine hemoglobin peptic hydrolysate.

Biochem Biophys Res Commun. 1992. 189(1),p 101-110.

- 129.** Pohl J., Dunn B. M. Secondary enzyme-substrate interactions: Kinetic evidence for ionic interactions between substrate side chains and the pepsin active site. *Biochemistry.* 1988. 27(13), p 4827-4834.
- 130.** Postolache C., Oncescu T. Kinetics of hemoglobin and casein hydrolysis catalyzed by alcalase. *Revue Roumaine de Chimie.* 1989. 34(2), p 581-584.
- 131.** Pouny Y., Rapaport D., Mor A., Nicolas P., Shai Y. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry.* 1992. 31(49), p 12416-12423.
- 132.** Powers J. P., Hancock R. E. The relationship between peptide structure and bacterial activity. *Peptides.* 2003. 24 (11), p 1681-1691.
- 133.** Raghuraman H., Chattopadhyay A. Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions. *Biosci Rep.* 2007. 27(4-5), p 189-223.
- 134.** Rapaport D., Shai Y. Interaction of fluorescently labeled pardaxin and its analogues with lipid bilayers. *J Biol Chem.* 1991. 266(35), p 23769-23775.
- 135.** Richey B., Cayley D. S., Mossing M. C., Kolka C., Anderson C. F., Farrar T. C., Record M. T. Jr. Variability of the intracellular ionic environment of *Escherichia coli*. Differences between in vitro and in vivo effects of ion concentrations on protein-DNA interactions and gene expression. *J Biol Chem.* 1987. 262(15), p 7157-7164.
- 136.** Roller S., Sagoo S., Board R., O'Mahony T., Caplice E., Fitzgerald G., Fogden M., Owen M., Fletcher H. Novel combinations of chitosan, carnocin and sulphite for the preservation of chilled pork sausages. *Meat Sci.* 2002. 62(2), p 165-177.
- 137.** Rooney M. L. Active Food Packaging, *Ed. Blackie Academic & Prof*, Glasgow, UK, 1995. p 260.
- 138.** Ross A. I., Griffiths M. W., Mittal G. S., Deeth H. C. Combining non thermal technologies to control foodborne microorganisms. *Int J Food Microbiol.* 2003. 89(2-3), p125-138.

139. Ruan C. Q., Chi Y. J., Zhang R. D. Kinetics of Hydrolysis of egg white protein by pepsin. *Czech J Food Sci.* 2010. 28 (5), p 355-363.
140. Ryle A. P. Pepsins, gastricsins and their zymogens. *Methods Enzym. Anal.* 1984. 3e Edition, p 228-238.
141. Sanjurjo K., Flores S., Gerschenson L., Jagus R. Study of the performance of nisin supported in edible films. *Food Res Int.* 2006. 39(6), p 749-754.
142. Sansom M. S. Structure and function of channel-forming peptaibols. *Q Rev Biophys.* 1993. 26(4), p 365-421.
143. Sasakawa S. Studies on hemoglobin. VI. Amino acid compositions of the fractionated bovine globin alpha and beta. *J. Biochem.* 1961. 50, p 345-351.
144. Schechter I., Berger A. On the size of active sites in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys. Res Commun.* 1967. 27(2), p 157-162.
145. Schlamowitz M., Peterson L. U. Studies on optimum pH for the action of pepsin on native and denatured bovine serum albumin and bovine hemoglobin. *J Biol Chem.* 1959. 239, p 3137-3145.
146. Sepulveda P., Marciniszun J. Jr., Liu D., Tang J. Primary Structure of Porcine Pepsin. III. Amino Acid Sequence of a Cyanogen Bromide Fragment, CB2A, and the Complete Structure of Porcine Pepsin. *J Biol Chem.* 1975. 250(13), p 5082-5088.
147. Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta.* 1999. 1462(1-2), p 55-70.
148. Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers.* 2002. 66(4), p 236-248.
149. Shai Y., Oren Z. From "carpet" mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides.* 2001. 22(10), p 1629-1641.
150. Shargel L., Wu-Pong S., Yu A. B. C. Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics 5th edition. États-Unis, *McGraw-Hill Medical.* 2004.

- 151.** Simpson B. K., Nayeri G., Vaylayan V., Ashie I. N. A. Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. *Food Chem.* 1998. 61(1-2), p 131-138.
- 152.** Smith J. P., Hosahalli S. R., Simpson B. K. Developments in food packaging technology. Part II. Storage aspects. *Trends in Food Sci Technol.* 1990. 1, p 111-118.
- 153.** Sousa R. Jr., Lopes G. P., Tardioli P. W., Giordano R. L. C., Almeida P. I. F., Giordano R. C. Kinetic model for whey protein hydrolysis by alcalase multipoint-immobilized on agarose gels particles. *Braz J Chem Eng.* 2004. 21(2), p 147-153.
- 154.** Svelter C. H. Enzymes activated by monovalent cations. *Science.* 1970. 168(3933), p 789-795.
- 155.** 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.
- 156.** Tanaka T., Yada, R. Y. N-terminal portion acts as an initiator of the inactivation of pepsin at neutral pH. *Protein Eng.* 2001. 14(9), p 669-674.
- 157.** Tang Y. Q., Yuan J., Osapay G., Osapay K., Tran D., Miller C. J., Ouellette A. J., Selsted M. E. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science.* 1999. 286(5439), p 498-502.
- 158.** Teixeira V., Feio M. J., Bastos M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progr Lipid Res.* 2012. 51(2), p149-177.
- 159.** The Antimicrobial Peptide Database (Copyright 2003-2013) Department of Pathology & Microbiology, University of Nebraska Medical Center, US.
<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>
- 160.** Toke O. Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers.* 2005. 80(6), p 717-735.
- 161.** Torres J. A., Motoki M., Karel M. Microbial stabilization of intermediate moisture food surfaces. 1. Control of surface preservative concentration. *J Food Process.* 1985. 9(2), p 75-92.

- 162.** Tossi A., Sandri L., Giangaspero A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 2000. 55(1), p 4-30.
- 163.** Ultée A., Slump R. A., Steging G., Smid E. J. Antimicrobial activity of carvacrol towards *Bacillus cereus* on rice. *J. Food Prot.* 2000. 63(5), p 620-624.
- 164.** Vaz Gomes A., de Waal A., Berden J. A., Westerhoff H.V. Electric potentiation, cooperativity, and synergism of magainin peptides in protein-free liposomes. *Biochemistry*. 1993. 32(20), p 5365-5372.
- 165.** 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. 31(2), p127-134.
- 166.** Vojdani F., Torres J. A. Potassium sorbate permeability of methylcellulose and hydroxypropyl methylcellulose coatings: Effect of fatty acids. *J. Food Sci.* 1990. 55 (3), p 841-846.
- 167.** Wang Z., Wang G. APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Res.* 2004. 32, D590-D592.
- 168.** Weng Y. M., Hotchkiss J. H. Inhibition of surface molds on cheese by polyethylene containing the antimycotic imazalil. *J Food Prot.* 1992. 55(5), p 367-369.
- 169.** Weng Y.M., Hotchkiss J. H. Anhydrides as antimycotic agents added polyethylene films for food packaging. *Packag Technol Sci.* 1993. 6(3), p 123-128.
- 170.** Wieprecht T., Dathe M., Beyermann M., Krause E., Maloy W. L. MacDonald D. L., Bienert M. Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes. *Biochemistry*. 1997. 36(20), p 6124-6132.
- 171.** Yaba Adje E., Balti R., Kouach M., Guillochon D., Nedjar-Arroume N. α 67-106 of bovine hemoglobin: a new family of antimicrobial and angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Eur Food Res Technol.* 2011 a. 232, p 637-646.
- 172.** Yaba Adje E., Balti R., Kouache M., Dhulster P., Guillochona D., Nedjar-Arroume N. Obtaining antimicrobial peptides by controlled peptic hydrolysis of bovine

hemoglobin. *Int J Biol Macromol*. 2011 b. 49 (2), p 143–153.

173. Yang L., Weiss T. M., Lehrer R. I., Huang H. W. Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophys J*. 2000. 79(4), p 2002-2009.
174. Yang, L., Harroun T. A., Weiss T. M., Ding L., Huang H.W. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys J* . 2001. 81(3), p 1475- 1485.
175. YE Z., Berson R. E. Kinetic modeling of cellulose hydrolysis with first order inactivation of adsorbed cellulase. *Bioresour Technol*. 2011. 102(24), p 11194-11199.
176. Yeaman M. R., Yount N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev*. 2003. 55(1), p 27-55
177. Zaiou M. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J MolMed*. 2007. 85(4), p 317-329.
178. Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J Leukoc Biol* . 2004. 75(1), p 39-48.
179. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002. 415(6870), p 389-395.
180. Zasloff, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987. 84(15), p 5449-5453.
181. Zhao Q., Piot J. M. Investigation of inhibition angiotensin-converting enzyme (ACE) 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. 31 (2), 147-153.
182. Zhao Q., Piot J. M., Gauthier V., Cottenceau G. Isolation and characterization of a bacteria growth stimulating peptide from a peptic bovine hemoglobin hydrolysate. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1996. 45(6), p778-784.
183. Zhao Y., Feng X., Watson J. C., Bottino P. J., Kung S. Molecular cloning and biochemical characterization of a receptor-like serine/threonine kinase from rice. *Plant*

Mol Biol. 1994. 26(3), p 791-803.

LISTE DES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Articles scientifiques

Hedhili K., Vauchel P., Dimitrov K., Kriaa K., Chataigne G., Hani K., Dhulster P., Nedjar-Arroume N. Mechanism and kinetics modeling of the enzymatic hydrolysis of α 1-32 antibacterial peptide. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2013. [Epub ahead of print] (Annexe 1).

Assaâd Sila, Naïma Nedjar-Arroume, **Karima Hedhili**, Gabrielle Chataigné, Rafik Balti, Moncef Nasri, Pascal Dhulster, Ali Bougatef. Antibacterial peptides from barbel muscle protein hydrolysates: Activity against some pathogenic bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, Volume 55, Issue 1, January 2014, Pages 183-188 (Annexe 2).

Compte-rendu Colloque

Laetitia Canabady-Rochelle, **Karima Hedhili**. Coordinateurs Romain Kapel, Pascal Dhulster. Colloque Adebitech/SFGP. Peptides issus des procédés d'hydrolyse : Filières Industrielles 2 et 3 Octobre 2012 Parc Biocitech, Romainville. France (Annexe 3).

Communications écrites ou orales

Hedhili K., Hani K., Kriaa K., Vauchel P., Dimitrov K., Dhulster P., Nedjar-Arroume N. Mécanisme et modélisation de l'hydrolyse enzymatique des peptides antibactériens issus de l'hémoglobine bovine. SFGP 2013-XIV^e Congrès de la Société Française de Génie des Procédés. 8-10 Octobre 2013. Lyon. France (Annexe 4).

Hedhili K., Hani K., Kriaa K., Vauchel P., Dimitrov K., Dhulster P., Nedjar-Arroume N. Valorization of bovine hemoglobin: a study of the kinetics of enzymatic hydrolysis production of antibacterial peptides. 9th European Congress of Chemical Engineering/2nd European Congress of Applied Biotechnology. 21-25 April 2013. The Hague, The Netherlands (Annexe 5).

Hedhili K., Hani K., Kriaa K., Vauchel P., Dimitrov K., Dhulster P., Nedjar-Arroume N. Voie de valorisation de l'hémoglobine bovine : modélisation de la cinétique enzymatique des peptides antimicrobiens. Colloque adebitech/SFGP : peptides issus des procédés d'hydrolyse : filières industrielles. 2-3 Octobre 2012. Paris, France (Annexe 6).

Hedhili K., Vauchel P., Dimitrov K., Kriaa K., Nikov I., Dhulster P., Nedjar-Arroume N. Mechanism and modeling of the enzymatic hydrolysis of α 1-32 peptide derived from bovine hemoglobin. 3rd International Symposium on Antimicrobial Peptides. AMP 2012. June, 13-15, 2012. Lille, France (Annexe 7).

Hedhili K., Kriaa K., Vauchel P., Dimitrov K., Nikov I., Dhulster P., Nedjar-Arroume N. La modélisation de la cinétique de l'hydrolyse enzymatique des peptides antibactériens de la famille α 1-32. 1^{er} Congrès national de la Recherche en IUT, 6-8 Juin 2012, Tours, France (Annexe 8).

Hedhili K., Kriaa K., Vauchel P., Dimitrov K., Nikov I., Dhulster P., Nedjar-Arroume N. Modélisation de cinétique enzymatique des peptides antimicrobiens. Journée UGÉPE Nord Pas-de-Calais, 31 Mai 2012. Roubaix, France (Annexe 9).

Nedjar-Arroume N., Kriaa K., **Hedhili K.**, Vauchel P., Dimitrov K., Nikov I., Dhulster P. Cinétique réactionnelle de l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine bovine. Congrès bisannuels de la Société Française de Génie des Procédés (SFGP). 29 Nov-01 Décembre 2011. Lille, France (Annexe 10).

ANNEXES

ANNEXE 1

Mechanism and kinetics modeling of the enzymatic hydrolysis of α 1–32 antibacterial peptide

K. Hedhili · P. Vauchel · K. Dimitrov ·
K. Kriaa · G. Chataigné · K. Hani ·
P. Dhulster · N. Nedjar-Arroume

Received: 4 June 2013 / Accepted: 22 November 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Several antibacterial peptides can be obtained by enzymatic hydrolysis of the α chain of bovine hemoglobin. The kinetics of α 1–32 peptide hydrolysis by pepsin was studied at several temperatures (15, 23 and 37 °C). Intermediate and final peptides were identified, and their antibacterial activity was assessed against four bacterial species. Evolution of generated peptides concentration enabled to propose a reaction pathway describing the parallel and consecutive reactions taking place during the hydrolysis. A mathematical model, based on the proposed mechanism, was developed to describe the kinetics of generated peptides during α 1–32 hydrolysis. The constants of the main reactions were identified based on the experimental data, and their dependence on temperature was established using Arrhenius-type equations. Validation of the proposed model was performed by predicting kinetics of α 1–32 peptide hydrolysis at 30 °C (all other experimental conditions being unchanged) with a good accuracy. This mathematical model could allow defining the optimal conditions for the production of various intermediate

peptides with antibacterial activity from peptic hydrolysis of α 1–32 peptide.

Keywords Enzymatic hydrolysis · Antibacterial peptide · Kinetics · Modeling

Introduction

Peptides with biological activities, such as analgesic [1], opioid [2], growth-stimulating [3], or antimicrobial [4] can be obtained by peptic hydrolysis from many proteins. Bovine hemoglobin is a protein of interest, as various active peptides can be obtained from it, such as opioids [5–7], bradykinin potentiator [8], coronar-constructor [5], heme solubilizer [9], hematopoietic [10], hypolipidemia effect [11], bacteria growth stimulator [3], antihypertensive activity [12] and antimicrobial activity [13–16]. Bovine hemoglobin hydrolysis has extensively been studied [10, 13, 14, 16, 17]. Thirty antibacterial peptides derived from the hydrolysis of hemoglobin were identified including 24 peptides derived from the α chains and six peptides derived from the β chains. These active peptides are classified into three families in the α chains, and into two families in the β chains: family α 1 derived from peptide α 1–32, family α 2 derived from peptide α 33–98, family α 3 derived from peptide α 107–141, and families β 1 and β 2 derived from peptides β 1–30 and β 114–145 respectively. Particularly, the family derived from α 1 to 32 peptide consists of antibacterial and non-toxic peptides that could be used to preserve meat products during their storage and distribution [16].

During the hydrolysis of hemoglobin, several parallel and consecutive reactions take place and the hydrolysis kinetics is very complex [17]. Several studies have led to the modeling of the hydrolysis of various substrates such as

K. Hedhili · P. Vauchel (✉) · K. Dimitrov · G. Chataigné ·
P. Dhulster · N. Nedjar-Arroume
Laboratoire ProBioGEM, EA 1026, Polytech'Lille, Université
Lille Nord de France, Avenue Paul Langevin,
59655 Villeneuve d'Ascq, France
e-mail: peggy.vauchel@polytech-lille.fr

K. Hedhili · K. Hani
Laboratory of Biochemistry (UR/08-45), Faculty of Medicine,
4002 Sousse, Tunisia

K. Kriaa
Unité de Recherche en Mécanique des Fluides Appliquée et
Modélisation, Groupe de Génie des Procédés Agro-alimentaires,
Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, BP 'W, 3038 Sfax,
Tunisia

Published online: 17 December 2013

 Springer

potato [18], cellulose [19], maltose [20] or corn cob [21], and the proposed models provided an interpretation of the experimental data, allowing the selection of optimized operational conditions. Mathematical models describing the enzymatic kinetics to find the optimal conditions to get peptides from proteins such as whey proteins [22] and egg white [23] have been proposed. Kinetics modeling of the enzymatic hydrolysis of bovine hemoglobin was proposed by Marquez et al. [24], who modeled the evolution of hydrolysis degree in time. To our knowledge, a model enabling to describe the evolution of concentrations of peptides during bovine hemoglobin hydrolysis was not proposed yet.

So, the general purpose of this work was to propose a model enabling to describe the evolution of concentrations of several peptides of interest during peptic hydrolysis of bovine hemoglobin, taking into account experimental conditions (temperature, pH, enzyme to substrate ratio). The present article corresponds to the first step of this global approach, by working on a less complex substrate than bovine hemoglobin. Hence, the objective of the present work was to propose a first simple model with $\alpha 1-32$ peptide as substrate, and taking into account variation of temperature. Such a model could be used to define optimal conditions to favor the production of a specific intermediate peptide exhibiting an interesting biological activity. Finally, the aims of this work were (1) to study the kinetics of the enzymatic hydrolysis of $\alpha 1-32$ peptide and the influence of temperature, and to establish the hydrolysis pathway, (2) to study the antibacterial activity of the $\alpha 1-32$ family peptides, and (3) to develop a mathematical model describing the kinetics of the $\alpha 1-32$ peptide hydrolysis, taking account temperature influence.

Materials and methods

Materials

All common chemicals and solvents were of analytical grade from commercial sources. $\alpha 1-32$ synthetic peptide and pig pepsin (3,200 units mg^{-1} protein) were purchased from Sigma Chemicals Co (St Louis, MO, USA). Acetonitrile was of HPLC grade. Water was obtained from a Millipore MilliQ system. All aqueous HPLC eluents were bubbled with Waters in line Degasser.

Peptic hydrolysis of $\alpha 1-32$ peptide

All enzymatic hydrolysis experiments were carried out in a closed and perfectly agitated double-walled reactor and the temperature was stabilized by circulating water bath (cryothermostat Thermo Fisher).

Alpha1-32 peptide solution (2 mL) was digested by pig pepsin (EC 3.4.23.1) with an enzyme substrate ratio of 1/100, in 0.1 M sodium acetate buffer to maintain pH at 4.5, and at temperatures of 15, 23, 30 or 37 °C. 100 μL samples were taken at different hydrolysis times ($t = 0$, 1 min, 2.5 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 10 h, 24 h, 28 h and 32 h) and the reaction was stopped by addition of 40 μL of disodium tetra borate (0.32 M, pH 12.7) to reach a pH of 10, as described previously [25, 26]. Samples were stored at -20 °C before further analysis.

Reverse-phase high-pressure liquid chromatography (RP-HPLC)

Reverse-phase high-pressure liquid chromatography analyses were used to determine the chromatographic profile of samples ($\alpha 1-32$ peptide hydrolysates) and quantify peptides in samples.

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 [6].

All of the chromatographic processes were performed on a Vydac C4 column (250 \times 3.2 mm i.d.). The mobile phase was water/trifluoroacetic acid (1,000:0.1, v/v) as eluent A and acetonitrile/water/trifluoroacetic acid (600:400:0.1, v/v) as eluent B. The flow rate was 0.6 mL min^{-1} . 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. Online UV absorbance scans were performed between 210 and 400 nm at a rate of one spectrum per second with a resolution of 1.2 nm [6].

Concentrations of peptides were expressed as percentages of the initial concentration of $\alpha 1-32$ peptide (at $t = 0$). These concentrations have been calculated on the basis of the area of each peptide peak on chromatograms, assuming that concentration of each peptide is directly linked to its peak area and that the sum of all peaks areas is constant in time and equals to $\alpha 1-32$ peptide peak area at $t = 0$:

$$\% \text{ peptide} = (\text{area of the peptide peak}) \times 100 / (\text{area of } \alpha 1-32 \text{ peak at } t = 0).$$

Peptide analysis by on-line LC-ESI-MS

LC-ESI-MS analyses were performed to identify peptides generated during $\alpha 1-32$ peptide hydrolysis by pepsin.

The analysis were performed on a Accela UHPLC system acquired from Fisher Scientific (Thermo Fisher

Scientific, Bremen, Germany) that consisted of an auto-sampler equipped with a column oven, a tray compartment cooler and a quaternary pump with a built-in solvent degasser, all piloted by Xcalibur software. The Accela UHPLC system was coupled with an Orbitrap mass spectrometry system (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) equipped to ESI ion source. Analyses were performed with the same analytical C4 column and with the same gradient as previously described for RP-HPLC ("Reverse-phase high-pressure liquid chromatography (RP-HPLC)"). A split was applied at 300 $\mu\text{L min}^{-1}$. The following ESI inlet conditions were used: nitrogen was used both as a sheath and auxiliary at arbitrary flow rates of 20 and 10 $\mu\text{L min}^{-1}$ respectively; the capillary temperature was set at 275 $^{\circ}\text{C}$; in the positive mode, the capillary voltage was set to 93.4 V, the source voltage to 3.3 kV and the source current to 0–8 μA ; spectra were recorded over the mass/charge range 400–2,000 m/z [6].

Biological activities: antimicrobial assay

The antibacterial activity of peptides was determined according to the method of Parish [28].

Antimicrobial assays were conducted for $\alpha 1$ –32 synthetic peptide (provided by Sigma), and for $\alpha 1$ –32, $\alpha 1$ –29, $\alpha 1$ –28, $\alpha 1$ –27 and $\alpha 1$ –23 peptides recovered thanks to isolation by RP-HPLC. Isolation of $\alpha 3$ –23, $\alpha 5$ –23, $\alpha 1$ –14, $\alpha 3$ –14 and $\alpha 5$ –14 peptides being too complex and enabling no sufficient amount of peptides recovery, antimicrobial assays were not carried out for those peptides.

Antibacterial activity was tested against four bacteria: two gram negatives (*Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*) and two gram positives (*Micrococcus luteus* and *Listeria innocua*). The four bacterial species were stored at -80°C in glycerol-containing nutrient broth and were subcultured twice in Mueller–Hinton (Biokar Diagnostics) at 37 $^{\circ}\text{C}$ under agitation (60 rpm).

The minimum inhibitory concentration (MIC) of all peptides was determined in triplicate in a microtiter plate assay system [15–17]. Each well of the microtiter plate contained 50 μL of onefold concentrated Mueller–Hinton broth inoculated with 2.10^6 CFU mL^{-1} and 50 μL of the peptide solution (from 1.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to 1.5 mg mL^{-1}) at serial twofold dilutions in 50 mM phosphate buffer (pH 7.5). As a control, bacterial strains were incubated as described above without peptide. The MIC was determined as the lowest concentration of the peptide that completely inhibited growth of bacterial species after 24 h of incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$.

Numerical tools for modeling

Model equations were fitted to experimental data to determine apparent rate constants values, with the

objective to minimize deviation between experimental and model kinetics. To characterize the deviation between experimental and model data, normalized root mean squared deviation (NRMSD) criteria was used:

$$\text{NRMSD} = \frac{\text{RMSD}}{\text{exp}_{\max}} = \frac{\sqrt{\frac{1}{n} \cdot \sum_{p=1}^n (\text{exp}_p - \text{mod}_p)^2}}{\text{exp}_{\max}} \quad (1)$$

where n is the number of experimental points composing a kinetics curve, i.e. 14 in the present study, exp_p is the experimental value at point p [$p = 1:n$], mod_p is the model value at point p and exp_{\max} is the maximum within the n experimental values.

Hence, values of apparent rate constants were determined using multi parameter estimation method with Newton algorithm, so as to minimize the mean NRMSD of all the five kinetics of the studied peptides (for a fixed temperature) at the same time.

Results and discussion

Kinetics of appearance of peptides derived from $\alpha 1$ –32 peptide

The first aim of this work was to study enzymatic hydrolysis kinetics of $\alpha 1$ –32 peptide in order to identify generated peptides and their kinetics of appearance, and finally to establish the reaction pathway. $\alpha 1$ –32 synthetic peptide hydrolysis by pepsin were performed for three different temperatures, namely at 15, 23 and 37 $^{\circ}\text{C}$, in 0.1 M sodium acetate buffer, with an enzyme to substrate ratio of 1/100, at pH 4.5, and for 32 h in order to generate a maximum of intermediate peptides of medium size. Samples of the hydrolysate were taken regularly and analyzed by RP-HPLC and LC-ESI-MS in order to identify and quantify the generated peptides.

Reverse-phase high-pressure liquid chromatography and LC-ESI-MS analysis were coupled so as to identify peaks corresponding to generated peptides during $\alpha 1$ –32 peptide hydrolysis, thanks to their molecular mass and retention time, and to be able to follow evolution in time of each of those peptides quantity.

Figure 1 shows an example of RP-HPLC chromatogram for one sample of hydrolysate, and an example of mass spectra for the peak corresponding to $\alpha 1$ –23 peptide. Relative molecular mass and retention time of each peptide are listed in Table 1.

Concentration of each peptide was calculated on the basis of the area of its peak on RP-HPLC chromatograms. According to Beer-Lambert law, molar absorptivity (ϵ) had to be taken into account in concentration calculation. Molar

Fig. 1 Example of RP-HPLC chromatogram for one hydrolysate sample and example of mass spectra corresponding to $\alpha 1$ –23 peptide peak (215 nm)

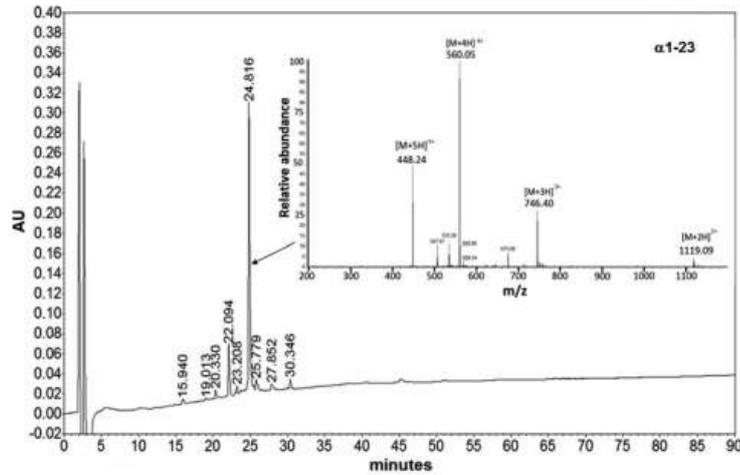


Table 1 Relative molecular mass and retention time of each peptide derived from $\alpha 1$ –32

Peptide	Mass [M + H] ⁺ (Da)	Number of amino acids	Retention time (min)	Molar extinction coefficient (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Amino acids sequence
$\alpha 1$ –32	3,257	32	29.82	279,900	VLSAADKGNV ¹⁰ KAAWGKVGGH ²⁰ AAEYGAEAL ³⁰ RM
$\alpha 1$ –29	2,840	29	27.78	258,900	VLSAADKGNV ¹⁰ KAAWGKVGGH ²⁰ AAEYGAEAL
$\alpha 1$ –28	2,727	28	25.38	251,900	VLSAADKGNV ¹⁰ KAAWGKVGGH ²⁰ AAEYGAEA
$\alpha 1$ –27	2,656	27	25.85	244,900	VLSAADKGNV ¹⁰ KAAWGKVGGH ²⁰ AAEYGAE
$\alpha 1$ –23	2,236	23	24.43	206,900	VLSAADKGNV ¹⁰ KAAWGKVGGH ²⁰ AAE
$\alpha 3$ –23	2,023	21	22.76	192,900	SAADKGNV ¹⁰ KAAWGKVGGH ²⁰ AAE
$\alpha 5$ –23	1,865	19	22.64	178,900	ADKGNV ¹⁰ KAAWGKVGGH ²⁰ AAE
$\alpha 1$ –14	1,429	14	21.22	138,000	VLSAADKGNV ¹⁰ KAAW
$\alpha 3$ –14	1,217	12	20.48	124,000	SAADKGNV ¹⁰ KAAW
$\alpha 5$ –14	1,059	10	20.23	110,000	ADKGNV ¹⁰ KAAW

absorptivity was estimated for each peptide according to Karnoup et al. [27]. Their values were specified in Table 1. It should be mentioned that molar absorptivity coefficient can normally be applied in the case pure solutions. In the present case, several peptides were present in samples, so that absorbance interferences might occur. This could induce some errors in concentration calculations. In fact, concentrations results were submitted to the whole analysis procedure variability (samples, chromatograms analysis, calculation of molar absorptivity etc.). Then, in order to homogenize their presentation and limit errors, it was chosen to normalize concentrations values. Hence, concentrations were expressed as percentages of the initial concentration of $\alpha 1$ –32 peptide (at $t = 0$), and normalization was applied so that the sum of all peptides

concentrations percentage was always equal to 100%. Finally, peptide concentrations were calculated as follows:

$$\text{peptide concentration (\%)} = \frac{100 \cdot A}{A_0 \cdot \epsilon \cdot l} \quad (2)$$

where A is the considered peptide peak area, A_0 is $\alpha 1$ –32 peptide peak area at $t = 0$, ϵ is the molar absorptivity of the considered peptide at 215 nm (M⁻¹ cm⁻¹) and l is the path length (1 cm in the present case).

Analysis of chromatograms at different times enabled to identify peptides disappearing and appearing during the hydrolysis of $\alpha 1$ –32 peptide. It was chosen to describe it below for hydrolysis carried out at 15 °C, as kinetics was slower in this case. The concentration of $\alpha 1$ –32 peptide in hydrolysate (29.82 min retention time) decreased before disappearing

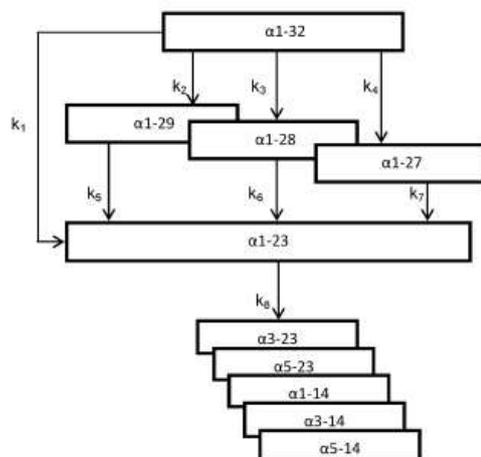


Fig. 2 Reaction pathway of $\alpha 1$ -32 peptide hydrolysis by pepsin (for the studied experimental conditions)

after 5 min of hydrolysis, which corresponded to the cleavage of this peptide by pepsin. In the meantime the concentration of $\alpha 1$ -29, $\alpha 1$ -28, $\alpha 1$ -27 and $\alpha 1$ -23 peptides increased in the hydrolysate up to 2.5 min for the three first peptides and 15 min for the last one, before decreasing. This suggested that $\alpha 1$ -29, $\alpha 1$ -28, $\alpha 1$ -27 and $\alpha 1$ -23 are intermediate peptides. The concentrations of $\alpha 3$ -23, $\alpha 5$ -23, $\alpha 1$ -14, $\alpha 3$ -14 and $\alpha 5$ -14 peptides increased in the hydrolysate during 32 h of hydrolysis. These peptides seemed to be final peptides.

All these results allowed determining the reaction pathway for $\alpha 1$ -32 peptide hydrolysis in the studied operating conditions (pepsin as enzyme, 1/100 enzyme to substrate ratio, pH 4.5, 15 °C). The established reaction pathway is described in Fig. 2. At first, hydrolysis of $\alpha 1$ -32 peptide generates four peptides, namely $\alpha 1$ -29, $\alpha 1$ -28, $\alpha 1$ -27 and $\alpha 1$ -23. Then, $\alpha 1$ -29, $\alpha 1$ -28 and $\alpha 1$ -27 peptides are cleaved to generate $\alpha 1$ -23 peptide, which himself generates $\alpha 3$ -23, $\alpha 5$ -23, $\alpha 1$ -14, $\alpha 3$ -14 and $\alpha 5$ -14 peptides.

It has to be specified that the analyses obtained by RP-HPLC and LC-ESI-MS for hydrolysis carried out at 23 and 37 °C (all other conditions being the same) confirmed the same reaction pathway as for 15 °C. Hence in the present case, temperature had no influence on the reaction pathway in the range 15–37 °C. Similar results were observed for kinetics of corn cob autohydrolysis [8].

Antibacterial activity of peptides derived from $\alpha 1$ to 32 peptide

According to a bioinformatics database [29] peptides derived from $\alpha 1$ to 32 present similarity of structures and

Table 2 Structural characteristics of the pure antibacterial peptides

Peptides	Percentage of hydrophobic residues (%)	Charge at pH 7	Prediction of secondary structure
$\alpha 1$ -32	46	+1	58 % helix α
$\alpha 1$ -29	48	+1	58 % helix α
$\alpha 1$ -28	46	+1	50 % helix α
$\alpha 1$ -27	44	+1	50 % helix α
$\alpha 1$ -23	47	+2	47 % helix α

Table 3 MIC values (μM) of antibacterial peptides from $\alpha 1$ -32 family (MIC was determined as the lowest concentration of the peptide that completely inhibited growth of bacterial species after 24 h of incubation at 37 °C)

Peptides	MIC (μM)			
	Gram (–) bacteria		Gram (+) bacteria	
	<i>S. enteritidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. innocua</i>	<i>M. luteus</i>
$\alpha 1$ -32	38	154	38	90
$\alpha 1$ -29	27	54	27	54
$\alpha 1$ -28	27	54	27	54
$\alpha 1$ -27	38	54	27	38
$\alpha 1$ -23	27	54	54	100

activities with peptides isolated from the frog skin [30]. Different mathematical models from another bioinformatics database [31] were used to study these pure antibacterial peptides structural characteristics. Table 2 presents the structural properties of the five studied antibacterial peptides. All active peptides have a positive charge at pH 7. These peptides have some characteristics of the reported antibacterial peptides [22, 32]. They 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 antibacterial activities of $\alpha 1$ -32 peptide and of four other peptides obtained after its hydrolysis were tested against four bacterial species: *S. enteritidis*, *E. coli*, *L. innocua* and *M. luteus*. Table 3 shows the minimum inhibitory concentration of $\alpha 1$ -32, $\alpha 1$ -29, $\alpha 1$ -28, $\alpha 1$ -27 and $\alpha 1$ -23 peptides against these bacterial species. These five peptides showed antibacterial activity against bacterial species tested. For each peptide tested at a concentration corresponding to the MIC, and whatever the bacterial species, cell population decreased by at least 97 % after 24 h incubation. Values of MIC obtained for the different peptides derived from synthetic peptide $\alpha 1$ -32 are in agreement with those obtained for the same peptides derived from bovine hemoglobin [16].

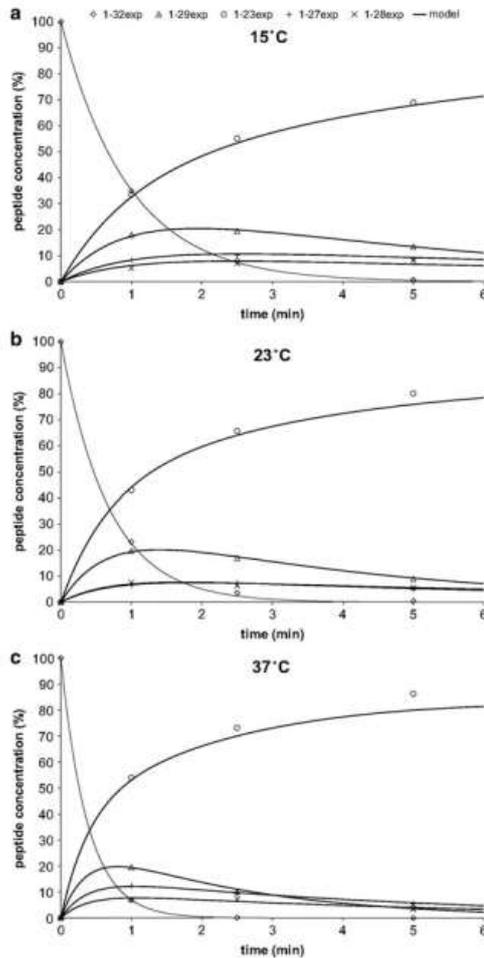


Fig. 3 Evolution of experimental and model concentration of generated peptides during $\alpha 1$ -32 peptic hydrolysis **a** at 15 °C, **b** at 23 °C and **c** at 37 °C

The four peptides derived from the hydrolysis of $\alpha 1$ -32 presented the same MIC against *E. coli* (54 μM), which was about three times lower than for the native peptide $\alpha 1$ -32 (154 μM) (Table 3). Peptides $\alpha 1$ -29, $\alpha 1$ -28 and particularly $\alpha 1$ -27 appeared more active against *M. luteus* (MIC of 54, 54 and 38 μM respectively) than the native peptide $\alpha 1$ -32 (MIC of 90 μM), whereas peptide $\alpha 1$ -23 was less efficient than the latter (MIC of 100 μM). The results obtained with tests against *S. enteritidis* and *L. innocua* were less striking. Peptides $\alpha 1$ -29, $\alpha 1$ -28 and $\alpha 1$ -23

seemed to be a little more active against *S. enteritidis* (MIC of 27 μM) than peptides $\alpha 1$ -32 and $\alpha 1$ -27 (MIC of 38 μM). Similar results were obtained against *L. innocua*, except for peptide $\alpha 1$ -23, which appeared as the less active within tested peptides (MIC of 54 μM).

So according to the targeted bacterial species, it would be interesting to stop the hydrolysis of peptide $\alpha 1$ -32 with the largest concentration of the peptide presenting the best activity against this bacterial specie. Then, the interest of modeling hydrolysis kinetics stands in predicting the time when hydrolysis should be stopped.

Modeling peptides concentration kinetics during the enzymatic hydrolysis of $\alpha 1$ -32 peptide

The kinetics of $\alpha 1$ -32 peptide hydrolysis by pepsin at different temperatures, namely 15, 23 and 37 °C, are presented in Fig. 3, with a focus on the first 6 min to better see the evolution of peptides concentrations. As expected, it clearly appeared that kinetics was accelerated while increasing temperature. As an example, $\alpha 1$ -32 peptide almost completely disappeared in about 5 min at 15 °C, 3 min at 23 °C and <2 min at 37 °C.

These experimental results were used to build a mathematical model describing concentration kinetics of peptides generated during the hydrolysis of $\alpha 1$ -32 peptides.

Protein hydrolysis being a complex phenomenon, formalization can lead to very complex models if simplifying assumptions are not made. The purpose of this work was to propose a model which could accurately describe $\alpha 1$ -32 peptide hydrolysis kinetics, and which would not be too complex, so as to facilitate its further utilization. Hence, some assumptions were made. It was assumed that the enzymatic reactions were irreversible. The effect of enzyme concentration was neglected, assuming that there was always available enzyme for carrying out hydrolysis of the substrate. Finally, first order reactions with apparent rate constants were assumed. The agitation was considered as perfect, the global rate of peptide appearance (disappearance) was considered as dependent of the enzymatic reactions only, neglecting mass transfer resistance. Since this was a hypothesis only, the rate constants were considered as apparent constants.

Based on these assumptions and on the reaction pathway established below (Fig. 2), the evolution of peptides concentrations in time was described according to the following system of differential equations:

$$\frac{d\alpha_{1-32}}{dt} = -(k_1 + k_2 + k_3 + k_4) \cdot \alpha_{1-32} \quad (3)$$

$$\frac{d\alpha_{1-29}}{dt} = k_2 \cdot \alpha_{1-32} - k_5 \cdot \alpha_{1-29} \quad (4)$$

Table 4 Values of apparent rate constants and Arrhenius equation parameters in function of temperature

	T (K)			Coefficient of determination (R ²)	Activation energy (J mol ⁻¹)
	288	296	310		
k1 (h ⁻¹)	28.73	45.89	75.37	0.986	32,015
k2 (h ⁻¹)	19.05	26.39	45.32	0.999	29,253
k3 (h ⁻¹)	6.36	8.80	15.04	0.999	29,058
k4 (h ⁻¹)	8.45	8.32	24.16	0.849	37,633
k5 (h ⁻¹)	12.21	16.22	26.90	0.999	26,743
k6 (h ⁻¹)	6.07	8.69	10.97	0.935	19,269
k7 (h ⁻¹)	5.49	7.08	12.37	0.994	27,705
k8 (h ⁻¹)	0.54	0.80	1.24	0.987	27,705

$$\frac{dx_{1-28}}{dt} = k_3 \cdot \alpha_{1-32} - k_6 \cdot \alpha_{1-28} \tag{5}$$

$$\frac{dx_{1-27}}{dt} = k_4 \cdot \alpha_{1-32} - k_7 \cdot \alpha_{1-27} \tag{6}$$

$$\frac{dx_{1-23}}{dt} = k_1 \cdot \alpha_{1-32} + k_5 \cdot \alpha_{1-29} + k_6 \cdot \alpha_{1-28} + k_7 \cdot \alpha_{1-27} - k_8 \cdot \alpha_{1-23} \tag{7}$$

Values of apparent rate constants (k₁–k₈) were determined thanks to experimental data, by minimizing the average normalized root mean square deviation between experimental and model data (see details in “Numerical tools for modeling”). The results for apparent rate constants values are given in Table 4. Both experimental and model data for α1–32 peptides family concentration kinetics are presented in Fig. 3, for the three different temperatures tested. Experimental results and model predictions were in good agreement, for all temperatures, with an average

NRMSD of 4.1 % (4.4, 3.9 and 4.0 % for 15, 23 and 37 °C respectively). Hence, the proposed model appeared as relevant to describe α1–32 peptides family concentration kinetics (for the tested operating conditions). It seemed that, at these conditions, the hypothesis for first order kinetics (assuming that the enzyme was always available) was validated.

The dependence of apparent rate constants on temperature has been established by means of the classical Arrhenius equation:

$$k = F \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} \tag{8}$$

where *k* is the apparent rate constant (s⁻¹ or h⁻¹), *F* is the exponential factor (s⁻¹ or h⁻¹), *E_a* is the activation energy (J mol⁻¹), *R* is the universal gas constant (J mol⁻¹ K⁻¹), and *T* is the temperature (K).

Linearization of Arrhenius equation was performed so as to determine exponential factor and activation energy values. Figure 4 shows the linear interrelationships found between the logarithm of apparent rate constants (ln(*k*)) and the inverse of temperature (1/*T*). Values obtained for activation energies and coefficients of determination (R²) are given in Table 4. Considering R² values, it appeared that values of apparent rate constants obtained from the model respected temperature dependence according to the classical Arrhenius equation.

To perform validation of the model and verify its prediction ability, it would have been interesting to use reference experimental data from the literature. But the model being defined for specific conditions, i.e. for hydrolysis carried out on α1–32 peptide with pepsin, at pH 4.5, with an enzyme to substrate ratio of 1/100 and for temperatures in the range 15–37 °C, this would mean finding in the

Fig. 4 Linearization of Arrhenius equation

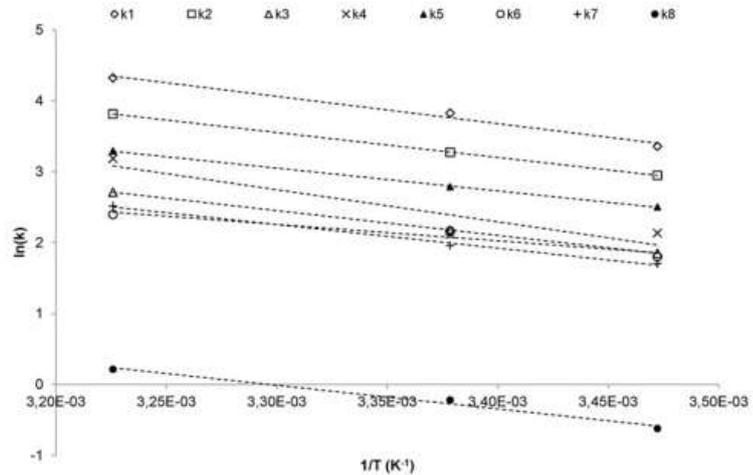
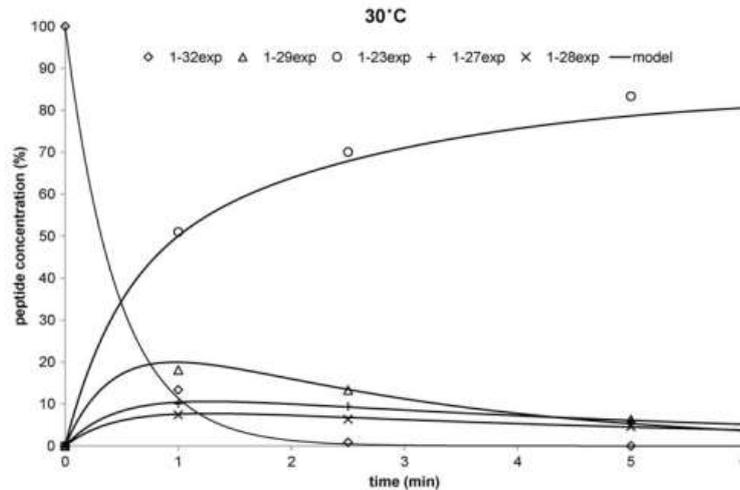


Fig. 5 Comparison of predicted and experimental kinetics of generated peptides during $\alpha 1$ -32 hydrolysis at 30 °C (with an enzyme to substrate ratio of 1/100, at pH 4.5)



literature data corresponding to these conditions. To our knowledge, only Marquez et al. [24] have published data on kinetics of bovine hemoglobin hydrolysis by pepsin. However, their data presented only the evolution of degree of hydrolysis (no data for the kinetics of each peptide). That's why validation of the proposed model was conducted using data generated at a different temperature, i.e. 30 °C.

As shown in Fig. 5, model predictions and experimental data were in good agreement (NRMSD = 3.2 %). This validation confirmed that the proposed model is able to predict the evolution of the concentrations of the studied peptides during $\alpha 1$ -32 hydrolysis at a given temperature in the range 15–37 °C (for the studied experimental conditions, i.e. 1/100 enzyme to substrate ratio and pH 4.5).

Conclusion

Peptic hydrolysis of $\alpha 1$ -32 peptide allowed obtaining intermediate peptides, which presented antibacterial activity against four bacterial species. Identification of the intermediate and final peptides allowed to propose a reaction pathway describing the parallel and consecutive reactions taking place during the hydrolysis. A mathematical model based on the proposed mechanism, was developed to describe the kinetics of peptides hydrolysis of the $\alpha 1$ -32 family. The influence of temperature on the kinetic coefficients was interpreted by means of the Arrhenius equation, allowing the calculation of activation energies for the several reactions involved in the mechanism. Validation of the

model assessed the proposed model ability to predict kinetics of $\alpha 1$ -32 hydrolysis in the temperature range 15–37 °C (for the studied experimental conditions, i.e. 1/100 enzyme to substrate ration and pH 4.5).

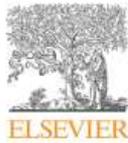
This mathematical model could allow defining the optimal conditions for the production of various intermediate peptides with antibacterial activity from peptic hydrolysis of synthetic peptide $\alpha 1$ -32. The model could be generalized to the entire assets of bovine hemoglobin and cruor peptides, and to wider ranges of experimental conditions (pH and enzyme to substrate ratio), allowing estimation of the production of active peptides based on the amount of hemoglobin, the prediction of obtaining peptide having biological activity and of established methods for the production of any active peptide.

References

1. Takagi H, Shiomi H, Hayashi K, Kiso Y, Kitagawa K (1982) Isolation of a novel analgesic pentapeptide, neo-kyotorphin, from bovine brain. *Life Sci* 31:6–1733
2. Nyberg F, Sanderson K, Glamsta EL (2001) The hemorphins: a new class of opioid peptides derived from the blood protein haemoglobin. *Biopoly* 43:56–147
3. Zhao Q, Piot JM, Gauthier V, Cottenceau G (1996) Isolation and characterization of a bacteria growth stimulating peptide from a peptic bovine hemoglobin hydrolysate. *Appl Microbiol Biotechnol* 45:84–778
4. Liepke C, Baxmann S, Heine C, Breithaupt N, Standker L, Forssmann WG (2003) Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity: a class of host defense peptides. *J Chromatogr B* 791:56–345
5. Barkhudaryan N, Kellermann J, Galoyan A, Lottspeich F (1993) High molecular weight aspartic endopeptidase generates a

- coronaro-constrictory peptide from the beta-chain of hemoglobin. *FEBS Lett* 329:8–215
6. Lignot B, Froidevaux R, Nedjar-Arroume N, Guillochon D (1999) Solvent effect on kinetics of appearance of neokytorphin VVh4 and a bradykinin-potentiating peptide in the course of peptic hydrolysis of bovine haemoglobin. *Biotechnol Appl Biochem* 30:7–201
 7. Zhao Q, Piot JM (1997) Investigation of inhibition angiotensin-converting enzyme (ACE) activity and opioid activity of two hemorphins, LVV-hemorphin-5 and VV-hemorphin-5, isolated from a defined peptic hydrolysate of bovine hemoglobin. *Neuropeptides* 2:147–153
 8. Piot JM, Zhao QY, Guillochon D, Ricart G, Thomas D (1992) Isolation and characterization of a bradykinin potentiating peptide from a bovine peptic hemoglobin hydrolysate. *FEBS Lett* 299:75–79
 9. Lebrun F, Bazus A, Dhulster P, Guillochon D (1998) Solubility of heme in heme-iron enriched bovine haemoglobin hydrolysates. *J Agric Food Chem* 46:25–5017
 10. Vercaigne-Marko D, Kosciarz E, Nedjar-Arroume N, Guillochon D (2000) 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* 2:34–127
 11. Kagawa K, Matsutaka H, Fukuhama C, Fujino H, Okuda H (1998) Suppressive effect of globin digests on postprandial hyperlipidemia in male volunteers. *J Nutr* 128:56–60
 12. Yaba Adjé E, Balti R, Kouach M, Guillochon D, Nedjar-Arroume N (2011) α 67–106 of bovine hemoglobin: a new family of antimicrobial and angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Eur Food Res Technol* 232:46–637
 13. Choisnard L, Froidevaux R, Nedjar-Arroume N, Lignot B, Vercaigne-Marko D, Krier F (2002) Kinetic study of the appearance of an anti-bacterial peptide in the course of bovine haemoglobin peptic hydrolysis. *Biotechnol Appl Biochem* 36:94–187
 14. Daoud R, Dubois V, Bors-Dodita L, Nedjar-Arroume N, Krier F, Chihib N (2005) New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin. *Peptides* 26:19–713
 15. Froidevaux R, Krier F, Nedjar-Arroume N, Vercaigne-Marko D, Kosciarz E, Ruckebusch C (2001) Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. *FEBS Lett* 491:63–159
 16. Nedjar-Arroume N, Dubois-Delval V, Adje EY, Traisnel J, Krier F, Mary P, Kouach M, Briand G, Guillochon D (2008) Bovine hemoglobin: an attractive source of antibacterial peptides. *Peptides* 29:77–969
 17. Nedjar-Arroume N, Dubois-Delval V, Miloudi K, Daoud R, Krier F, Kouach M, Briand G, Guillochon D (2006) Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. *Peptides* 27:89–2082
 18. Delgado R, Castro AJ, Vázquez M (2009) A kinetic assessment of the enzymatic hydrolysis of potato (*Solanum tuberosum*). *LWT-Food Sci Technol* 42:04–797
 19. Zhuoliang YE, Eric Berson R (2011) Kinetic modeling of cellulose hydrolysis with first order inactivation of adsorbed cellulose. *J Biore Technol* 102:11194–11199
 20. Findrik Z, Presecki AV, Vasić-Racki D (2010) Mathematical modeling of maltose hydrolysis in different types of reactor. *Bioprocess Biosyst Eng* 33:299–307
 21. Gil G, Herminia D, Juan CP (2001) Kinetic modelling of corncob autohydrolysis. *Process Biochem* 36:78–571
 22. Martínez-Araiza G, Castaño-Tostado E, Amaya-Llano SL, Regalado-González C, Martínez-Vera C, Ozimek L (2012) Modeling of enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Food Bioprocess Technol* 5:2596–2601
 23. Ruan CQ, Chi YJ, Zhang RD (2010) Kinetics of hydrolysis of egg white protein by pepsin. *Czech J Food Sci* 28(5):63–355
 24. Márquez MC, Vázquez MA (1999) Modeling of enzymatic protein hydrolysis. *Process Biochem* 35:17–111
 25. Adler-Nissen J (1979) Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by tribzenesulfonic acid. *J Agric Food Chem* 27:62–1256
 26. Nielsen PM, Peterson D, Dambmann C (2001) Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J Food Sci* 66:46–642
 27. Karnouf AS, Turkelson V, Anderson WHK (2005) O linked glycosylation in maize expressed human IgA1. *Glycobiology* 15:81–965
 28. Parish CA, Jiang H, Tokiwa Y, Berova N, Nakanishi K, McCabe D (2001) Broad-spectrum antimicrobial activity of haemoglobin. *Bioorg Med Chem* 9:82–377
 29. The Antimicrobial Peptide Database (Copyright 2003–2013) Department of Pathology and Microbiology, University of Nebraska Medical Center, US. <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>
 30. Amiche M, Ladram A, Nicolas P (2008) A consistent nomenclature of antimicrobial peptides isolated from frogs of the subfamily Phyllomedusinae. *Peptides* 11:82–2074
 31. PBIL Database (Copyright 1998–2004) Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Université Claude Bernard Lyon1, France. <http://pbil.ibcp.fr>
 32. Powers JPS, Hancock REW (2003) The relationship between peptide structure and bacterial activity. *Peptides* 24:91–1681

ANNEXE 2



Antibacterial peptides from barbel muscle protein hydrolysates: Activity against some pathogenic bacteria



Assaad Sila^{a,b,*}, Naima Nedjar-Arroume^b, Karima Hedhili^b, Gabrielle Chataigné^b, Rafik Balti^c, Moncef Nasri^d, Pascal Dhulster^b, Ali Bougatef^e

^aUnité Enzymes et Bioconversion, Ecole nationale d'Ingénieurs, PB 1173, Sfax 3038, Tunisia

^bLaboratoire de Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien, IUT A Lille 1, BP 179, Villeneuve d'Ascq Cedex 59653, France

^cInstitut Supérieur de Biologie Appliquée, Médénine 4119, Tunisia

^dLaboratoire de Génie enzymatique et de Microbiologie, Ecole nationale d'Ingénieurs, PB 1173, Sfax 3038, Tunisia

^eInstitut Supérieur de Biotechnologie de Sfax, BP 1175, Sfax 3038, Tunisia

ARTICLE INFO

Article history:
Received 13 February 2013
Received in revised form
20 June 2013
Accepted 27 July 2013

Keywords:
Barbus callensis
Protein hydrolysates
Purification
Identification
Antibacterial peptides

ABSTRACT

Peptides obtained by enzymatic hydrolysis of fish proteins exhibit not only nutritional but also biological properties of dietary uses, or even therapeutic potential. The objective of the present study was to isolate and characterize peptides from the protein hydrolysates of barbel muscle with antibacterial activity against Gram-positive (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* and *Bacillus cereus*) and Gram-negative (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* sp.) bacteria. Barbel muscle protein hydrolysates (BMPHs), obtained by treatment with Alcalase[®] (DH = 6.6%), was fractionated by size exclusion chromatography on a Sephadex G-25 and purified by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The molecular masses and amino acid sequences of these peptides were determined using ESI-MS and ESI-MS/MS, respectively. Eleven peptides in F_{II-1}, F_{II-2}, F_{II-3} and F_{II-4} sub-fractions separated by RP-HPLC were identified. The most active peptide fraction (F_{II-3}) contained three peptides: Ala-Ala-Ala-Leu; Ala-Ala-Gly-Gly-Val and Ala-Ala-Val-Lys-Met.

These peptides don't show hemolytic activity towards bovine erythrocytes. These results suggest that some peptides from barbel could be a beneficial ingredient for nutraceuticals.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Antimicrobial peptides (AMPs) are important components of the innate immune systems of countless animal species, where they act as an effective, largely non-discriminatory first line of defense against invading pathogens (Brogden, 2005; Jenssen, Hamill, & Hancock, 2006; Yeaman & Yount, 2003). Spurred by the proliferation of bacterial strains that exhibit resistance to conventional antibiotics, the last two decades have seen a flurry of research activities aimed at developing novel therapeutic antibiotics based on AMPs.

The natural AMPs have been isolated and characterized from practically all-living organisms, ranging from prokaryotes to humans. The AMPs produced by bacteria are also termed 'bacteriocins' (Boulanger, Bulet, & Lowenberger, 2006; Brogden, 2005).

AMPs usually work against bacteria that are closely related to the producer strains in prokaryotes, while they play a key role in innate immunity in eukaryotes. These peptides are produced by several species including bacteria, insects, plants, vertebrates and they have been recognized as ancient evolutionary molecules that have been effectively preserved in mammals (Altincicek, Linder, Linder, Preissner, & Vilcinskis, 2007; Konno et al., 2007). The significant advantage of AMPs resides in the global mechanism of their action, which is remarkably different from that of conventional antibiotics. Usage of AMPs will gain widespread increase since more and more bacteria may develop the ability to resist conventional antibiotics due to the abuse of these drugs worldwide. Since the first AMP Cecropin was discovered from *Hyalophora cecropia* in the 1980s by Boman's research group, a large number of antimicrobial peptides, which share common features such as relatively low molecular weight, positive charge and inducibility by injury and microorganism infection, have been identified (Steiner, Hultmark, Engstrom, Bennich, & Boman, 1981).

Since the nineties, several peptides with antibacterial activities against Gram-positive and Gram-negative bacteria were identified

* Corresponding author. Unité Enzymes et Bioconversion, Ecole nationale d'Ingénieurs, PB 1173, Sfax 3038, Tunisia. Tel.: +216 97 013 118; Fax: +216 74 275 595. E-mail address: assaadsila@gmail.com (A. Sila).

and isolated in protein hydrolysates. The nature of these proteins is very diverse and includes casein (Zucht, Raida, Adermann, Mägert, & Forssmann, 1995), ovotransferrin (Ibrahim, Iwamori, Sugimoto, & Aoki, 1998), lactoferrin (Bellamy et al., 1992), and β -lactoglobulin (Pellegrini, Dettling, Thomas, & Hunziker, 2001). While the majority of antibacterial peptides, produced by enzymatic hydrolysis of proteins, were isolated from milk proteins (Pellegrini, 2003). Several studies have reported the obtaining of antibacterial peptides by enzymatic hydrolysis of hemoglobin (Yaba Adje et al., 2011). Antibacterial peptides derived from marine organisms by enzymatic treatment have been isolated (Abidi et al., 2013; Beaulieu, Thibodeau, Bonnet, Bryl, & Carbonneau, in press; Doyena, Saucier, Beaulieu, Pouliot, & Bazinet, 2012).

The barbel, *Barbus callensis*, is a group of small carp-like fish of the genus *Barbus* that has a wide distribution in northern and central Tunisia.

As far as we know, no studies have analysed the antibacterial activity of barbel protein hydrolysates in vitro and in vivo. In this study, we investigated the antibacterial activity of barbel muscle protein hydrolysates obtained by treatment with Alcalase[®]. The amino acid sequences of peptides in most active sub-fractions were determined.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Common chemicals and solvents of analytical grade were obtained from different commercial sources. Alcalase[®] 2.4 L serine-protease from *Bacillus licheniformis* was supplied by Novozymes[®] (Bagsvaerd, Denmark). Sephadex G-25 was purchased from Pharmacia (Uppsala, Sweden). Water was obtained from a Culligan system; the resistivity was approximately 18 M Ω . All other chemicals and reagents used were of analytical grade.

2.2. Enzyme

The serine protease from *B. licheniformis* (Novozymes[®]) was used for the production of hydrolysates. Protease activity was determined according to the method of Kembhavi, Kulkarni, and Pant (1993) using casein as a substrate. One unit of protease activity was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 μ g of tyrosine per minute under the experimental conditions used.

2.3. Sample preparation

The barbel (*B. callensis*) samples used in the present work were obtained from Barrage SIDI SAAD, Kairouan, Tunisia. The samples were packed in polyethylene bags, placed in ice (sample/ice ratio of about 1:3 (w/w)), and transported to the laboratory within 2 h after collection. The internal organs were separated and then stored in sealed plastic bags at -20°C .

2.4. Preparation of barbel muscle protein hydrolysates (BMPHs)

Barbel muscle (500 g), in 500 ml distilled water, was first minced using a grinder (Moulinex Charlotte HV3, France) then cooked at 90°C for 5 min to inactivate endogenous enzymes. The cooked muscle sample was then homogenised in a Moulinex[®] blender for about 2 min. The sample was adjusted to optimal pH and temperature for Alcalase[®] (pH 8.0; 50°C). The hydrolysis reaction was started by the addition of the enzyme at a 1:1 (U/mg) enzyme/protein ratio. The reaction was conducted at 50°C and pH 8.0 for 2 h. During the reaction, the pH of the mixture was

maintained at the desired value by continuous addition of 4 N NaOH. After the required digestion time, the enzymatic hydrolysis was stopped by addition of disodium tetraborate (0.32 M, pH 12.7) up to a final pH of 12. Protein hydrolysates were then centrifuged at 5000 g for 20 min to separate soluble and insoluble fractions. Finally, the soluble fractions, referred to as protein hydrolysates, were freeze-dried at -50°C and 121 mbar (Modulyod-230, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA) and then stored at -20°C for further use.

2.5. Determination of the degree of hydrolysis

The degree of hydrolysis (DH), defined as the percent ratio of the number of peptide bonds cleaved (h) to the total number of peptide bonds in the substrate studied (h_{tot}), was calculated from the amount of base (NaOH) added to keep the pH constant during the hydrolysis (Adler-Nissen, 1986) according to the following equation.

$$\text{DH}\% = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100 = \frac{B \times \text{Nb}}{\text{MP}} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{\text{tot}}} \times 100$$

where B is the amount of NaOH consumed (ml) to keep the pH constant during the proteolysis of the substrate. Nb is the normality of the base, MP is the mass (g) of the protein ($N \times 6.25$), and α represents the average degree of dissociation of the α -NH₂ groups in the protein substrate expressed as:

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH}-\text{pK}}}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}}}$$

Where pH and pK are the values at which the proteolysis was conducted. The total number of peptide bonds (h_{tot}) in the protein substrate was assumed to be 8.6 meq/g (Adler-Nissen, 1986).

2.6. Purification of the antibacterial fractions by HPLC

The lyophilized hydrolysate (1 g), with a DH of 6.6%, obtained by treatment with Alcalase[®] for 15 min, was suspended in 5 ml of distilled water, then separated onto a Sephadex G-25 gel filtration column (5.2 \times 56 cm) pre-equilibrated and eluted with distilled water. Fractions (4 ml) were collected at a linear flow rate of 30 ml/h. Fractions (4 ml each) were collected and elution curves were obtained by measuring absorbance at 226 nm using an online spectrophotometer. Fractions that showed antibacterial activity were pooled and lyophilized.

The most active fraction was dissolved in Milli Q water, filtered through 0.22 μm filters, and then separated by Reverse-phase high-pressure liquid chromatography (RP-HPLC) on a Waters C₁₈ column (4.6 mm \times 250 mm) (XBridge[™], Ireland). Sample was injected at a volume of 60 μl (50 mg/ml). Peptides were eluted with eluent A (water containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)) for 5 min, then with a linear gradient of acetonitrile (40–100% for 60 min) containing 0.1% TFA at a flow rate of 1 ml/min. On-line 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 antibacterial 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 analyse chromatographic data.

2.7. Identification of antibacterial peptides

The molecular mass and peptide sequencing were done in positive ion mode using Electrospray ionisation–mass spectrometry (ESI–MS) and the 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 spectra MS–MS were made with the 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 (nebulised) uninterrupted, by a pump (Model 22, Harvard Apparatus, South Natick, USA) with a flow rate of 5 µl/min. The potential of ionisation was of 5000 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 4000-40M and a nitrogen generator Whatman model 75-72 (Whatman Inc., Haverhill, MA the USA). The polypropylene glycol (PPG) was used for the calibration and the optimisation of the machine. The peptide sequence was determined from the CID spectrum of the protonated analyse $[M + H]^+$ by MS/MS experiments. Peptide sequences were done using the bioanalyst software (Applied Biosystems, USA).

2.8. Bacteria and antibacterial assays

The antibacterial activity was determined by the method of Parish et al. (2001). Ten bacterial species were used as test microorganisms for determination of antibacterial activity: *Bacillus cereus* (isolated from food products in our laboratory), *Listeria monocytogenes* (ATCC 43251), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Micrococcus luteus* (ATCC 4698), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* (ATCC 43972), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) and *Enterobacter* sp. These bacterial species were conserved at –24 °C in glycerol containing nutrient broth and were sub cultured twice in Muller-Hinton (Biokar Diagnostics) at 30 °C under agitation (60 rpm) for *M. luteus* and at 37 °C for other bacterial species.

After 18 h of incubation to 30 °C in nutrient broth, for *M. luteus*, and 37 °C for the other bacterial strains, the bacterial cultures were centrifuged at 10,000 rpm during 5 min. The cells of the these bacterial species were washed twice in 10 mM Sodium Phosphate buffer pH 7.5 and were then added at a concentration of 10^7 CFU/plate in 10 ml of the layer containing: Agarose 1%, Triton X100 0.02%, and BSA 0.02%. For *M. luteus* the layer contained: Agar 1%, and Muller Hinton 21 g/l.

After a short vortex homogenization, the 10 ml containing the 10^7 UFC were quickly cast in a Petri plate. After solidification, the wells (5 mm diameter) were made and the peptide (1 mg/ml) prepared in 10 mM Sodium Phosphate buffer, pH 7.5 and was added (20 µl) to wells punched in the agarose layer allowed to diffuse in the layer and incubated in a humidified close container during 3 h at 4 °C for *M. luteus* and at 37 °C for other strains. Following this diffusion period, 10 ml of 1% Agar and 42 g/l Muller Hinton were added as a top layer and plates were incubated 24 h at 37 °C. With *M. luteus*, no top layer was used and plates were incubated 24 h at 30 °C.

The antibacterial activity was measured as the diameter of the clear zone of growth inhibition compared with a positive control, chloramphenicol, and a negative control, sodium phosphate buffer in Petri plates.

2.9. Hemolytic activity

The hemolytic activity of the active peptide fractions was determined by methods of Dathe et al. (1996) and Strub et al. (1996), slightly modified. Five millilitres of bovine blood was centrifuged at 3500 rpm for 10 min to isolate erythrocytes, which were then washed three times with 10 mM sodium phosphate, pH 7.5, containing NaCl 9 g/l (NaCl/Pi). The cell concentration stock suspension was adjusted to 10^9 cells/ml. The cell suspension (12 µl) along with varying amounts of sub-fractions stock solution and the buffer were pipetted into Eppendorf tubes to give a final volume of 50 µl. The Eppendorf tubes with 2.5×10^8 cells/ml were then incubated at 37 °C during 40 min. After centrifugation (5000 rpm, 5 min), 30 µl of supernatant was diluted in 500 µl water. The absorbance of the diluted solution was measured at 420 nm. The absorbance obtained after treating erythrocytes with only NaCl/Pi and SDS (0.2%) was taken as 0 and 100%, respectively.

2.10. Statistical analysis

All data were submitted to Analysis of Variance (ANOVA) and differences between means were evaluated by Duncan's Multiple Range Test. The data were analysed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 10.0 (Chicago, Illinois, USA). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Production of barbel muscle protein hydrolysates (BMPHs)

Bioactive peptides can be produced by one of four methods: solvent extraction, chemical treatment, enzymatic hydrolysis and microbial fermentation of food proteins (Alasalvar, Shahidi, Miyashita, & Wanasundara, 2010, chap. 42, pp. 518). The enzymatic hydrolysis is method is preferred in the food and pharmaceutical industries because the other methods can leave residual organic solvents or toxic chemicals in the products. Bioactive peptides are inactive within the sequences of the parent proteins. They are released by enzymatic hydrolysis and then they may exert various physiological functions (Lahl & Braun, 1994; Verduyck, Van Camp, & Smagghie, 2005). The biological activities of protein hydrolysates depend on the protein substrate, the specificity of the enzyme used for the proteolysis, the conditions used during hydrolysis and the degree of hydrolysis (Kristinsson & Raso, 2000). Kinetics studies of hydrolysis of barbel muscle using Alcalase® were followed at different degrees of hydrolysis (H_1 – H_7) (2.8%, 5.1%, 6.6%, 10.45, 13%, 14.58% and 16.2%) in order to generate a maximum of intermediate peptides of medium size (Fig. 1).

The hydrolysis curve of barbel proteins with Alcalase® after 2 h of incubation is shown in Fig. 1. The hydrolysis of barbel 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 reaction reached the steady-state phase when no apparent hydrolysis took place. The shape of the hydrolysis curve is typical of those previously published for muscle proteins of capelin (Shahidi, Han, & Synowiecki, 1995), Pacific whiting solid wastes (Benjakul & Morrissey, 1997), yellow stripe trevally (Klompong, Benjakul, Kantachote, & Shahidi, 2007), silver carp (Dong et al., 2008) and smooth-hound (Bougatef et al., 2009).

3.2. Antibacterial activity of BMPHs

It is well known that biological properties of peptides are to a larger extent influenced by their molecular structure (amino acid composition and/or sequence) and length, which in turn greatly

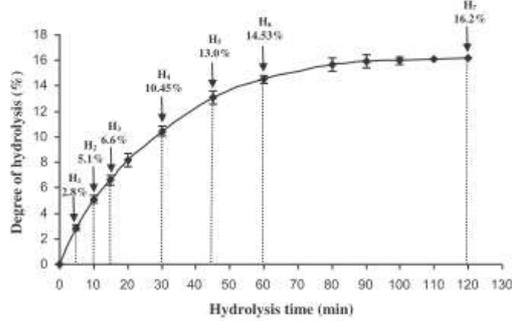


Fig. 1. Hydrolysis curve of barbel muscle treated with Alcalase[®]. Hydrolysis was conducted at the following conditions: enzyme (U)/protein (mg) ratio of 1:1, pH 8.0 and at 50 °C for 2 h.

affected by hydrolysis degree. The hydrolysis of proteins, which is measured in terms of degree of hydrolysis, is an important parameter for obtaining hydrolysate with a reproducible biological activity. Therefore, it is imperative to control and optimize the hydrolysis of proteins to obtain reproducible and highly biologically active hydrolysates.

The antibacterial activity of the barbel muscle protein hydrolysates was tested on ten strains: five Gram-negative (*E. coli*, *S. enterica*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *E. sp.*) and five Gram-positive (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *M. luteus* and *B. cereus*). The antibacterial activity was measured as the diameter of the clear zone of growth inhibition.

At the tested concentration (1 mg/of dry weight/ml), as shown in Table 1, five protein hydrolysates (H₁–H₅) showed antibacterial activity towards several strains. However, no antibacterial activity was detected with the undigested barbel muscle protein, H₆ and H₇. Interestingly, only barbel muscle protein hydrolysate with a DH of 6.6% (H₃) showed a strong antibacterial activity towards eight strains. Therefore, this hydrolysate was selected for further study.

3.3. Isolation and purification of antibacterial peptides

The barbel muscle protein hydrolysate (H₃), obtained with a DH of 6.6%, was fractionated on a Sephadex G-25 gel filtration chromatography. As reported in Fig. 2a, there are six major absorbance peaks (F_I–F_{VI}) at 226 nm. Fractions associated with each peak were collected, concentrated by lyophilisation and then evaluated for antibacterial activity.

Table 1
Antibacterial activity of barbel (*B. callensis*) muscle protein hydrolysates obtained by treatment with Alcalase[®].

Bacteria strains	Undigested muscle	Barbel muscle protein hydrolysates						
		H ₁	H ₂	H ₃	H ₄	H ₅	H ₆	H ₇
<i>Escherichia coli</i>	-	-	++	++	+	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i>	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	++	++	++	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	++	++	+	-	-	-
<i>Enterobacter sp.</i>	-	-	+++	+	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	++	+++	+	+	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	+	+++	+++	++	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	++	-	-	-	-

Inhibition zones: +++: >1.5 cm; ++: 0.5–1.5 cm, +: <0.5 cm, and -: no activity.

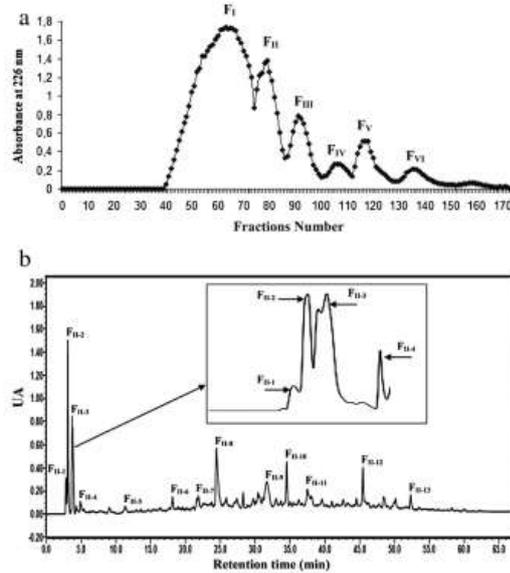


Fig. 2. a. Gel filtration chromatography of hydrolysate H₃ obtained by treatment with Alcalase[®] on a Sephadex G-25. b. Elution profile of fraction F_{II} separated by reversed-phase high performance liquid chromatography. Peptides were eluted with eluent A (water containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)) for 5 min, then with a linear gradient of acetonitrile (40–100% for 60 min) containing 0.1% TFA at a flow rate of 1 ml/min.

As shown in Table 2, antibacterial activity at 1 mg/of dry weight/ml was widely observed only in three fractions (F_I, F_{II} and F_{III}) and was absent in fraction F_{IV}, F_V and F_{VI}. Among the three active fractions, fraction F_{II} was the most active against tested bacterial species. Its yield was 20.84%. Yields of the five fractions are shown in Table 3.

Fraction F_{II} was further separated by RP-HPLC on a Waters C₁₈ column and fractionated into thirteen major sub-fractions (F_{II-1}–F_{II-13}). The elution profile of the peptides is shown in Fig. 2b. Fractions were collected separately through repeated chromatography using reversed-phase HPLC column and concentrated in vacuo prior to testing the antibacterial activities. As reported in Table 4 and Fig. 3, only, four peptide sub-fractions showing antibacterial activity (at a concentration of 360 µg of dry weight/ml) were obtained and designated F_{II-1}, F_{II-2}, F_{II-3} and F_{II-4}. These sub-fractions F_{II-1}–F_{II-4}

Table 2
Antibacterial activity of fractions of the separated fractions (F_I–F_{VI}) from hydrolysate H₃.

Bacteria strains	Sephadex G-25 fractions					
	F _I	F _{II}	F _{III}	F _{IV}	F _V	F _{VI}
<i>Escherichia coli</i>	+++	+++	+	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	+++	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+++	+++	-	-	-	-
<i>Enterobacter sp.</i>	-	++	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	+++	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	+++	+++	++	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	++	-	-	-	-

Inhibition zones: +++: >1.5 cm; ++: 0.5–1.5 cm, +: <0.5 cm, and -: no activity.

Table 3
Yields of fractions separated by gel filtration on a Sephadex G-25 column.

Fractions	Total peptides (mg)	Recovery yield (%)
F _I	342.7	34.27
F _{II}	208.4	20.84
F _{III}	217.1	21.71
F _{IV}	109.0	10.9
F _V	68.2	6.82
F _{VI}	54.5	5.45

Table 4
Antibacterial activity of fractions of sub-fractions F_{II-1}, F_{II-2}, F_{II-3} and F_{II-4}.

Bacteria strains	RP-HPLC fractions			
	F _{II-1}	F _{II-2}	F _{II-3}	F _{II-4}
<i>Escherichia coli</i>	-	++	++	+
<i>Salmonella enterica</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	++	+++	++
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	++	+
<i>Enterobacter sp.</i>	-	++	++	++
<i>Listeria monocytogenes</i>	++	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	++	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	++	++	++	++
<i>Bacillus cereus</i>	+	-	+	+

Inhibition zones: +++: >1.5 cm; ++: 0.5–1.5 cm, +: <0.5 cm, and -: no activity.

were further analysed for peptide identification. The antimicrobial activity of the peptide fraction F_{II-3} with different molecular weights for several bacteria is shown in Table 4. For the 10 strains, the bacteria manifesting the most sensitivity to the fractions were *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. sp.*, *S. aureus* and *M. luteus*. This fraction was strongly protective against pathogenic bacteria. It

is generally agreed that peptides need to interact with cell membranes as part of their action against microbes (Hancock & Patrzykat, 2002). Some of these interacting antimicrobial peptide mechanisms have already been reviewed (Gobbetti, Minervini, & Rizzello, 2004; Hancock & Patrzykat, 2002; Patrzykat & Douglas, 2005), and describe the tendency to form discrete channels in lipid bilayers, disturbance of the lipid bilayer because of carpet-like peptide binding, specific peptide-lipid interaction that results in phase separation, detergent-like solubilization of the membrane and even peptides that enter the cell leaving the membrane intact.

3.4. Identification of antibacterial peptides

Peptides in sub-fractions F_{II-1}–F_{II-4} were analysed by ESI–MS for molecular mass determination and ESI–MS/MS for the identification of peptides (Table 5).

Fraction F_{II-3} was composed of three peptides (Ala–Ala–Ala–Leu, Ala–Ala–Gly–Gly–Val and Ala–Ala–Val–Lys–Met). Peptides in fraction F_{II-3} had the highest hydrophobic ratio (>80%) among peptides in other fractions. Ala–Ala–Ala–Leu, Ala–Ala–Gly–Gly–Val and Ala–Ala–Val–Lys–Met had hydrophobic ratio of 100%, 100% and 80% respectively. The antibacterial activity of cationic peptides can be modulated through modification of net charge or the ratio of hydrophobicity (Kustanovich, Shalev, Mikhlín, Gaidukov, & Mor, 2002; Zelezetsky, Pag, Sahl, & Tossi, 2005). Nevertheless, the exposed basic residues of anionic peptides are not essential for their antibacterial activities. Results in Table 5 indicate that the antibacterial activity of F_{II-3} fraction may be due to its hydrophobic characteristics.

The amino acid analysis showed that sub-fractions F_{II-1}, F_{II-2} and F_{II-4} mainly contained three, three and two peptides, respectively. The amino acid sequences of these antibacterial peptides were identified as Gly–Val–His, Trp–His–Arg, Trp–His–Phe; Leu–

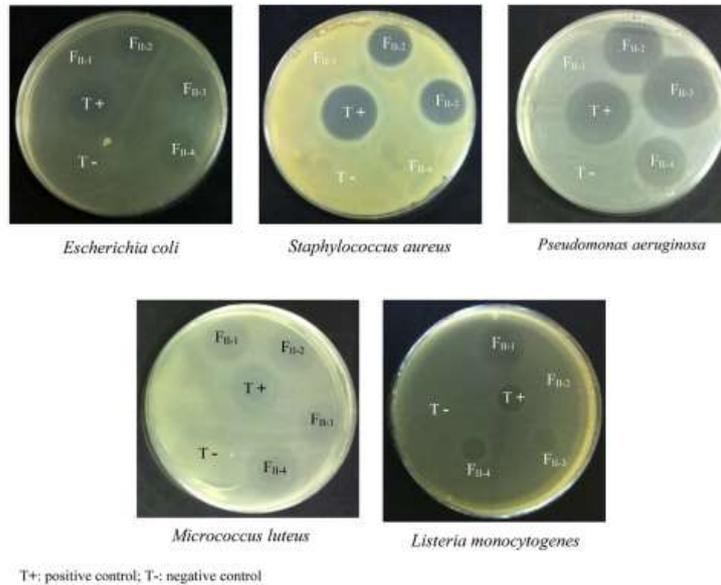


Fig. 3. Antibacterial activity of sub-fractions F_{II-1}, F_{II-2}, F_{II-3} and F_{II-4} against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus* and *Listeria monocytogenes*.

Table 5
Peptides identified by MS/MS in F_{II-1}–F_{II-4} sub-fractions separated by RP-HPLC.

Peptide fractions	Molecular masses (Da)	Amino acid sequences	Hydrophobic ratio ^a (%)
F _{II-1}	275	Gly–Val–His	33
	433	Trp–His–Arg	33
	452	Trp–His–Phe	66
F _{II-2}	327	Leu–Thr–Met	66
	333	Ile–Thr–His	33
	350	Pro–Pro–Ser–Ser	0
F _{II-3}	308	Ala–Ala–Ala–Leu	100
	337	Ala–Ala–Gly–Gly–Val	100
	482	Ala–Ala–Val–Lys–Met	80
F _{II-4}	275	Gly–Val–His	33
	314	Ala–Ser–Ser–Ser	25

^a Calculated on the percentage of hydrophobic residues (Ile, Val, Leu, Phe, Cys, Met, Ala, Trp) in the peptide sequence.

Thr–Met, Ile–Thr–His, Pro–Pro–Ser–Ser and Gly–Val–His, Ala–Ser–Ser–Ser.

3.5. Hemolytic activity of antibacterial peptides

The hemolytic activity of all sub-fractions (F_{II-1}–F_{II-4}) was tested on bovine erythrocytes. Several concentrations for each peptide were tested. For each peptide, the highest concentration tested corresponded 1 mg/ml. For all peptides, no hemolysis was observed. These results show that these peptides would be non-toxic even if used at high concentrations.

4. Conclusion

In conclusion, the current research has demonstrated that enzymatic protein hydrolysates from barbel muscle have a potential antibacterial activity. The antibacterial peptides from barbel hydrolysates were purified using gel filtration chromatography and RP-HPLC, and sequences were identified using ESI–MS/MS. Eleven peptides in F_{II-1}, F_{II-2}, F_{II-3} and F_{II-4} sub-fractions were separated and the amino acid sequences were determined.

Given the current context of food safety and food protection by means of natural products, such a high number of antibacterial peptides derived from barbel protein hydrolysates could prove useful as preservatives for storage and distribution of meat based products.

Acknowledgements

This work was funded by the Ministry of Higher Education and Scientific Research, Tunisia and also by CMCU project (12G0915).

References

Abidi, F., Aissaoui, N., Gaudin, J. C., Chobert, J. M., Haertlé, T., & Marzouki, M. N. (2013). MS analysis and molecular characterization of *Botrytis cinerea* protease Prot-2. Use in bioactive peptides production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170, 231–247.

Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Barking, UK: Elsevier Applied Science Publishers.

Alasalvar, C., Shahidi, F., Miyashita, K., & Wanasundara, U. (2010). *Handbook of seafood quality, safety and health applications*.

Altincicek, B., Linder, M., Linder, D., Preissner, K. T., & Vilcinskis, A. (2007). Microbial metalloproteinases mediate sensing of invading pathogens and activate innate immune responses in the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *Infection and Immunity*, 75, 175–183.

Beaulieu, L., Thibodeau, J., Bonnet, C., Bryl, P., & Carbonneau, M. E. Detection of antibacterial activity in an enzymatic hydrolysate fraction obtained from processing of Atlantic rock crab (*Cancer irroratus*) by-products. *PharmaNutrition*, in press.

Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Kawase, K., Shimamura, S., & Tomita, M. (1992). Identification of a bactericidal domain of lactoferrin. *Biochemistry and Biophysics*, 1121, 130–136.

Benjakul, S., & Morrissey, M. T. (1997). Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3423–3430.

Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114, 1198–1205.

Boulangier, N., Bulet, P., & Lowenberger, C. (2006). Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. *Trends in Parasitology*, 22, 262–268.

Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 238–250.

Dathe, M., Schumann, M., Wieprecht, T., Winkler, A., Beyermann, M., Krause, E., et al. (1996). Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes. *Biochemistry*, 35, 12612–12620.

Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y., & Yang, H. (2008). Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*, 107, 1485–1493.

Doeyna, A., Saucier, L., Beaulieu, L., Pouliot, Y., & Bazinet, L. (2012). Electro-separation of an antibacterial peptide fraction from snow crab by-products hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membranes. *Food Chemistry*, 132, 1177–1184.

Gobbetti, M., Minervini, F., & Rizzello, C. G. (2004). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal Dairy Technology*, 57, 173–188.

Hancock, R. E. W., & Patrzykat, A. (2002). Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. *Current Drug Targets-Infectious Disorders*, 2, 79–83.

Ibrahim, H. R., Iwamori, E., Sugimoto, Y., & Aoki, T. (1998). Identification of a distinct antibacterial domain within the N-lobe of ovotransferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1401, 289–303.

Jensen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 491–511.

Kembhavi, A. A., Kulkarni, A., & Pant, A. (1993). Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM No. 64. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 38, 83–92.

Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102, 1317–1327.

Konno, K., Rangel, M., Oliveira, J. S., Dos Santos Cabrera, M. P., Fontana, R., Hirata, I. Y., et al. (2007). Decoralin, a novel linear cationic alpha-helical peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Oreumenes decoratus*. *Peptides*, 28, 2320–2327.

Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40, 43–81.

Kustanovich, I., Shalev, D. E., Mikhlin, M., Gaidukov, L., & Mor, A. (2002). Structural requirements for potent versus selective cytotoxicity for antimicrobial dermapepsin S4 derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 16941–16945.

Lahl, W. J., & Braun, S. D. (1994). Enzymatic production of protein by hydrolysates for food use. *Food Technology*, 48, 68–71.

Paris, C. A., Jiang, H., Tokiwa, Y., Berova, N., Nakanishi, K., Mc Cabe, D., et al. (2001). Broad-spectrum antimicrobial activity of hemoglobin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9, 377–382.

Patrzykat, A., & Douglas, S. E. (2005). Antimicrobial peptides: cooperative approaches to protection. *Protein and Peptide Letters*, 12, 19–25.

Pellegrini, A. (2003). Antimicrobial peptides from food protein. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1225–1238.

Pellegrini, A., Dettling, C., Thomas, U., & Hunziker, P. (2001). Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine beta-lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1526, 131–140.

Shahidi, F., Han, X. Q., & Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53, 285–293.

Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., & Boman, H. G. (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 292, 246–248.

Strub, J. M., Goumon, Y., Lugardon, K., Capon, C., Lopez, M., Moniatte, M., et al. (1996). Antibacterial activity of glycosylated and phosphorylated chromogranin A-derived peptide 173–194 from bovine adrenal medullary chromaffin granules. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 28533–28540.

Vercruyse, L., Van Camp, J., & Smagghe, G. (2005). ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein, a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8106–8115.

Yaba Adje, E., Balti, R., Kouach, M., Dhulster, P., Guillochon, D., & Nedjar-Arroume, N. (2011). Obtaining antimicrobial peptides by controlled peptic hydrolysis of bovine hemoglobin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49, 143–153.

Yeaman, M. R., & Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*, 55, 27–55.

Zelezetsky, I., Pag, U., Sahl, H. G., & Tossi, A. (2005). Tuning the biological properties of amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides: rational use of minimal amino acid substitutions. *Peptides*, 26, 2368–2376.

Zucht, H. D., Raida, M., Adermann, K., Mägert, H. J., & Forssmann, W. G. (1995). Casocidin-I: a casein-S2 derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Letters*, 372, 185–188.

ANNEXE 3



Colloque Adebiotech/SFGP



Peptides issus des procédés d'hydrolyse : Filières Industrielles

2 et 3 octobre 2012

Parc Biocitech, Romainville

COMPTE-RENDU

Auteurs

Laetitia Canabady-Rochelle^a, Karima Hedhili^b,

Coordinateurs

Romain Kapel^a, Pascal Dhulster^b

^a Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, U.M.R. 7274 - C.N.R.S., Université de Lorraine, Plateforme S.V.S., 13 rue du bois de la Champelle, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy.

^b ProBioGEM, UPRES-EA 1026, Polytech'Lille, Boulevard Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq.

ANNEXE 4

Mécanisme et modélisation de l'hydrolyse enzymatique d'un peptide antibactérien issu de l'hémoglobine bovine : α 1-32

Hedhili K^{a,b,*}, Hani K^b, Kriaa K^c, Vauchel P^a, Dimitrov K^a, Dhulster P^a, Nedjar-Arroume N^a

a. Laboratoire ProBioGEM, USTL, Polytech'Lille, Avenue Paul Langevin, 590655 Villeneuve d'Ascq, France

b. Unité de Recherche Mycotoxicologie-maladies métaboliques héréditaire, Faculté de Médecine de Sousse, Tunisie

c. Unité de Recherche en Mécanique des Fluides Appliquée et Modélisation, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, Tunisie

Mots-clés : cinétiques, hydrolyse enzymatique, l'hémoglobine bovine, peptides actifs, modélisation.

L'hydrolysats pepsique de l'hémoglobine bovine présente une importante source de peptides qui ont des propriétés biologiques prononcées. Les réactions protéasiques sont des réactions composites avec de nombreuses réactions parallèles et séquentielles qui se traduisent par des cinétiques et des mélanges peptidiques complexes. Les peptides actifs se trouvent généralement parmi les populations de peptides transitoires dont la séquence et la concentration sont sous contrôle cinétique [1-4]. L'objectif général du travail est de favoriser l'obtention des peptides d'intérêt, présentant une activité biologique prononcée. Ces études cinétiques et leurs modélisations permettront d'optimiser l'obtention d'un peptide actif particulier.

Dans le cadre de ce travail, les peptides d'intérêt ont été identifiés : tous les peptides présents dans l'hydrolysats ont d'abord été isolés à l'aide de purifications par HPLC, puis leurs activités ont été testées vis-à-vis de quatre souches bactériennes. Ainsi, trente peptides antibactériens ont été obtenus et identifiés. La plupart sont des peptides intermédiaires, issus des chaînes alpha ou bêta de l'hémoglobine et classés en plusieurs familles. En particulier, la famille dérivée du peptide α 1-32 donne des peptides antibactériens et non toxiques pouvant être employés comme préservatifs pour le stockage et la distribution des produits carnés [1].

La cinétique de l'hydrolyse enzymatique a été étudiée et suivie dans un réacteur fermé et parfaitement agité pour l'hémoglobine bovine complète, puis plus spécifiquement pour le peptide α 1-32. Les résultats obtenus ont permis d'identifier les peptides intermédiaires et finaux et de proposer un schéma réactionnel décrivant les réactions parallèles et consécutives ayant lieu au cours de l'hydrolyse. Un modèle mathématique, basé sur le mécanisme proposé, a été développé pour décrire la cinétique de l'hydrolyse des peptides de la famille α 1-32. Les constantes cinétiques des différentes réactions ont pu être identifiées à partir des données expérimentales. Les résultats obtenus et le modèle proposé offrent la possibilité de contrôler le procédé d'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine.

[1] Estelle Yaba Adje, Rafik Balti, Mostafa Kouach, Pascal Dhulster, Didier Guillochon, Naïma Nedjar-Arroume. *Int. J. Biol. Macromol.* 49 (2011) 143–153.

[2] Daoud R, Dubois V, Bors-Dodita L, Nedjar-Arroume N, Krier F, Chihib N, et al. *Peptides*, 26 (2005) 713–9.

[3] Piot JM, Zhao QY, Guillochon D, Ricart G, Thomas D. *Biochem Biophys Res Commun*, 189 (1992) 101–10.

[4] Sazonova OV, Blishchenko EY, Kalinina OA, Egorova NS, Suruvoy AY, Philippova MM, et al. *Protein Pept Lett*, 10 (2003) 386–395.

* Auteur à qui la correspondance devra être adressée : hedhilikarima@yahoo.fr

ANNEXE 5

Valorization of bovine hemoglobin: a study of the kinetics of enzymatic hydrolysis production of antibacterial peptides

Hedhili K^{a,c}, Vauchel P.^a, Dimitrov K.^a, Kriaa K.^b, Hani K.^c, Dhulster P.^a, Nedjar-Arroume N.^a



^a Université Lille1, Polytech Lille, Av. Paul Langevin, 59655, Villeneuve d'Ascq, France

^b Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, BP W3038, Sfax, Tunisie

^c Faculté de Médecine de Sousse, Rue Mohamed Karoui, 4002, Sousse, Tunisie



Abstract

Several bioactive peptides (analgesic, bacterial growth-stimulating, antimicrobial, ...) can be obtained by peptic hydrolysis of bovine hemoglobin. During the hydrolysis, several parallel and consecutive reactions take place and the hydrolysis kinetics is very complex. The obtained hydrolyzate is a complex mixture, containing a large number of peptides. The general objective of this work is to allow obtaining the peptides of interest with a marked biological activity. The obtained peptides can be classified into many families in the α chains or in the β chains of hemoglobin. Among these families, the family derived from peptide $\alpha 1-32$ gives five other peptides by the enzymatic splitting. A mathematical model based on the proposed mechanism, was developed to describe the kinetics of peptides hydrolysis of the $\alpha 1-32$ family.

Antimicrobial peptides of bovine hemoglobin

Peptic digestion of bovine hemoglobin yields a fragment with antibacterial activity. This peptide was purified to homogeneity. Mass determination and fragmentation indicated that this peptide corresponded to the $\alpha 1-32$ fragment of the α chain of hemoglobin. The minimum inhibitory concentration and mode of action of the family derived from peptide $\alpha 1-32$ towards *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Micrococcus Luteus* were determined.



Petri dish with areas of inhibition *Micrococcus Luteus*



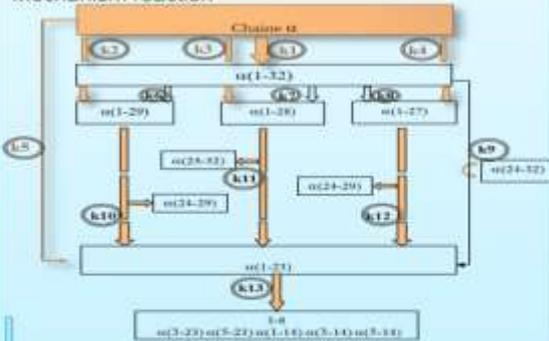
Petri dish with areas of inhibition *Listeria innocua*

Peptides	Mass	MIC (μ M)			
		<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Micrococcus Luteus</i>
$\alpha 1-32$	3257	38	154	38	90
$\alpha 1-29$	2840	27	54	27	54
$\alpha 1-28$	2727	27	54	27	54
$\alpha 1-27$	2656	38	54	27	38
$\alpha 1-23$	2236	27	54	54	100

MIC values (μ M) of the antibacterial peptides derived from $\alpha 1-32$ peptide which comes from bovine hemoglobin

Modeling of hydrolysis of bovine hemoglobin

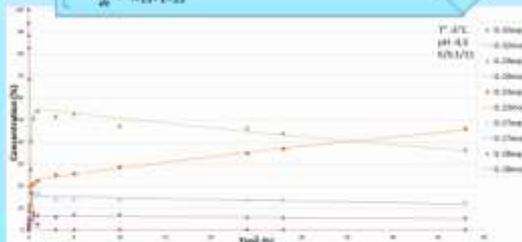
Mechanism reaction



Mathematical model

$$\begin{aligned} \frac{dI_0}{dt} &= -(k_1 + k_2 + k_3 + k_4 + k_5)I_0 \\ \frac{dI_{1-29}}{dt} &= -(k_6 + k_7 + k_8 + k_9)I_{1-29} + k_1 I_0 \\ \frac{dI_{1-28}}{dt} &= k_2 I_0 + k_7 I_{1-32} - k_{10} I_{1-28} \\ \frac{dI_{1-27}}{dt} &= k_3 I_0 + k_8 I_{1-32} + k_{12} I_{1-29} + k_{13} I_{1-28} + k_{14} I_{1-27} - k_{15} I_{1-27} \\ \frac{dI_{1-23}}{dt} &= k_4 I_0 + k_9 I_{1-32} - k_{11} I_{1-23} \\ \frac{dI_{2-23}}{dt} &= k_{16} I_{1-23} \end{aligned}$$

Solving the differential equation



Peptides concentrations versus time (patterns : experimental points, solid lines: modeling results)

Conclusion

A mathematical model, based on the proposed mechanism, was developed to describe the kinetics of a $\alpha 1-32$ family peptides hydrolysis. This mathematical model could allow defining the optimal conditions for the production of various intermediate peptides with antibacterial activity from peptic hydrolysis of bovine hemoglobin.



ANNEXE 6

Voie de valorisation de l'hémoglobine bovine : modélisation de la cinétique enzymatique des peptides antimicrobiens



Hedhili K.^{a,c}, Vauchel P.^a, Dimitrov K.^a, Kriaa K.^b, Chihib N-E.^a, Chataigne G.^a, Nikov I.^a, Hani K.^c, Dhulster P.^a, Nedjar-Arroume N.^a



^a Université Lille1, Polytech Lille, Av. Paul Langevin, 59655, Villeneuve d'Ascq, France
^b Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, BP W'3038, Sfax, Tunisie
^c Faculté de Médecine de Sousse, Rue Mohamed Karoul, 4002, Sousse, Tunisie

Introduction

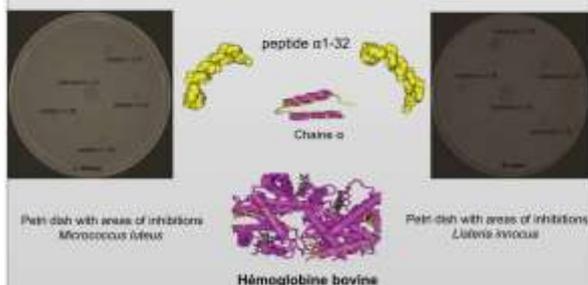
Le sang issu des abattoirs représente une source importante de pollution et pose un réel problème sur le plan écologique et environnemental.

Le but de notre travail est de traiter et valoriser ces déchets par une étude sur le composant principal du sang : l'hémoglobine. Plusieurs peptides bioactifs peuvent être obtenus par hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine, d'où l'intérêt de maîtriser la cinétique enzymatique de cette hydrolyse.

La famille dérivée du peptide α 1-32 donne des peptides antibactériens et non toxiques pouvant être employés comme préservatifs pour le stockage et la distribution des produits à base de viande

Activité antibactérienne des peptides d'hydrolyse de hémoglobine bovine

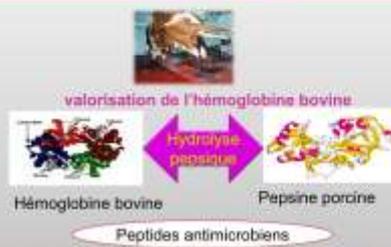
L'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine produit une famille de peptides ayant une activité antibactérienne. La détermination de la masse et de la fragmentation a indiqué que ce peptide correspond au fragment 1-32 de la chaîne α de l'hémoglobine. La concentration minimale inhibitrice et le mode d'action de la famille dérivée de peptide α 1-32 vis-à-vis *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Micrococcus Luteus* ont été déterminées.



Peptides	Mass	CMI (μ M)			
		<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Micrococcus Luteus</i>
α 1-32	3257	38	154	38	90
α 1-29	2840	27	54	27	54
α 1-28	2727	27	54	27	54
α 1-27	2656	38	54	27	38
α 1-23	2236	27	54	54	100

CMI en μ M des peptides antibactériens vis-à-vis des souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Salmonella enteritidis* et *Micrococcus Luteus*.

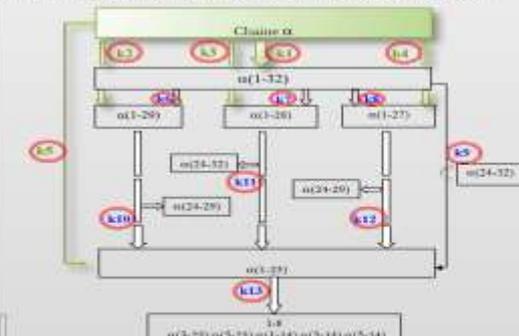
Objectifs



Maîtriser la cinétique enzymatique de l'hydrolyse de l'hémoglobine
 Produire ces peptides à l'échelle industrielle

Modélisation de la cinétique d'hydrolyse pepsique du peptide α (1-32)

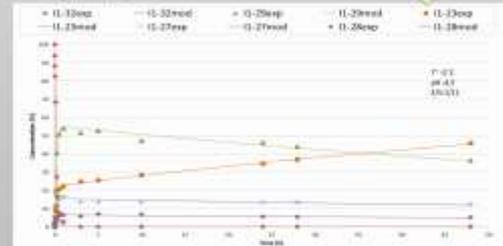
Schéma réactionnel de l'hydrolyse pepsique du peptide α (1-32) :



Système d'équations différentielles :

$$\begin{aligned} \frac{dI_0}{dt} &= -(K_1 + K_2 + K_3 + K_4 + K_5)I_0 \\ \frac{dI_1}{dt} &= -(K_6 + K_7 + K_8 + K_9)I_1 + K_1I_0 \\ \frac{dI_2}{dt} &= K_2I_0 + K_7I_1 - K_{10}I_2 \\ \frac{dI_3}{dt} &= K_3I_0 + K_8I_1 - K_{11}I_3 + K_{12}I_2 - K_{13}I_3 \\ \frac{dI_4}{dt} &= K_4I_0 + K_9I_1 - K_{14}I_4 \\ \frac{dI_5}{dt} &= K_{10}I_2 - K_{15}I_5 \\ \frac{dI_6}{dt} &= K_{11}I_3 - K_{16}I_6 \\ \frac{dI_7}{dt} &= K_{12}I_2 - K_{17}I_7 \\ \frac{dI_8}{dt} &= K_{13}I_3 - K_{18}I_8 \\ \frac{dI_9}{dt} &= K_{14}I_4 - K_{19}I_9 \end{aligned}$$

Résolution du système différentiel



Evolution des concentrations des peptides en fonction du temps (maïf : points expérimentaux ; lignes continues : résultats de la modélisation)

Conclusion

Le modèle numérique de la cinétique d'hydrolyse pepsique du peptide antimicrobien α 1-32 permet de définir les conditions optimales pour favoriser la production des peptides intermédiaires ayant des activités biologiques intéressantes et d'estimer la production des peptides actifs en fonction de la quantité d'hémoglobine. La bonne maîtrise de la cinétique enzymatique de l'hydrolyse de l'hémoglobine est essentielle pour la production de ces peptides à l'échelle industrielle.

ANNEXE 7

Mechanism and modeling of the enzymatic hydrolysis of alpha 1-32 peptide derived from bovine hemoglobin

Hedhili K^{a,c}, Vauchel P.^a, Dimitrov K.^a, Kriaa K.^b, Chihib N-E.^a, Chataigne G.^a, Nikov I.^a, Dhulster P.^a, Nedjar-Arroume N.^a



^a Université Lille1, Polytech'Lille, Av. Paul Langevin, 59655, Villeneuve d'Ascq, France
^b Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, BP'W'3038, Sfax, Tunisie
^c Faculté de Médecine de Sousse, Rue Mohamed Karoui, 4002, Sousse, Tunisie

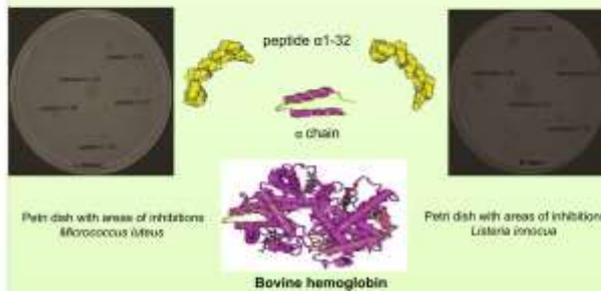


Abstract

Several bioactive peptides (analgesic, bacterial growth-stimulating, antimicrobial, ...) can be obtained by peptic hydrolysis of bovine hemoglobin. During the hydrolysis, several parallel and consecutive reactions take place and the hydrolysis kinetics is very complex. The obtained hydrolyzate is a complex mixture, containing a large number of peptides. The general objective of this work is to allow obtaining the peptides of interest with a marked biological activity. The obtained peptides can be classified into many families in the α chains or in the β chains of hemoglobin. Among these families, the family derived from peptide α 1-32 gives five other peptides by the enzymatic splitting. A mathematical model based on the proposed mechanism, was developed to describe the kinetics of peptides hydrolysis of the α 1-32 family.

Antimicrobial peptides of bovine hemoglobin

Peptic digestion of bovine hemoglobin yields a fragment with antibacterial activity. This peptide was purified to homogeneity. Mass determination and fragmentation indicated that this peptide corresponded to the 1-32 fragment of the α chain of hemoglobin. The minimum inhibitory concentration and mode of action of the family derived from peptide α 1-32 towards *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Micrococcus Luteus* were determined.

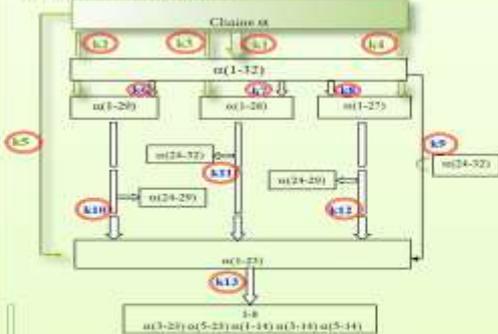


Peptides	Mass	MIC (μ M)			
		<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Micrococcus Luteus</i>
α 1-32	3257	38	154	38	90
α 1-29	2840	27	54	27	54
α 1-28	2727	27	54	27	54
α 1-27	2656	38	54	27	38
α 1-23	2236	27	54	54	100

MIC values (μ M) of the antibacterial peptides derived from α 1-32 peptide which comes from bovine hemoglobin

Modeling of hydrolysis of bovine hemoglobin

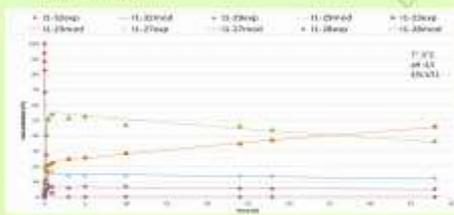
Mechanism reaction :



Mathematical model :

$$\begin{aligned} \frac{dI_0}{dt} &= -(K_1 + K_2 + K_3 + K_4 + K_5)I_0 \\ \frac{dI_{1-29}}{dt} &= -(K_6 + K_7 + K_8 + K_9)I_{1-29} + K_1I_0 \\ \frac{dI_{1-28}}{dt} &= K_2I_0 + K_3I_{1-32} - K_{10}I_{1-28} \\ \frac{dI_{1-27}}{dt} &= K_3I_0 + K_4I_{1-32} + K_{10}I_{1-29} + K_{11}I_{1-28} + K_{12}I_{1-26} - K_{13}I_{1-27} \\ \frac{dI_{1-26}}{dt} &= K_4I_0 + K_5I_{1-32} - K_{12}I_{1-26} \\ \frac{dI_6}{dt} &= K_{14}I_{1-25} \end{aligned}$$

Solving the differential equation



Peptides concentrations versus time (patterns : experimental points, solid lines: modeling results)

conclusion

This mathematical model could allow defining the optimal conditions for the production of various intermediate peptides with antibacterial activity from peptic hydrolysis of bovine hemoglobin.

THIRD INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANTIMICROBIAL PEPTIDES - "Today knowledge and future applications"

June, 13-15, 2012, Lille (Villeneuve d'Ascq), France

ANNEXE 8



La modélisation de la cinétique de l'hydrolyse enzymatique des peptides antibactériens de la famille α 1-32

Auteurs :

Karima Hedhili, Doctorante ^{a, b}
Karim Kriaa, Enseignant chercheur ^c
Peggy Vauchel, Maître de Conférences ^a
Krasimir Dimitrov, Maître de Conférences ^a
Jordan Nikov, Professeur ^a
Pascal Dhulster, Professeur ^a
Naïma Nedjar-Arroume, Professeur ^a

a Laboratoire ProBioGEM, USTL, Polytech'Lille, avenue Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq, IUT « A » Lille1

b Unité de Recherche Mycotoxicologie-maladies métaboliques héréditaire, Faculté de Médecine de Sousse, rue Mohamed Karoui, : 4002, Sousse, Tunisie

c Groupe de Génie des Procédés Agro-alimentaires, Unité de Recherche en Mécanique des Fluides Appliquée et Modélisation, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax

Adresse postale et électronique à utiliser par les organisateurs :

Laboratoire ProBioGEM, USTL, Polytech'Lille, avenue Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq, IUT « A » Lille1

hedhiliKarima@yahoo.fr

Thème : 1. Pluridisciplinarité

Mots-clés: cinétique, hydrolyse enzymatique, hémoglobine bovine, peptides actifs, modélisation.



1^{er} Congrès National de la Recherche en IUT
du 6 au 8 Juin 2012, Tours, France



Le sang bovin issu des abattoirs représente une source importante de pollution au niveau environnemental. L'hydrolyse enzymatique intervient dans ce contexte comme une réponse intéressante et exploitable au niveau industriel.

L'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine devient alors une véritable source de peptides qui ont des propriétés biologiques (analgésique, opioïdes, antimicrobiens,...) [1-4]. Au cours de l'hydrolyse, plusieurs réactions parallèles et consécutives ont lieu et la cinétique de l'hydrolyse est très complexe. L'hydrolysats obtenu est un mélange complexe, contenant un très grand nombre de peptides. L'objectif général du travail est de favoriser l'obtention des peptides d'intérêt, présentant une activité biologique prononcée.

Dans un premier temps, les peptides d'intérêt ont été identifiés : tous les peptides présents dans l'hydrolysats ont d'abord été isolés à l'aide de purifications par HPLC, puis leurs activités ont été testées vis-à-vis de quatre souches bactériennes. Ainsi, trente peptides antibactériens ont été obtenus et identifiés. La plupart sont des peptides intermédiaires, issus des chaînes α ou β de l'hémoglobine et classés en plusieurs familles. En particulier, la famille dérivée du peptide α 1-32 donne des peptides antibactériens et non toxiques pouvant être employés comme préservatifs pour le stockage et la distribution des produits à base de viande [1].

La cinétique de l'hydrolyse enzymatique a été étudiée et suivie dans un réacteur fermé et parfaitement agité pour l'hémoglobine bovine complète, puis plus spécifiquement pour le peptide α 1-32. Les résultats obtenus ont permis d'identifier les peptides intermédiaires et finaux et de proposer un schéma réactionnel décrivant les réactions parallèles et consécutives ayant lieu au cours de l'hydrolyse. Un modèle mathématique, basé sur le mécanisme proposé, a été développé pour décrire la cinétique de l'hydrolyse des peptides de la famille α 1-32. Les constantes cinétiques des différentes réactions ont pu être identifiées à partir des données expérimentales.

[1] Estelle Yaba Adje, Rafik Balti, Mostafa Kouach, Pascal Dhulster, Didier Guillochon, Naïma Nedjar-Arroume. *Int. J. Biol. Macromol*, 49 (2011) 143–153.

[2] Daoud R, Dubois V, Bors-Dodita L, Nedjar-Arroume N, Krier F, Chihib N, et al. *Peptides*, 26 (2005) 713–9.

[3] Piot JM, Zhao QY, Guillochon D, Ricart G, Thomas D. *Biochem Biophys Res Commun*, 189 (1992) 101–10.

[4] Sazonova OV, Blishchenko EY, Kalinina OA, Egorova NS, Suruvoy AY, Philippova MM, et al. *Protein Pept Lett*, 10 (2003) 386–395.

ANNEXE 9



JOURNÉE UGéPE Nord Pas-de-Calais

Jeudi 31 mai 2012

HYDROLYSE PEPSIQUE DE L'HEMOGLOBINE BOVINE : MODELISATION DE CINETIQUE ENZYMATIQUE DES PEPTIDES ANTIMICRIBIENS

Hedhili K^{a,b}, Kriaa K.^c, Vauchel P.^a, Dimitrov K.^a, Nikov I.^a, Dhulster P.^a, Nedjar-Arroume N.^a

a. Laboratoire ProBioGEM, USTL, Polytech Lille, avenue Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq

b. Unité de Recherche Mycotoxicologie-maladies métaboliques héréditaire, Faculté de Médecine de Sousse, Tunisie.

c. Unité de Recherche en Mécanique des Fluides Appliquée et Modélisation, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, Tunisie.

L'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine présente une importante source de peptides qui ont des propriétés biologiques (analgésique, opioïdes, antimicrobiens). Les réactions protéasiques sont des réactions composites avec de nombreuses réactions parallèles et séquentielles qui se traduisent par des cinétiques et des mélanges peptidiques complexes. Les peptides actifs se trouvent généralement parmi les populations de peptides transitoires dont la séquence et la concentration sont sous contrôle cinétique [1-4]. L'objectif général du travail est de favoriser l'obtention des peptides d'intérêt, présentant une activité biologique prononcée. Ces études cinétiques et leurs modélisations permettront d'optimiser l'obtention d'un peptide actif particulier.

Dans le cadre de ce travail, les peptides d'intérêt ont été identifiés : tous les peptides présents dans l'hydrolysate ont d'abord été isolés à l'aide de purifications par HPLC, puis leurs activités ont été testées vis-à-vis de quatre souches bactériennes. Ainsi, trente peptides antibactériens ont été obtenus et identifiés. La plupart sont des peptides intermédiaires, issus des chaînes alpha ou bêta de l'hémoglobine et classés en plusieurs familles. En particulier, la famille dérivée du peptide α 1-32 donne des peptides antibactériens et non toxiques pouvant être employés comme conservateurs pour le stockage et la distribution des produits carnés [1].

La cinétique de l'hydrolyse enzymatique a été étudiée et suivie dans un réacteur fermé et parfaitement agité pour l'hémoglobine bovine complète, puis plus spécifiquement pour le peptide α 1-32. Les résultats obtenus ont permis d'identifier les peptides intermédiaires et finaux et de proposer un schéma réactionnel décrivant les réactions parallèles et consécutives ayant lieu au cours de l'hydrolyse. Un modèle mathématique, basé sur le mécanisme proposé, a été développé pour décrire la cinétique de l'hydrolyse des peptides de la famille α 1-32. Les constantes cinétiques des différentes réactions ont pu être identifiées à partir des données expérimentales. Les résultats obtenus et le modèle proposé offrent la possibilité de contrôler le procédé d'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine.

[1] Estelle Yaba Adje, Rafik Balti, Mostafa Kouach, Pascal Dhulster, Didier Guillochon, Naïma Nedjar-Arroume. *Int. J. Biol. Macromol.*, 49 (2011) 143–153.

[2] Daoud R, Dubois V, Bors-Dodita L, Nedjar-Arroume N, Krier F, Chihib N, et al. *Peptides*, 26 (2005) 713–9.

[3] Piot JM, Zhao QY, Guillochon D, Ricart G, Thomas D. *Biochem Biophys Res Commun*, 189 (1992) 101–10.

[4] Sazonova OV, Blishchenko EY, Kalinina OA, Egorova NS, Suruvoy AY, Philippova MM, et al. *Protein Pept Lett*, 10 (2003) 386–395.

ANNEXE 10



Cinétique réactionnelle de l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine bovine



Arroume N^a, Kriaa K^b, Hedhili K^{a,c}, Vauchel P^a, Dimitrov K^a, Nikov P^a, Dhulster P^a

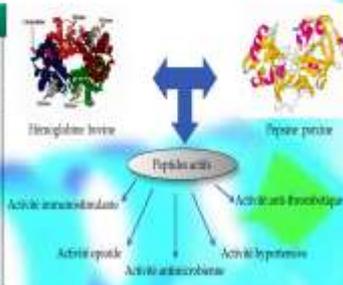
a Laboratoire ProBioGEM, USTL, Polytech Lille, avenue Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq

b Groupe de Génie des Procédés Agro-alimentaires, Unité de Recherche en Mécanique des Fluides Appliquée et Modélisation, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, BP 'W' 3038 Sfax, Tunisie

c Unité de Recherche Mycotoxicologie-maladies métaboliques héréditaire, Faculté de Médecine de Sousse, rue Mohamed Karoui, 4002, Sousse, Tunisie

Introduction

Plusieurs peptides bioactifs peuvent être obtenus par hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine, les peptides d'intérêt ont été identifiés et classés en plusieurs familles. La famille dérivée du peptide α 1-32 donne des peptides antibactériens et non toxiques pouvant être employés comme préservatifs pour le stockage et la distribution des produits à base de viande.



Objectifs

Identifier le mécanisme réactionnel de l'hydrolyse pepsique du peptide α (1-32) et proposer un modèle numérique permettant de décrire la cinétique de production des peptides actifs issus de cette chaîne afin de favoriser l'obtention des peptides d'intérêt, présentant une activité biologique prononcée.

Identification des paramètres cinétiques

Schéma réactionnel de l'hydrolyse pepsique du peptide α (1-32)

Système d'équations différentielles :

$$\frac{dI_{1-32}}{dt} = -(k_1 + k_2)I_{1-32}$$

$$\frac{dI_{1-29}}{dt} = k_1 I_{1-32} - (k_3 + k_4 + k_5) I_{1-29}$$

$$\frac{dI_{1-23}}{dt} = k_2 I_{1-32} + k_3 I_{1-29} - k_7 I_{1-23}$$

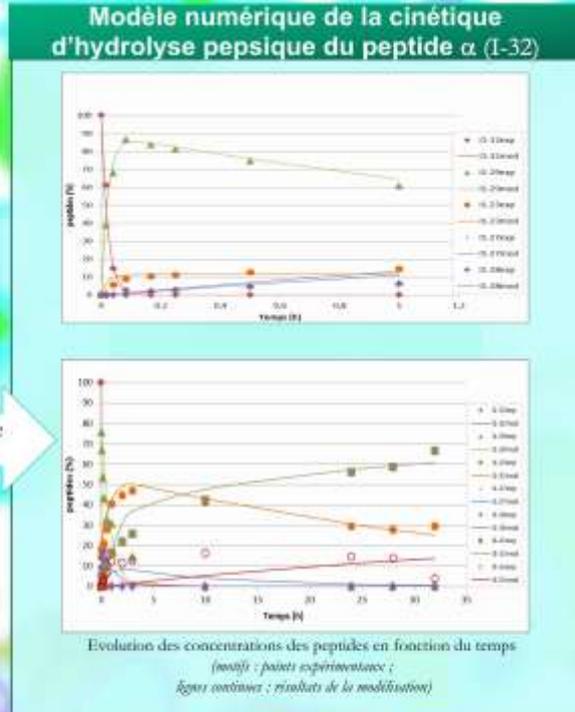
$$\frac{dI_{1-27}}{dt} = k_4 I_{1-29} - k_{10} I_{1-27}$$

$$\frac{dI_{1-28}}{dt} = k_5 I_{1-29} - k_{11} I_{1-28}$$

$$\frac{dI_{5-23}}{dt} = k_6 I_{1-23} + k_{11} I_{1-28}$$

$$\frac{dI_{3-23}}{dt} = k_7 I_{1-23}$$

Résolution du système différentiel



Conclusion

Le modèle numérique de la cinétique d'hydrolyse pepsique du peptide antimicrobien α 1-32 permet de définir les conditions optimales pour favoriser la production des peptides intermédiaires ayant des activités biologiques intéressantes et d'estimer la production des peptides actifs en fonction de la quantité d'hémoglobine.

XIII^{ème} Congrès de la Société Française de Génie des Procédés (SFGP), Lille, France, du 29/11 au 01/12, 2011

