

THESE en CO-TUTELLE

Réalisée à

L'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax

(Unité Enzymes et Bioconversion)

&

L'Ecole Polytechnique de Lille

(Laboratoire des Procédés Biologiques Génie Enzymatique et Microbien)

en vue de l'obtention du

DOCTORAT

Spécialités

Génie Biologique - Ingénierie des Fonctions Biologiques

Par

Assaâd SILA

**Récupération de biomolécules d'origine aquatique en
vue d'une valorisation comme ingrédients fonctionnels
dans les domaines alimentaire et pharmaceutique**

Soutenu le 28/02/2015, devant le jury composé de :

Mr.	Hamadi Attia	Professeur, Université de Sfax	Président
Mme.	Stéphanie Bordenave-Juchereau	MC-HDR, Université de La Rochelle	Rapporteur
Mr.	Souhail Besbes	MC-HDR, Université de Sfax	Rapporteur
Mr.	Raoui Mounir Maaroufi	Professeur, Université de Monastir	Examineur
Mr.	Ali Bougateg	MC-HDR, Université de Sfax	Directeur de thèse
Mme.	Naima Nedjar-Arroume	Professeur, Université Lille1	Directeur de thèse

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Situation mondiale des ressources halieutiques -----	5
II. Situation nationale des ressources halieutiques -----	6
III. Espèces étudiées -----	6
III.1. La crevette rose du large : <i>Parapenaeus longirostris</i> -----	6
III.2. Le barbeau : <i>Barbus callensis</i> -----	8
IV. Les sous-produits d'origine aquatique: voies de valorisation -----	10
IV.1. Huile de poissons-----	11
IV.2. Farine de poissons-----	11
IV.3. Protéases digestives-----	12
IV.4. Fibrine adhésive pour les tissus humains-----	14
IV.5. Protéines antigél-----	14
IV.6. Hachis-----	15
IV.7. Lécithines aquatiques-----	15
IV.8. Hormones peptidiques-----	16
IV.9. Collagène et gélatine-----	16
IV.10. Minéraux-----	17
IV.11. Extraits et concentrés aromatiques-----	18
IV.12. Chondroïtine sulfate-----	18
IV.13. Chitine et chitosane-----	19
IV.14. Ingrédients cosmétiques-----	20
IV.15. Pigments-----	21
IV.16. Hydrolysats protéiques-----	21
V. Les Caroténoïdes -----	23
V.1. Généralités-----	23
V.2. Structure chimique-----	24
V.3. Nomenclature-----	25
V.4. Organismes producteurs-----	26
V.5. Différents types de caroténoïdes-----	27
V.5.1. Les carotènes-----	27
V.5.2. Les xanthophylles-----	28
V.6. Focus sur l'astaxanthine-----	29
V.6.1. Définition-----	29
V.6.2. Méthodes d'extraction de l'astaxanthine-----	29
V.6.3. Propriétés biologiques de l'astaxanthine-----	30
VI. Les peptides bioactifs -----	32
VI.1. Généralités-----	32
VI.2. La synthèse de peptides-----	33
VI.3. La production de peptides par protéolyse-----	33

VI.4. Applications biotechnologiques des peptides	34
VI.4.1. Support de milieu de culture microbienne	34
VI.4.2. Nutrition animale	34
VI.4.3. Nutrition humaine	34
VI.4.4. Bioactivité	35
VI.5. Peptides et activité antibactérienne	37
VI.5.1. Généralités sur les peptides antibactériens	37
VI.5.2. Classification des peptides antibactériens	39
VI.5.2.1. <i>Les peptides antibactériens anioniques</i>	39
VI.5.2.2. <i>Les peptides antibactériens cationiques</i>	39
VI.5.3. Mécanismes d'action des peptides antibactériens	40
VI.5.3.1. <i>Mécanismes entraînant la déstabilisation de la membrane cytoplasmique</i>	41
VI.5.3.2. <i>Mécanismes sans interaction avec la membrane cytoplasmique</i>	43
VI.6. Peptides et activité antidiabétique	44
VI.6.1. Le diabète : Généralités	44
VI.6.2. Le diabète et les incrétines	45
VI.6.3. Le diabète et la dipeptidyl-peptidase-IV	47
VI.6.4. Le diabète et les peptides anti-dipeptidyl-peptidase-IV	49

RESULTATS & DISCUSSION

Chapitre 1 : Caractérisation et activités biologiques de l'astaxanthine extrait à partir des sous-produits de crevettes

Introduction	52
Résumé 1 : Isolement et caractérisation des caroténoprotéines à partir des sous-produits de la crevette rose du large	54
Article 1 : Isolation and characterisation of carotenoproteins from deep-water pink shrimp processing waste.	
Résumé 2 : Activités antioxydante et antiproliférative de l'astaxanthine extrait à partir des sous-produits de la crevette rose du large (<i>Parapenaeus longirostris</i>)	80
Article 2 : Antioxidant and anti-proliferative activities of astaxanthin extracted from the shell waste of deep-water pink shrimp (<i>Parapenaeus longirostris</i>).	
Résumé 3 : L'astaxanthine extrait à partir des sous-produits de crevettes améliore la néphropathie chez les rats diabétiques	104
Article 3 : Astaxanthin from shrimp by-products ameliorates nephropathy in diabetic rats.	
Résumé 4 : Capacité de l'astaxanthine naturel extrait à partir des sous-produits de crevettes à atténuer le stress oxydatif hépatique chez les rats diabétiques	122
Article 4 : Ability of natural astaxanthin from shrimp by-products to attenuate liver oxidative stress in diabetic rats.	

Chapitre 2 : Les peptides bioactifs d'origine aquatique doués d'activités antibactérienne et anti-DDP-IV

Introduction	147
---------------------------	-----

Résumé 5 : Préparation de peptides antibactériens par hydrolyse enzymatique de protéines de muscle de barbeau : Activité contre quelques bactéries pathogènes.....149

Article 5 : Antibacterial peptides from barbel muscle protein hydrolysates: Activity against some pathogenic bacteria.

Résumé 6 : Activité antibactérienne de nouveaux peptides identifiés à partir d'hydrolysats protéiques de muscle de barbeau : Etude du mode d'action par le mécanisme de la perméabilisation de la membrane contre *Listeria monocytogenes*173

Article 6 : Antibacterial activity of new peptides from barbel protein hydrolysates and mode of action via a membrane damage mechanism against *Listeria monocytogenes*.

Résumé 7 : Purification, identification et étude de la relation structure-fonction des peptides anti-DPP-IV issus de l'hydrolyse enzymatique des protéines de muscle de barbeau199

Article 7 : Purification, identification and structural modelling of DPP-IV inhibiting peptides from Barbel proteins hydrolysate.

CONCLUSION & PERSPECTIVES.....226

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Introduction

La diversité chimique et biologique du milieu aquatique est en fait une extraordinaire source de composés à haute valeur ajoutée utilisables dans de nombreuses applications. Les minéraux, les lipides, les acides aminés, les caroténoïdes, les polysaccharides et les protéines provenant de sources aquatiques ont des caractéristiques uniques, leur plus forte concentration se trouve souvent dans des parties fréquemment rejetées des organismes aquatiques : têtes, viscères, peau, sang ainsi que dans les carapaces ou coquilles des produits de la pêche. La valorisation de ces sous-produits permettrait, en plus du respect de l'environnement, de maximiser le profit des entreprises. Elle consiste à les transformer de façon à ce qu'ils deviennent des matières premières ou des matières intermédiaires pour la production d'autres produits. Ces produits de la pêche sont maintenant considérés comme des matières premières destinées à la production de nouvelles substances utilisables en nutrition animale, en cosmétique et en santé humaine. Certains des composés extractibles ont des applications potentielles en santé humaine mais aussi dans d'autres domaines : nutrition, agent antimicrobien, purification de l'eau etc.

Ces substances bioactives peuvent être issues de manipulation biotechnologique de certains sous-produits aquatiques. Leur hydrolyse enzymatique contrôlée, constitue une approche alternative d'un intérêt stratégique majeur pour réhabiliter ces biomasses et notamment leur fraction protéique. En effet, plusieurs auteurs ont montré qu'à l'issue de cette hydrolyse, la fraction soluble obtenue, appelée «Hydrolysats Protéiques» présente de nouvelles propriétés fonctionnelles (solubilité, propriétés foisonnantes, moussantes, émulsifiantes, etc.), nutritionnelles (digestibilité et allergénicité), organoleptiques (arômes) et/ou biologiques. De nombreux auteurs se sont intéressés à la recherche de peptides bioactifs au sein d'hydrolysats protéiques de produits et sous-produits de la pêche. Parmi les très nombreuses activités biologiques identifiées à ce jour, il convient de noter les suivantes à titre d'exemple: antioxydante ([Girgih et al., 2013](#) ; [Chai et al., 2013](#) ; [García-Moreno et al., 2014](#) ; [Saidi et al., 2014](#); [Liu et al., 2015](#) ; [Chang-Feng et al., 2015](#)), immunostimulante ([Mallet et al., 2014](#) ; [Tang et al., 2015](#)), antihypertensive ([Kittiphattanabawon et al., 2013](#) ; [Lee et al., 2014](#) ; [Balti et al., 2015](#)), antistress ([Pádraigín et al., 2012](#)), antiprolifératrice ([Hung et al., 2014](#) ; [Song et al., 2014](#) ; [Umayaparvathi et al., 2014](#)), antidiabétique ([Li-Chan et al., 2012](#) ; [Huang et al., 2012](#)), satiétogènes ([Bougatef et al., 2010a](#)), et antibactériennes ([Doyen et al., 2012](#) ; [Beaulieu et al., 2014](#)). Par ailleurs, la médecine vétérinaire, la pharmacie humaine, la cosmétologie, l'alimentaire ainsi que la diététique sont les domaines d'utilisation des hydrolysats de poissons.

Une autre alternative de valorisation des sous-produits de la pêche, consiste à extraire les caroténoïdes, essentiellement l'astaxanthine, à partir des sous-produits des crustacés. Les caroténoïdes, sont de longues molécules à caractère lipophile. Ces composés naturels possèdent pour la plupart dans leur structure chimique de très nombreuses doubles liaisons conjuguées qui sont responsables de leur activité antioxydante. Par dégradation oxydative, certains caroténoïdes servent de précurseurs à la vitamine A (rétinol) dont le rôle est primordial dans la perception visuelle. Parmi tous les caroténoïdes, le β -carotène est celui qui possède le plus grand potentiel d'activité pro-vitaminique A. D'autres caroténoïdes peuvent augmenter la réponse anti-inflammatoire (Pashkow et al., 2008 ; Yasui et al., 2011 ; Zhang et al., 2014). Dans différentes lignées cellulaires, certains caroténoïdes (astaxanthine, lycopène, lutéine, zéaxanthine) agissent de manière spécifique et très efficace dans la suppression de tumeurs cellulaires (Yasui et al., 2011 ; Inoue et al., 2012 ; Nagaraj et al., 2012 ; Wang et al., 2013 ; Saw et al., 2013 ; Kavitha et al., 2013). Les caroténoïdes peuvent aussi interagir avec des radicaux lipidiques et inhiber ainsi la peroxydation lipidique (Karppi et al., 2007) et peuvent aussi diminuer le risque de maladie maculaire liée à l'âge (Snodderly, 1995 ; McCarty, 2011 ; Ngo et al 2011). Les caroténoïdes auraient un rôle dans la régulation du système immunitaire (Chew et al., 2011 ; Amar et al., 2012 ; Li et al., 2014) et dans la protection de la stabilité génomique (Choubert et al., 1997 ; Fraser and Bramley, 2004). Ils stimulent en outre la synthèse d'anticorps. L'effet bénéfique des caroténoïdes a été également montré contre les maladies cardiovasculaires (Krinsky et al., 2004 ; Yoshida et al., 2010 ; Khan et al., 2010 ; Monroy-Ruiz et al., 2011).

Le présent travail s'inscrit dans le cadre général de la valorisation biotechnologique de produits et sous-produits de la pêche. Il a pour principal objectif l'obtention de biomolécules à haute valeur ajoutée à usage alimentaire et pharmaceutique. Cette étude se divise en deux chapitres distincts :

- Le premier chapitre est consacré à la mise au point des procédés enzymatique et chimique pour l'obtention de caroténoïdes et d'astaxanthine à partir des sous-produits de crevettes. Plus particulièrement, ce chapitre concerne l'extraction, la purification et la caractérisation de l'astaxanthine à partir des sous-produits de la crevette rose du large (*P. longirostris*). Les activités antioxydantes et antiprolifératives *in vitro* et l'activité antidiabétique *in vivo* ont été étudiées.

- Dans le deuxième chapitre, nous présentons l'apport d'une technique analytique pour l'obtention de peptides bioactifs (antibactériens et anti-dipeptidyl-peptidase-IV) qui repose en général sur l'hydrolyse enzymatique (ou la protéolyse enzymatique) ménagée de protéines, suivie de méthodes systématiques de fractionnement, purification et de tests biologiques. Les masses moléculaires ainsi que les séquences des peptides purifiés ont été déterminées par spectrométrie de masse (ESI/MS) et par spectrométrie de masse en tandem (ESI/MS/MS).

Etude bibliographique

I. Situation mondiale des ressources halieutiques

La pêche et l'aquaculture contribuent de façon déterminante au bien-être et à la prospérité des habitants du monde. Ces dernières 50 années, l'offre mondiale de poisson de consommation a progressé à un rythme supérieur à la croissance démographique mondiale, et le poisson constitue aujourd'hui une source importante d'aliments nutritifs et de protéines pour une grande partie de la population mondiale (FAO, 2012). Les produits de la pêche font partie des denrées alimentaires de base les plus échangées dans le monde. En 2011, les échanges ont atteint de nouveaux records, en volume et en valeur, et devraient continuer d'augmenter. Grâce à la croissance soutenue de la production des produits de la pêche et à l'amélioration des canaux de distribution, l'offre mondiale de poisson de consommation a progressé de manière spectaculaire depuis 50 ans, avec un taux moyen de croissance de 3,2% par an sur la période 1961-2010. L'offre mondiale de poisson de consommation par habitant est passée d'une moyenne de 9,9 kg (équivalent poids vif) dans les années 60 à 18,6 kg en 2010.

En 2010, les pêches et l'aquaculture ont procuré des moyens d'existence et des revenus à environ 54,8 millions de personnes travaillant dans le secteur primaire de la production de poisson (FAO, 2012). En dehors du secteur de production primaire, les pêches et l'aquaculture offrent de nombreux emplois dans des activités auxiliaires telles que la transformation, le conditionnement, la commercialisation, ou encore la recherche et l'administration. Il est estimé que tous ces emplois, ainsi que les activités secondaires, pourvoient à la subsistance de 660 à 820 millions de personnes, soit environ 10 à 12% de la population mondiale.

Selon l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, les pêches de capture et l'aquaculture ont produit approximativement 154 millions de tonnes de poisson en 2011 dans le monde (90 millions de tonnes provient des pêches de capture et 64 millions de tonnes de l'aquaculture). Depuis les années 90, il y a une stagnation des volumes capturés dans les océans. Par contre si les pêches de capture demeurent stables, la production de l'aquaculture ne cesse d'augmenter (FAO, 2012). Au cours des trois dernières décennies (1980-2010), la production mondiale de poisson d'élevage destiné à la consommation a été multipliée par près de 12, avec un taux de croissance annuel moyen de 8,8 %. Les poissons d'eau douce dominent la production aquacole mondiale (56,4% soit

33,7 millions de tonnes), suivis des mollusques (23,6% soit 14.2 millions de tonnes) et des crustacés (9,6% soit 5,7 millions de tonnes) (FAO, 2012).

II. Situation nationale des ressources halieutiques

La Tunisie est un pays situé sur la rive sud de la méditerranée, avec un emplacement stratégique entre la méditerranée occidentale et centrale. La Tunisie dispose d'un littoral de 1300 kilomètres. La façade orientale couvre près de deux tiers de l'espace maritime tunisien et se distingue par un plateau continental étendu.

La Tunisie accorde au secteur de la pêche une place de choix dans son économie. En effet, ce secteur représente 9% de la valeur de la production agricole, génère 100 000 emplois et occupe le deuxième rang dans les exportations de produits agricoles (40% à 50% des exportations nationales). En 2012, les pêches de capture et l'aquaculture ont produit approximativement 98 milles tonnes et 6 milles tonnes, respectivement (DGPA, 2012). Selon le ministère de l'agriculture et des ressources hydrauliques Tunisienne, il existe environ 41 ports de pêche, 11500 navires de pêche, 30 fermes aquacoles, 119 établissements de conditionnement de produits de la pêche et 18 usines de transformation de produits de la pêche. Les établissements de conditionnement, traitent principalement les crustacés et les céphalopodes. En Tunisie, la consommation des produits de la pêche est de l'ordre de 11 kg /habitant/an (FAO, 2012).

III. Espèces étudiées

III.1. La crevette rose du large : *Parapenaeus longirostris*

Les crustacés occupent une place importante grâce à leur valeur marchande. La pêche de cette ressource ne cesse de se développer et la crevette reste le produit le plus demandé avec 15% de la valeur totale des produits de la pêche échangés au niveau international en 2010. Les crevettes par leur abondance, ainsi que leur haute valeur nutritive et l'exceptionnelle qualité gastronomique de leur chair se trouvent très exploitées (Bekadja et al., 2009).

Les crevettes sont des crustacés décapodes, dont le corps est couvert d'une carapace pigmentée, il existe actuellement plus de 30 000 espèces répertoriées à travers les océans. L'aspect général de la crevette montre deux parties principales : le céphalothorax et l'abdomen :

- Le céphalothorax se compose de deux parties : la tête ou céphalon et le thorax. La région céphalothoracique comporte les organes sensoriels et 5 paires de péréiopodes.

- L'abdomen est composé de 6 segments, seulement les 5 premiers portent des pléopodes.

Parapenaeus longirostris (Photo 1) appartient à l'ordre des décapodes et la famille des pénéidés. Cette crevette est désignée par deep-water pink shrimp en Angleterre, gamba de altura en Espagne, gambero bianco en Italie et la crevette rose du large en France (Holthuis, 1987). En Tunisie, elle est communément appelée crevette rose.

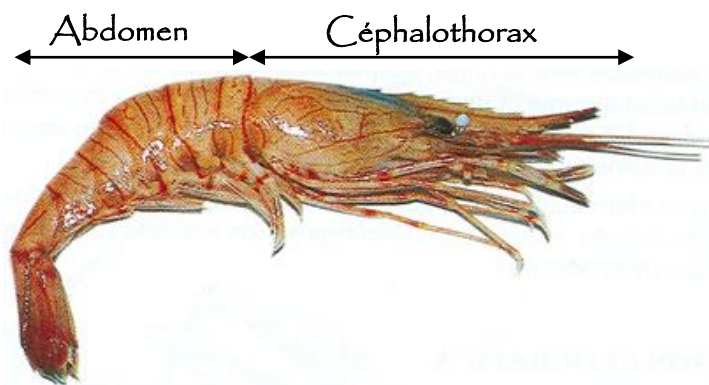


Photo 1 :
Parapenaeus longirostris (Lucas, 1846)

L'aire de distribution de *P. longirostris* est étendue (Figure 1). Cette espèce se rencontre dans tout le bassin méditerranéen. Elle est également répandue dans l'Atlantique oriental et dans l'Atlantique occidental, des Guyanes au Massachusetts (Holthuis, 1987).

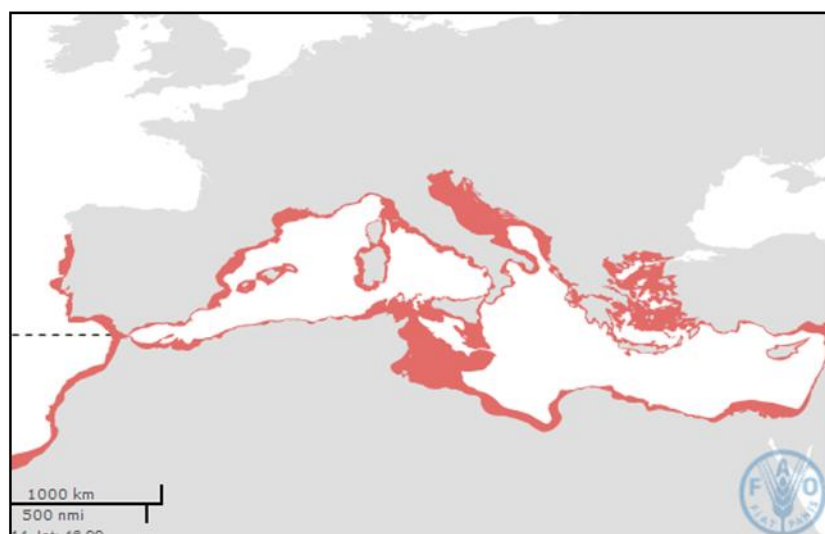


Figure 1 :
Distribution géographique de P. longirostris (FAO, 2012)

P. longirostris a une répartition bathymétrique étendue puisqu'on l'a signalé de 30 à 500 mètres de profondeur. La reproduction et le développement de l'espèce ont été étudiés par Heldt (1938). D'après cet auteur, la ponte a lieu la nuit. Une ponte normale comprendrait 400.000 œufs environ, sphériques, de couleur bleue et non agglutinés. *P. longirostris* est une espèce fréquente et de grande importance commerciale en Tunisie.

D'après Lucas (1846), la crevette rose révèle de la position systématique suivante :

- Embranchement : Arthropodes
- Classe : Crustacés
- Sous-classe : Malacostracés
- Ordre : Décapodes
- Famille : Pénéidés
- Genre : *Parapenaeus*
- Espèce : *longirostris*

III.2. Le barbeau : *Barbus callensis*

Le barbeau, *B. callensis* (Valenciennes, 1842), est une espèce caractéristique de l'Afrique du nord où elle est très bien représentée aussi bien en Algérie qu'en Tunisie et en Maroc. Son nom provient de l'origine du premier spécimen décrit, à savoir le lac Calle en Algérie. Les noms communs de cette espèce sont : boubis (بُوبِيسْ) (arabe) et barbeau (français). Cette espèce colonise aussi bien les retenues de barrages que les cours d'eaux tunisiens. Le barbeau (Photo 2) est caractérisé par :

- Un corps fusiforme, plus au moins comprimé, recouvert d'écailles cycloïdes, dont le nombre et les stries radiales servent de critères de détermination systématique.
- Un œil petit, une bouche bordée d'épaisses lèvres mobiles et munies de deux paires de barbillons, d'où le nom de Barbeau.
- Une ligne latérale habituellement présente et complète.
- Une nageoire dorsale à dernier rayon simple osseux denticulé ou non, dont la forme et les dimensions servent à la diagnose.
- Des os pharyngiens bien développés et pourvus de dents.

- La couleur du corps est brun-jaunâtre à éclat métallique et le ventre argenté (Kraim, 1994).



Photo 2 :
Barbus callensis (Valenciennes, 1842)

Le barbeau se plaît dans les eaux pures et relativement vives mais pas trop froides ; c'est un genre réophile. Les rivières coulant sur un fond de graviers parsemé de pierres, semblent lui fournir les meilleures conditions d'existence.

Le barbeau se nourrit principalement, des algues et quelques débris végétaux pour les tailles les plus petites. Par contre, les adultes peuvent en plus consommer des crustacés. Il s'agit donc d'un régime alimentaire essentiellement omnivore. En pisciculture, le barbeau est utilisé comme poisson fourrage des espèces carnassières. Sa position systématique est la suivante (Nelson, 1994) :

- Phylum : Cordes
- Classe : Osteichthyens
- Sous-classe : Actinopterygiens
- Infra-classe : Teleosteens
- Ordre : Cypriniformes
- Sous-ordre : Cyprinoides
- Famille : Cyprinidés
- Genre : *Barbus*
- Espèce : *callensis*

IV. Les sous-produits d'origine aquatique: voies de valorisation

La politique actuelle des Nations Unies, du sommet de la Terre « Rio+20 » et du code de conduite pour une pêche responsable encouragent à minimiser les rejets. En 2008, la FAO estimait la quantité de rejets mondiaux à 15 millions de tonnes (Kelleher, 2008), soit 10% des captures totales. La principale cause des rejets est la capture d'espèces non ciblées, plus communément appelée pêches accessoires. Des mesures ont été prises de façon à limiter ces captures accessoires, comme l'élaboration de nouveaux filets et le tri des captures à bord. De plus, un marché s'est créé pour certaines espèces de poisson définies comme étant auparavant accessoires. Ces pêches peuvent alors servir pour l'alimentation piscicole, pour la nutrition humaine, pour la fabrication de produits à valeur ajoutée, ou pour combler les vides laissés par la diminution des quotas de certaines espèces non accessoire.

Les sous-produits sont définis comme les parties non utilisées et récupérables lors des opérations traditionnelles de production, et la différence avec un déchet réside dans son devenir. En effet, un sous-produit est destiné à être réutilisé (valorisé), que ce soit dans l'alimentation humaine, animale ou dans tout autre domaine. La tête, la peau, la carapace, les chutes de filetage, les arêtes centrales, les viscères, le foie constituent les principaux sous-produits de la pêche et selon les périodes de pêche, les éléments reproducteurs tels que les œufs ou la laitance peuvent figurer parmi ces sous-produits (Figure 2). Dans un contexte de développement durable mais aussi dans un souci de rentabilité économique, ces sous-produits font depuis plusieurs années l'objet de l'attention des industriels qui aimeraient en tirer bénéfices. L'analyse des compositions proximales de ces matières « secondaires » fait ressortir l'existence de très nombreuses molécules ou groupes de molécules potentiellement valorisables notamment des protéines, des fractions lipidiques, des vitamines, des minéraux, des caroténoïdes, mais aussi des composés bio-actifs qui ont des propriétés bénéfiques pour la santé humaine et animale (Dumay, 2004 ; Shahidi, 2006). Compte tenu de l'importance des sous-produits, de nombreux efforts ont été réalisés pour les utiliser dans diverses applications: l'alimentation animale ou humaine, la diététique, la nutraceutique, la pharmaceutique, le cosmétique et d'autres applications (Andrieux, 2004). C'est pour cela, l'industrie de valorisation des ressources halieutiques apparaît aujourd'hui comme une composante d'avenir de la filière pêche. Les procédés de valorisation des sous-produits de la pêche sont nombreux et très variés.

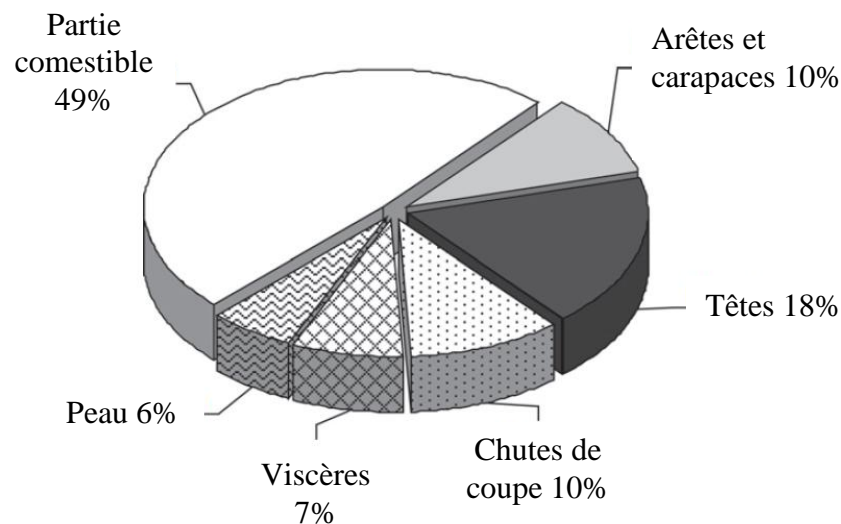


Figure 2 :
Répartition moyenne de la partie comestible et sous-produits de la pêche
(Rustad, 2007)

IV.1. Huile de poissons

La production mondiale d'huile de poissons se situait à environ un million de tonnes (FAO Globefish, 2009). Les huiles de poisson sont naturellement riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) dont certains acides gras essentiels. L'huile de foie de poissons, naturellement riche en vitamines D et A, favorise la fixation de calcium et participe à la consolidation des os et des dents. La vitamine A joue aussi un rôle dans le mécanisme de la vision. L'huile de foie de poissons est particulièrement bénéfique pour la croissance des enfants. Les huiles de poisson sont surtout utilisées : en lipochimie comme graisse industrielle ; en alimentation animale et elles peuvent aussi être raffinées pour être utilisées dans d'autres domaines. Les huiles de poissons sont riches en acides gras oméga 3 à longue chaîne et particulièrement en C20: 5 ω 3 (acide eicosapentaénoïque ou EPA) et C22: 6 ω 3 (acide docosahexaénoïque ou DHA). A l'aide d'étapes de filtration et de concentration, les acides gras de cette famille sont peu à peu concentrés. Ces concentrés sont encapsulés et commercialisés sous la forme de compléments alimentaires ou formulés dans des aliments dénommés « aliments fonctionnels » tels des boissons, des soupes, des céréales ... (Johnson, 2002 ; Dumay, 2004).

IV.2. Farine de poissons

Cette valorisation est actuellement la plus importante, car tous les sous-produits peuvent être utilisés sans distinction, aucun tri n'est nécessaire. En 2009, la production

mondiale de farines de poissons a varié de 4,9 à 6,3 millions de tonnes sur les 5 dernières années (FAO Globefish, 2009).

Les farines de poisson sont un produit solide (poudre) obtenu à partir de poissons ou de sous-produits de poissons par un procédé qui vise à séparer les fractions solide, huileuse et aqueuse de la matière première. La fabrication de la farine consiste en une cuisson de la matière première dans de l'eau bouillante, un pressage pour extraire l'excès de l'eau et des lipides suivi d'un séchage. Le produit séché est ensuite broyé et tamisé (FAO, 1990). Les rendements dépendent fortement des matières premières utilisées et de la saison (en moyenne 20%). Cette farine trouve plusieurs applications biotechnologiques :

❖ Alimentation animale

L'alimentation animale est le principal débouché de ce type de production. En effet, en raison de leur richesse en protéines, en acides aminés essentiels et en minéraux, les farines de sous-produits de la pêche sont très appréciées pour leurs hautes digestibilités et leur richesse naturelle en éléments nutritionnels (Gernat et al., 2001). Les quantités de farine de poisson utilisées comme aliment pour crevettes et poissons sont évaluées à environ 43 000 tonnes et 50 000 tonnes, respectivement (Dao et al., 2005).

❖ Usage microbiologique

Outre l'utilisation de la farine de sous-produits de la pêche dans l'alimentation animale, elle est également destinée à l'usage microbiologique. La farine de sous-produits de la pêche introduite comme substrat carboné et/ou azoté dans plusieurs milieux de culture de certaines souches bactériennes et fongiques favorise d'une part leur croissance et d'autre part la production de substances présentant un intérêt biologique (acides aminés, antibiotiques, chitinases, protéases, etc) (Yen et al., 2006 ; Wang et al., 2008). En Tunisie, l'emploi de cette farine comme substrat de fermentation pour la production de protéases et de chitinase d'origine microbienne permet non seulement de limiter au maximum l'importation des produits habituellement utilisés dans la préparation des milieux de culture mais, également, favoriser à coût moindre la production de ces enzymes qui trouvent ces années plusieurs possibilités d'applications industrielles.

IV.3. Protéases digestives

Les protéases sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons peptidiques et permettent ainsi le clivage de protéines. Il existe 2 familles de protéases, les exoprotéases qui hydrolysent les liaisons peptidiques par l'extrémité N-terminale ou C-terminale de la

protéine et les endoprotéases qui hydrolysent les liaisons peptidiques internes. Les endoprotéases sont ensuite classées selon la nature de leurs acides aminés fonctionnels, arrangés dans une certaine conformation tridimensionnelle pour former le site catalytique. Parmi elles il existe les quatre classes suivantes: Protéases à sérine, protéases à cystéine, métalloprotéases et protéases à acide aspartique.

La récupération des protéases à partir de poissons et d'invertébrés aquatiques et leur caractérisation s'est accrue durant ces dernières années (Bougatef et al., 2007 ; Balti et al., 2009 ; Bougatef, 2013) et a donné naissance à de nouveaux usages biotechnologiques de ces enzymes surtout dans le domaine de la technologie alimentaire (Castillo-Yañez et al., 2004). Les sous-produits de poisson sont des sources importantes d'enzymes protéolytiques. Les protéases représentent le plus important groupe des enzymes industrielles utilisées dans le monde aujourd'hui. Elles constituent environ 50% du volume d'enzymes de ce marché (Rao et al., 1998). Les protéases ont diverses applications dans les industries du détergeant, alimentaire, agrochimique et pharmaceutique (Zukowski, 1992 ; Gupta et al., 2002). Les viscères, l'un des plus importants sous-produits de l'industrie de poissons, ont une large potentialité biotechnologique. Les plus importantes enzymes protéolytiques des viscères de poisson sont la pepsine (une protéase aspartique) et les sérines protéases telles que la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase (Gildberg, 1988 ; Martinez and Serra, 1989). La plupart des protéases de poissons et d'invertébrés aquatiques sont également présentes chez les organismes terrestres (Haard, 1998). Cependant, plusieurs différences au niveau de la masse moléculaire, la composition en acides aminés, le pH optimum, la température optimale, la stabilité, les caractéristiques d'inhibition et les propriétés catalytiques ont été observées entre les deux groupes (De-Vecchi and Coppes, 1996 ; Bougatef, 2013). Les enzymes digestives des viscères ont une grande activité catalytique dans de variables conditions de pH et de température (Gildberg, 1992 ; Shahidi and Kamil, 2001). Les enzymes protéolytiques les plus étudiées chez les poissons et les invertébrés aquatiques sont les protéases gastriques (pepsine, chymosine,...) intestinales et hépatopancréatiques (trypsine, chymotrypsine,...) (Haard, 1994 ; Benjakul et al., 2000 ; Kishimura and Hayashi, 2003 ; Castillo-Yanez et al., 2005 ; Bougatef et al., 2008 ; Balti et al., 2009 ; Bougatef et al., 2010b). Les protéases constituent une classe importante d'enzymes à large potentiel d'applications industrielles. Le choix de la protéase est basé notamment sur le coût, la spécificité vis-à-vis du substrat et les optima de pH et de température et la sensibilité aux inhibiteurs et aux activateurs (Simpson and Haard, 1985).

Cependant, l'utilisation des sous-produits de la mer comme source potentielle d'enzymes industrielles est associée à quelques limitations à savoir la disponibilité saisonnière, la variation de l'activité enzymatique selon la nature de l'alimentation de poissons et l'état de fraîcheur de la matière première (Simpson et al., 1991). À titre d'exemple, une société islandaise, Zymetech Inc., commercialise un produit en crème ou gel à base d'une enzyme (protéase) provenant de la morue. Le produit en question, Penzim, aurait des propriétés hydratante et apaisante. Le produit serait utile pour contrer l'inflammation et la douleur, aiderait la guérison des blessures et serait même anti-âge. Il se vend près de 30 \$US pour 100 grammes. En Islande, plusieurs enzymes marines passeraient à l'échelle pilote pour des tests de marché et d'applications (Arason, 2003).

IV.4. Fibrine adhésive pour les tissus humains

La fibrine est une protéine filamenteuse qui dérive du fibrinogène (protéine qui intervient, entre autres, dans le mécanisme de la coagulation du sang). Des études ont été menées pour développer un adhésif pour tissus humains à partir de la fibrine présente dans le sang du saumon de l'atlantique. Ce type de produit sert à prévenir les hémorragies suite à une chirurgie ou encore suite à une blessure importante. Actuellement, sur le marché, nous retrouvons des adhésifs pour sceller les tissus humains à base de sang de mammifères. Les maladies sont plus facilement transmissibles de mammifères à mammifère, d'où l'intérêt de développer un produit adhésif à partir du sang de poisson. Il existe déjà des brevets pour cette technologie. Il est possible que la fibrine se retrouve dans le sang d'autres espèces apparentées telles les ombles, ce qui pourrait être une piste de développement potentiel.

IV.5. Protéines antigél

Les protéines antigél ont la capacité de modifier la croissance des cristaux de glace dans une matrice organique ce qui apporte une stabilisation de celle-ci dans un intervalle de température défini ainsi que l'inhibition de la recristallisation de la glace (Griffith and Ewart, 1995). Toujours selon ces mêmes auteurs, les protéines antigél peuvent aussi aider à la réduction des croissances bactériennes. De telles protéines ajoutées aux aliments qui doivent être congelés peut grandement améliorer leur apparence, leur texture, leur conservation et réduire les pertes nutritives en réduisant les dommages cellulaires.

Fletcher et al. (1999) notent aussi les applications potentielles suivantes : protection contre le froid des cellules, tissus et organes de mammifères, destruction accentuée de cellules cancéreuses pendant la cryochirurgie, amélioration des caractéristiques de croissance dans les poissons transgéniques en utilisant les gènes promoteurs des protéines antigel. Ce type de protéine peut être extrait de poisson d'eau froide, telles la plie rouge et le loup de l'atlantique. On retrouve ces protéines dans le sang et la peau des poissons d'où elles peuvent être extraites par procédés physicochimiques. Il existe plusieurs types de protéines antigel et chacune d'elle possède des propriétés spécifiques. Il est donc possible de choisir la protéine appropriée à l'application ciblée. Elles peuvent être ajoutées directement aux aliments ou par transfert de gènes. A/F Protein Canada Inc. est un exemple de compagnie qui offre des protéines antigel d'origine marine pour la recherche et développement (<http://www.afprotein.com/products.htm>).

IV.6. Hachis

Les hachis sont destinés à la fabrication d'aliments pour animaux domestiques essentiellement les chats. Lors de la fabrication, les sous-produits sont broyés, filtrés puis congelés en bloc (Suzanne, 1998). Les hachis sont une très bonne source de protéines et ils sont utilisés par l'industrie du petfood (animaux de compagnie) et représentent en tonnage la 3^{ème} voie de valorisation des sous-produits marins en France avec environ 30000 tonnes par an (Andrieux, 2004).

IV.7. Lécithines aquatiques

Les phospholipides sont présents dans les membranes cellulaires de tous les organismes mais seraient en proportion supérieure dans les têtes de poissons. Ils sont souvent nommés «lécithines» lorsqu'ils sont utilisés comme additifs en agroalimentaire. Ils ont un rôle texturant grâce à leur pouvoir émulsifiant. De plus, ils présentent des activités biologiques, telle que l'activité antibactérienne (Tamehiro et al., 2002). Les propriétés attribuées à ces phospholipides sont d'ordre médical : prévention des maladies cardiovasculaires par réduction du taux de cholestérol sanguin, optimisation du développement des cellules nerveuses cérébrales chez le fœtus et l'enfant. Il semblerait que la biodisponibilité alimentaire des acides gras poly-insaturés oméga 3 soit améliorée sous cette forme chimique. De plus, leur propriété émulsifiante est intéressante pour

l'alimentation et pour la cosmétique (fabrication de lysosomes pour véhiculer des principes actifs en soins cutanés).

IV.8. Hormones peptidiques

Les viscères, organes digestifs, cerveaux et organes endocrines présentent un intérêt supplémentaire du fait de leur très grande richesse en un certain nombre de peptides hormonaux et neuropeptides dont certains font déjà l'objet d'une utilisation thérapeutique (Thomas et al., 2012). Ainsi, la calcitonine est une hormone hypocalcémiante et hypophosphatémiante utilisée comme inhibiteur de la destruction osseuse (ostéoporose, maladie de Paget) ou comme antalgique dans les cas de métastases osseuses (d'Herbomez, 2011). L'extraction d'hormones aquatiques est un secteur à forte valeur ajoutée en croissance du fait de l'intérêt biologique marqué de ces molécules.

IV.9. Collagène et gélatine

Le collagène est le constituant principal de la peau, les arrêtes et les tissus conjonctifs. Il est formé de fibrilles constituées de trois longues hélices alpha reliés entre elles par des liaisons hydrogènes inter chaînes (Figure 3). Chaque chaîne de l'hélice est orientée dans le sens inverse de l'aiguille d'une montre.

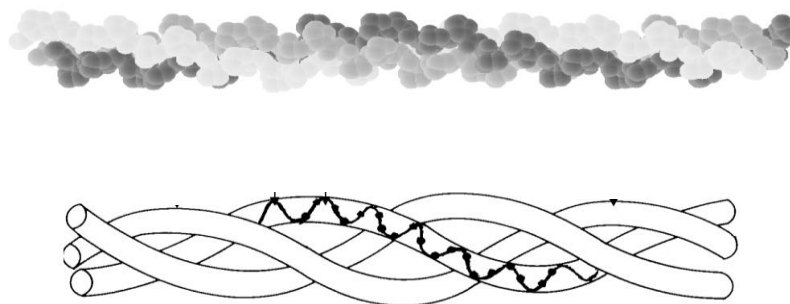


Figure 3 :
Triple hélice du collagène : assemblage des trois chaînes α (Gorham, 1991)

La gélatine n'est pas une protéine de nature mais elle dérive du collagène. La gélatine est préparée par hydrolyse partielle du collagène natif. Au cours du procédé de fabrication de la gélatine, la matière première brute d'origine animale (peau, os, cartilage ou ligament) est traitée avec un acide ou une base diluée, aboutissant à un clivage partiel

des liaisons, ce qui conduit à des modifications de la structure spatiale de la protéine et l'obtention du collagène hydrosoluble à chaud, appelé gélatine (Schrieber and Gareis, 2007). La gélatine extraite à partir des sources aquatiques se présente comme une alternative possible à la gélatine bovine (Balti et al., 2011 ; Bougatef et al., 2012a ; Wu et al., 2013 ; Shyni et al., 2014). Un des avantages majeurs de la gélatine d'origine aquatique est qu'elle n'est pas associée au risque de la maladie de la vache folle (Encéphalite Spongiosa Bovine). De plus, la gélatine extraite à partir des produits de la mer est acceptable par l'Islam. En outre, la peau est un déchet généré en grande quantité par les industries de transformation de produits de la mer, qui représente un problème environnementale, pourrait se présenter comme une nouvelle source pour l'extraction de la gélatine (Badii and Howell, 2006). Les peaux des organismes aquatiques et spécialement des poissons contiennent une large quantité de collagène. Nagai et al. (2000) a rapporté que les quantités du collagène de la peau du bar Japonais, maquereau du Pacifique et le requin dormeur sont de l'ordre de 51,4%, 49,8% et 50,1%, respectivement. La production de la gélatine à partir des poissons par des extractions acides et ses applications industrielles datent depuis 1960 (Norland, 1990).

IV.10. Minéraux

Les compléments en minéraux permettent de compléter l'alimentation, de l'homme comme de l'animal, en calcium, phosphore ou magnésium. Ils sont issus des arêtes osseuses et des écailles. Les minéraux obtenus lors de la déminéralisation des carapaces de crevettes pourraient être valorisés.

Les complexes dérivés du calcium, tel que l'aragonite, l'hydroxyapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) et son précurseur, le brushite (CaHPO_4), sont utilisés comme matériel de substitution en médecine. Ces biomatériaux sont à la fois actifs et permettent de remplacer des tissus osseux ou des dents, c'est la raison pour laquelle ils sont aussi nommés «ciment» (Kirk-Othmer, 2009). Ils peuvent être intégrés sous forme de nanoparticules (Maity et al., 2011), fibres (Zhang and Darvell, 2011) ou associés avec des polymères, dont le chitosan (Peña et al., 2006 ; Paduraru et al., 2011). Ils sont généralement injectés liquides ou visqueux dans l'organisme où ils se solidifient (Komath and Varma, 2003). La solidification est progressive et dépend du pH. Les calcium-orthophosphates sont indiqués comme ciment de reconstruction des tissus car ils sont biocompatibles et donc évitent les risques de rejets par l'organisme. Ainsi, ils sont indiqués pour les cas d'athérosclérose et de

décalcification dentaire. Enfin, il faut également signaler qu'ils sont d'excellents engrais (Dorozhkin, 2007). Des instituts tels que le « British Calcium Carbonates Federation » au Royaume-Uni se sont dédiés aux voies d'applications de ces biomatériaux d'origine marine.

IV.11. Extraits et concentrés aromatiques

Les extraits et les concentrés aromatiques aquatiques sont de plus en plus demandés dans le monde (Johnson, 2002). Deux principes de fabrication cohabitent : le premier qui vise à sécher la matière par cuisson puis à broyer le produit conduit à l'obtention d'une poudre aromatique peu soluble ; le deuxième au contraire consiste à mettre en contact la matière première et l'eau puis à récupérer cette eau et à concentrer puis sécher les matières organiques dissoutes afin d'obtenir un extrait soluble. Certains acides aminés sont responsables de notes aromatiques spécifiques aux crustacés (Narayan et al., 2010). Par conséquent, ils constituent des ingrédients intermédiaires pour l'agroalimentaire, comme compléments aromatiques incorporés dans des plats cuisinés. Ces composés peuvent être valorisés à partir de jus de cuisson issus des procédés de transformations des produits aquatiques (Cros et al., 2004). De très nombreux produits d'origine aquatique sont ainsi produits à partir de saumon, de morue, des anchois, du thon, des crevettes, du homard, du crabe, du calmar, des pétoncles, des huîtres... Ces produits dérivés sont destinés à être incorporés dans la formulation de plats cuisinés, soupes, fumets et sauces, ou à être utilisés pour l'aromatisation du surimi. Les sous-produits peuvent ainsi être valorisés à la condition impérative qu'ils soient de qualité et propre à la consommation humaine. Un tri rigoureux par espèce doit être fait, hormis pour les poissons blancs, et seules les viscères sont exclues. Ces produits font l'objet d'une importante concurrence internationale, mais l'augmentation de la tendance du « prêt-à-consommer » renforce les potentialités de développement.

IV.12. Chondroïtine sulfate

La chondroïtine sulfate est une protéine impliquée d'une part dans la tonicité des tissus de soutien (résistance et élasticité) et d'autre part dans le mécanisme de constitution de la structure cartilagineuse et de la croissance osseuse. Sous forme d'aliment fonctionnel, elle permettrait d'adjoindre, à une réduction de la douleur et une amélioration de la fonction articulaire, une protection structurelle de l'articulation chez les patients atteints

d'arthrose (maladie des articulations), et d'autre part de favoriser la résistance et l'élasticité des artères. Cette protéine est extraite des cartilages de raies et requins grâce à un procédé de chimie fine.

IV.13. Chitine et chitosane

Les sous-produits de crustacés représentent plus de 50 % du poids frais (Wang et al., 2011). Ce volume constitue une ressource abondante de chitine. Ce polysaccharide ancien constitue l'exosquelette des crustacés. La production de chitine se situe en majorité en Asie-Pacifique. En 2004, on répertoriait 63 producteurs de chitine ayant une place importante sur le marché mondial. Le Japon est le premier producteur (FAO, 2010).

La chitine est un polymère formé d'une répétition d'unités de N-acétyl-D-glucosamine. C'est le second composé organique le plus abondant, après la cellulose, sur la terre (Muzzarelli, 1977). La chitine est obtenue suite à une déminéralisation et une déprotéinisation et pour aboutir au chitosane une désacétylation est toujours nécessaire. La présence d'un groupement amine sur les oses de la chaîne fait de la chitine et du chitosane, son produit de transformation, les seuls sucres cationiques. Le chitosane et la chitine sont de même structure chimique globale et se distinguent par le nombre d'unités désacétylées (Ravi Kumar, 2000). Le chitosane se distingue de la chitine par l'élimination du groupement acétyle (Figure 4).

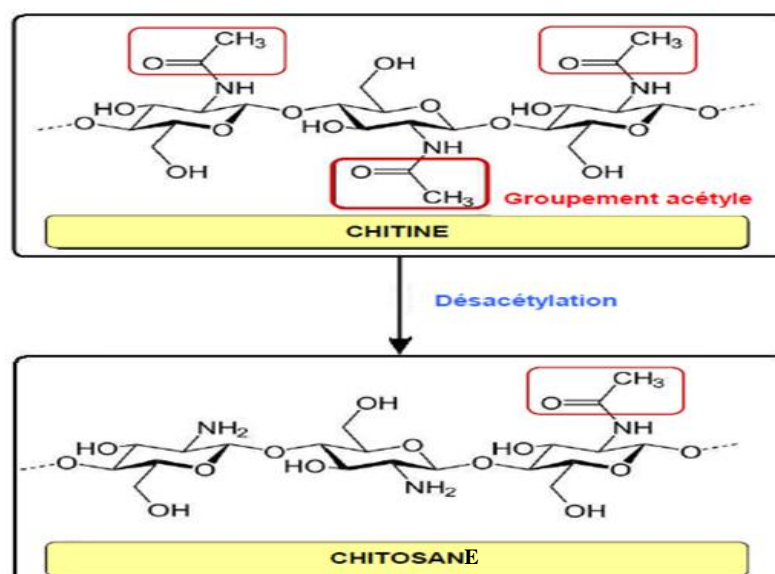


Figure 4 :
Structures chimiques de la chitine et du chitosane (Ravi Kumar, 2000)

Par rapport à la chitine [β (1-4) N-acétyl-D-glucosamine], le chitosane est un copolymère linéaire de [β (1-4) N -D-glucosamine] (Hirano, 1999). Cette modification permet au chitosane d'être soluble dans des solutions de pH inférieur à 6,2. La frontière entre la chitine et le chitosane n'est pas bien définie puisque la chitine contient souvent certains groupements déacétylés et vice-versa pour le chitosane. Une des caractéristiques pour distinguer les deux polymères est le degré de désacétylation nécessaire pour permettre une solubilisation du chitosane dans une solution acide qui est autour de 50% (Lévesque, 1995). D'autres n'appellent chitosane que les polymères de chitine déacétylés à plus de 75% (Khan, 2010). Les sous-produits de crustacés (crabes, crevettes) sont les principales sources de chitine (Minke and Blackwell, 1978). On retrouve également la chitine dans les carapaces des invertébrés marins, les carapaces des insectes de même que dans les champignons et les levures.

Dans sa structure, la chitine des carapaces de crevettes est souvent liée aux autres constituants majeurs de la carapace, formant des liens covalents avec les protéines et une matrice complexe renfermant du carbonate et du phosphate de calcium (Muzzarelli, 1977). La présence de certains pigments, particulièrement l'astaxanthine, donne la couleur rose-orangée aux carapaces. Comme la chitine n'est pas soluble dans l'eau, ses applications restent limitées. Néanmoins, certains dérivés de la chitine sont solubles dans des solvants aqueux. Les applications de la chitine et du chitosane englobent plusieurs domaines tel que en: Médecine (Dash et al., 2011), agroalimentaires (Kumari and Kayastha, 2011), papeterie (Srinivasa and Tharanathan, 2007), agronomie (Munõz et al., 2009) et en cosmétique (Pereira et al., 1998).

IV.14. Ingrédients cosmétiques

❖ Kératine

La kératine est utilisée pour les soins capillaires et les ongles en tant qu'agent filmogène, tenseur et hydratant. Son extraction se fait à partir des écailles.

❖ Elastine

L'élastine est une structure ligamenteuse associée au collagène. Elle confère une tonicité optimale aux tissus de soutien et stimule la croissance cellulaire. Son utilisation en cosmétologie permet la mise au point de soins préventifs de la dégradation du collagène de la peau. L'extraction de l'élastine se fait essentiellement à partir des nageoires ou des ligaments du thon.

IV.15. Pigments

Une quantité importante de pigments est présente dans l'exosquelette des crustacés. Pour les crevettes, les pigments des crustacés appartiennent à la famille des caroténoïdes, précurseur de la vitamine A. En générale, le pigment majoritaire est l'astaxanthine, entre 63,5 et 92,2 % (Sachindra et al., 2005). Les sous-produits générés lors de la transformation des crevettes, têtes et carapaces, représentent une source importante de ces pigments (Nakkariki, 2006). N'étant pas synthétisés par les animaux, les pigments sont apportés par les aliments notamment sous forme de farine. L'astaxanthine est particulièrement prisé par les éleveurs. Ajouté à l'alimentation des volailles, il colore leur coquille, ou ajouté à celle des saumons, il rougit leur chair (Shahidi, 1995). De plus, son pouvoir antioxydant est largement démontré (Naguib, 2000 ; Guerin et al., 2003 ; Gimeno et al., 2007 ; Sachindra et al., 2007) et souligné par les industries alimentaires, cosmétiques et nutraceutiques (Di Mascio et al., 1991).

IV.16. Hydrolysats protéiques

L'hydrolyse enzymatique est une réaction chimique, catalysée par des enzymes du type hydrolase, au cours de laquelle intervient obligatoirement une molécule d'eau et qui aboutit à la scission d'un composé. L'hydrolyse enzymatique permet de couper les protéines en peptides. Les protéines hydrolysées sont utilisées pour conférer des propriétés nutritionnelles ou fonctionnelles particulières aux aliments (Gildberg et al., 2002). Lors d'une hydrolyse enzymatique, les protéases vont cliver les liaisons peptidiques entre deux acides aminés adjacents dans la séquence primaire d'une protéine, générant ainsi, au moins, deux peptides. Une fois séchés, ces hydrolysats ont un aspect identique à celui des farines. L'hydrolyse des liaisons peptidiques va donc générer la libération des protons H^+ (Figure 5). Cette libération de protons H^+ va induire une acidification du milieu. Ce principe est valable pour les hydrolyses se déroulant à pH supérieur à 6,5 pour que le degré de dissociation des ions $R-N^+H_3$ soit suffisant. Lorsque le pH est inférieur à 6,5, la réaction s'inverse et ce seront des ions HO^- qui seront libérés. Différents facteurs peuvent affecter l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique des protéines. Parmi ces facteurs, il y a la température, le pH, la concentration du substrat et de l'enzyme, le degré d'hydrolyse (DH), la force ionique, la présence ou l'absence de substances inhibitrices ou activatrices, et la quantité d'eau ajoutée (Dumay, 2006).

V. Les Caroténoïdes

V.1. Généralités

Caroténoïde est un mot dérivé de "*Daucus Carota*" le nom latin de la carotte. Les caroténoïdes forment le groupe de pigments naturels le plus important et le plus largement distribué chez les êtres vivants (Ourisson et al., 1987). Plus de 700 caroténoïdes retrouvés sous leur forme naturelle ont été identifiés (Straub et al., 1987). Ce sont des substances liposolubles, ce qui favorise leur intégration directe dans certaines membranes. Les caroténoïdes sont facilement détruits et deviennent incolores sous l'action de hautes températures, de la lumière et de l'oxygène (Choubert, 1997).

La liaison entre le pigment caroténoïde et une protéine confère au complexe un caractère hydrosoluble particulier appelé les caroténoprotéines, qui sont largement distribués chez les crustacés (Ya et al., 1991). Les caroténoprotéines ont été isolées et caractérisées à partir de plusieurs espèces marines, à savoir, l'étoile de mer (*Linckia laevigata*) (Clark et al., 1990), la crevette fées (Velu et al., 2003) et la crevette brune (Chakrabarti, 2002). L'astaxanthine (caroténoïde des crevettes), peut se complexer avec les protéines, les lipides et la chitine (Figure 6).

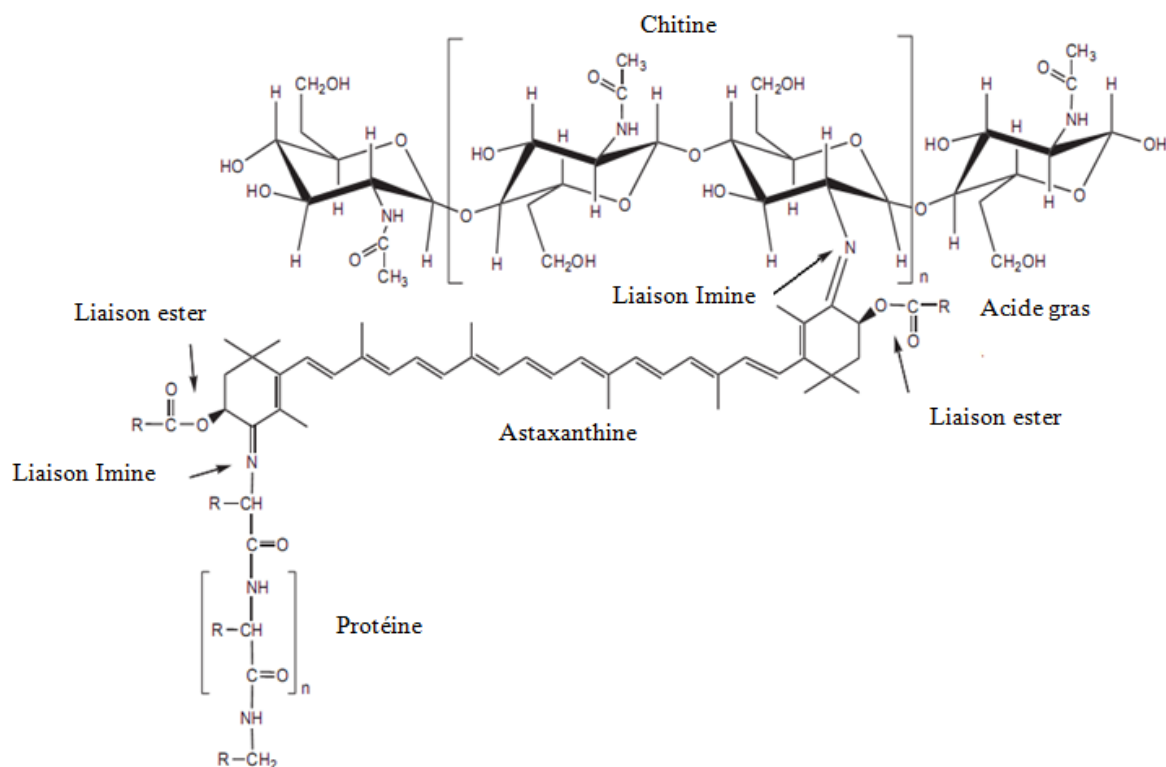


Figure 6 :
Les liaisons chimiques possibles d'un caroténoïde avec d'autres molécules
(Armenta and Legarreta, 2009)

Les caroténoïdes peuvent être extraites par traitement protéolytique à partir des sous-produits de crevettes (Simpson and Haard, 1985 ; Cano-Lopez et al., 1987) ou de crabe (Manu-Tawiah and Haard, 1987). Selon Cano-Lopez et al. (1987), l'utilisation de la trypsine de la morue atlantique dans l'extraction de caroténoïdes à partir des sous-produits de crevettes permet la récupération de 80% de protéines et de 90% d'astaxanthine alors que la trypsine bovine ne permet de récupérer que 65% de protéines et 49% d'astaxanthine, dans les mêmes conditions. Les caroténoïdes peuvent être utilisés comme composé aromatisant ou colorant en industrie alimentaire ou comme additif alimentaire en aquaculture (Simpson and Haard, 1985 ; Ramaswamy et al., 1991 ; Shahidi, 1994).

V.2. Structure chimique

Les caroténoïdes possèdent une structure alicyclique ou aliphatique (Karrer and Jucker, 1950). Ils appartiennent à la famille des terpénoïdes (Figure 7). L'unité de base est l'isoprène composé à 5 atomes de carbone (C₅).

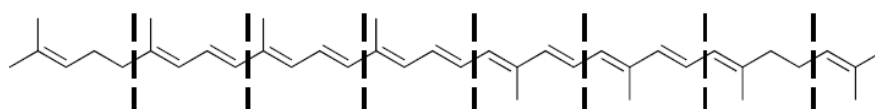


Figure 7 :
Squelette carboné de base des caroténoïdes

Les caroténoïdes sont dans la catégorie des tétraterpènes, car ils sont issus généralement de la condensation de 8 unités de 5 atomes de carbone. Tous les caroténoïdes dérivent de la structure C₄₀H₅₆ suite à des modifications chimiques (oxydations, cyclisations, déshydrogénation, ...). Cette structure chimique originale permet l'existence d'un grand nombre de stéréoisomères qui donnent à chacune des molécules des propriétés physiques et chimiques uniques. Les caroténoïdes sont caractérisées par un grand nombre de doubles liaisons conjuguées qui leur donnent une coloration qui varie du jaune au rouge (Choubert et al., 1997). La présence de ces doubles liaisons est aussi la cause de l'instabilité qui caractérise ces pigments. A l'état naturel, les caroténoïdes sont généralement présents sous la forme E (trans). Sous l'effet de la lumière ou de la chaleur, les caroténoïdes sous forme E sont susceptibles de s'isomériser pour donner des isomères Z (cis) (Sharma and LeMaguer, 1996). On désigne par le terme caroténoïde l'ensemble des carotènes et des xanthophylles (Figure 8) :

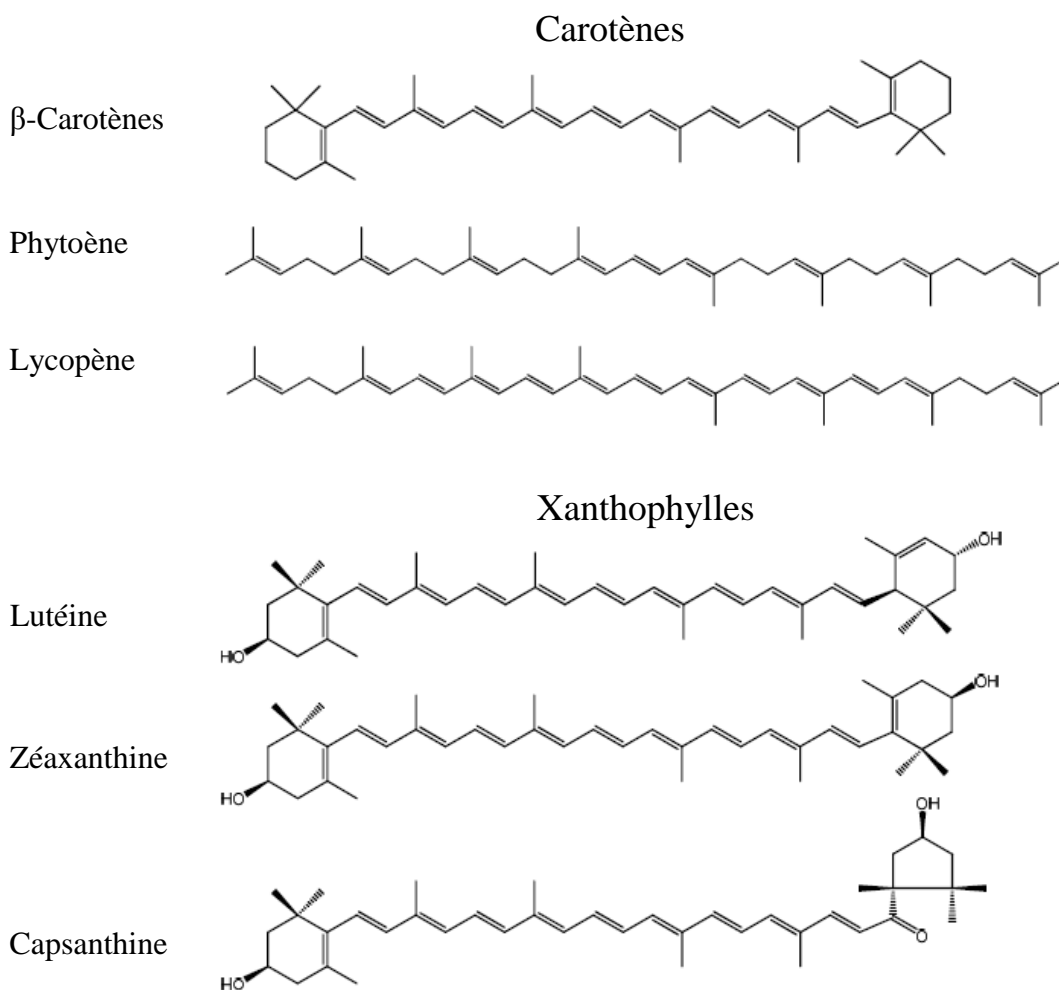


Figure 8 :
Structures chimiques de quelques caroténoïdes

V.3. Nomenclature

Au début, les caroténoïdes portaient des noms triviaux se référant à leur découverte ou à des caractéristiques de la molécule. Pour rendre plus évidente la dénomination de ces molécules, la première nomenclature des caroténoïdes a été publiée en 1971 (Chem, 1971) puis en 1974 elle a été modifiée et publiée dans « *Pure and Applied Chemistry* ». Cette dernière a été approuvée par l'IUPAC/IUB (1975). Le squelette des caroténoïdes est numéroté de 1 à 15 jusqu'au point de symétrie centrale de la molécule puis de 15' à 1'. Les groupements méthyles sont numérotés de 16 à 20 et de même du côté "prime" (Figure 9). Le nom de base de cette structure est "carotène", c'est ce dernier qui est la base nominative de tous les caroténoïdes.

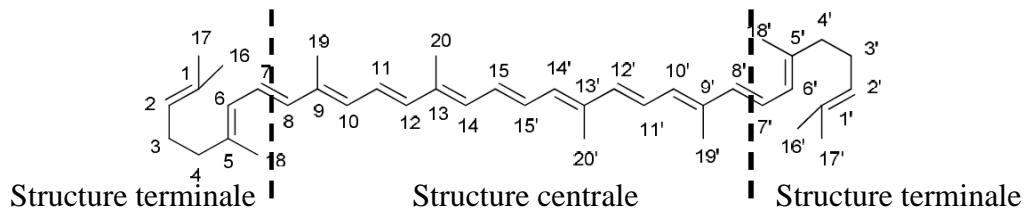


Figure 9 :
Nomenclature et numérotation du squelette des caroténoïdes

V.4. Organismes producteurs

Les caroténoïdes sont synthétisés par les bactéries, les champignons, les algues et les plantes (Goodwin, 1980). Chez les plantes, les caroténoïdes sont clairement observables par la couleur qu'ils donnent aux racines, fleurs et fruits. Ils sont également présents dans les tissus verts mais leur couleur est masquée par celle de la chlorophylle (Britton et al., 1995). Les animaux sont incapables de synthétiser des caroténoïdes. Leur présence chez certains organismes résulte d'une absorption alimentaire (Armstrong and Hearst, 1996). L'influence sur l'organisme et l'importance des pigments caroténoïdes ajoutés à des aliments sont démontrés chez les poissons (Choubert, 1983) et chez les crustacés (Otazu-Abrill and Ceccaldi, 1984). Chez l'homme, 34 formes caroténoïdiennes ont été isolées. Quelques caroténoïdes ainsi que leurs principales sources alimentaires sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1 :
Sources principales de quelques caroténoïdes (Britton et al., 2009).

Caroténoïdes	Sources alimentaires	Teneur
β -Carotène	Abricot, brocoli, carotte, mangue, huile de palme, épinard, patate douce	++++
	Chou de Bruxelles, mangue, pêche, poivron	+++
	Goyave, laitue, orange, petits pois, courge, tomate	++
	Beurre, pamplemousse, mandarine	+
β -Cryptoxanthine	Kaki, cerise de Cayenne	+++
	Papaye, poivron, courge, mandarine	++
Lutéine	Brocoli, légume-feuilles, poivron	++++
	Jaune d'œuf, courge	++
Lycopène	Tomate, pastèque	++++
	Carotte, goyave	+++
	Pamplemousse rose, papaye	++
	Abricot, kaki	+
Zéaxanthine	Poivron	++++
	Kaki, courge maïs	++

++++ : teneur très élevée (>2 mg/100g de matière fraîche) ; +++ : teneur élevée (0,5 à 2 mg/100g) ; ++ : teneur modérée (0,1 à 0,5 mg/100g) ; + : teneur faible (0 à 0,1 mg/100g).

V.5. Différents types de caroténoïdes

On distingue deux groupes de caroténoïdes: les carotènes et les xanthophylles (Higuera-Ciapara et al., 2006).

V.5.1. Les carotènes

Les carotènes sont des dimères de la vitamine A. Ils se présentent majoritairement sous la formes α (Figure 11) et β -carotène (Figure 12). Généralement, l'ensemble des caroténoïdes qui ne sont pas oxygénés sont appelés les carotènes.

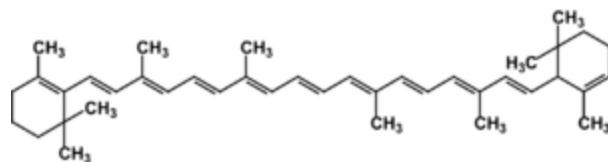


Figure 10 :
Structure chimique de l' α -carotène

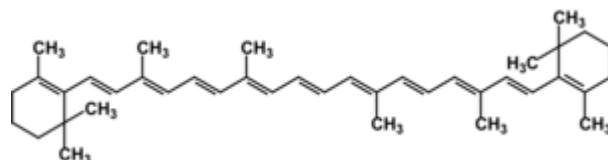


Figure 11 :
Structure chimique du β -carotène

V.5.2. Les xanthophylles

Les xanthophylles sont des molécules dérivées des carotènes, par ajout d'atomes d'oxygène. Elles possèdent chacune 40 atomes de carbone et deux structures cycliques aux extrémités de la molécule. La zéaxanthine (Figure 12), la lutéine (Figure 13) et l'astaxanthine font partie des xanthophylles. Ces pigments sont utilisés dans l'industrie de la volaille comme colorants naturels (Lu et al., 2005) et dans l'industrie aquacole pour l'élevage des salmonidés.

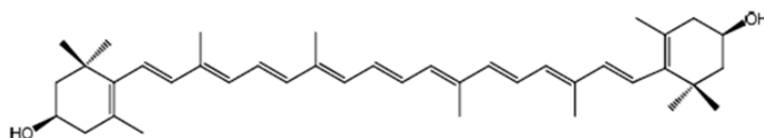


Figure 12 :
Structure chimique de la zéaxanthine

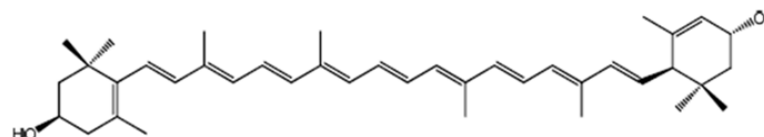


Figure 13 :
Structure chimique de la lutéine

V.6. Focus sur l'astaxanthine

V.6.1. Définition

L'astaxanthine ($C_{40}H_{52}O_4$) est un pigment de la classe des xanthopylles (Figure 14). Il s'agit d'un dérivé oxygéné des caroténoïdes. Chimiquement, la structure de l'astaxanthine est semblable au β -carotène et à la vitamine A. Il est synthétisé essentiellement par des microalgues essentiellement *Haematococcus pluvialis*. L'astaxanthine se trouve lié avec des acides gras ou des acides aminés aux niveaux de la chair des salmonidés et des carapaces des crustacés (Olaizola, 2008).

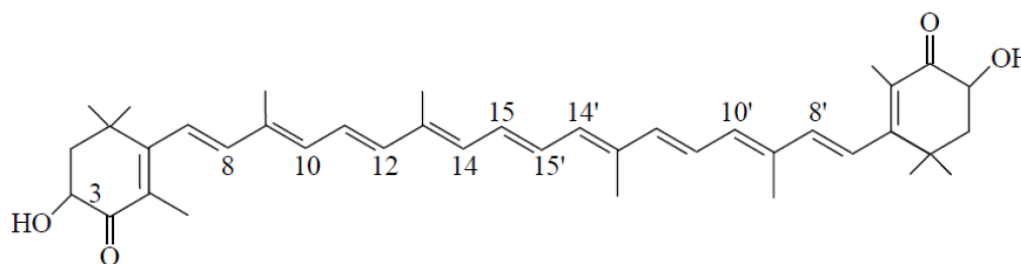


Figure 14 :
Structure chimique de l'astaxanthine

L'astaxanthine est le pigment le plus commercialisé en aquaculture, pour sa bonne coloration, c'est le responsable de la couleur rose orangé chez les crevettes et les saumons. En aviculture, son utilisation améliore la qualité de la viande (Olaizola, 2008).

V.6.2. Méthodes d'extraction de l'astaxanthine

Plusieurs méthodes sont utilisées pour l'extraction de l'astaxanthine à partir des sous-produits de crevettes.

❖ Par le dioxyde de carbone supercritique

Il s'agit d'un procédé innovant d'extraction d'astaxanthine à partir des sous-produits de crevettes (Andrea et al., 2011). C'est une technologie propre qui s'effectue à une température et une pression supercritique du CO_2 relativement basses ce qui réduit les risques de la dégradation thermique des pigments (Machmudah et al., 2006). C'est une méthode commercialement viable grâce à son rendement élevé.

❖ Par fermentation

La fermentation s'avère être une technique d'extraction prometteuse (Sachindra et al., 2007 ; Armenta and Guerrero-Legarreta, 2009; Pacheco et al., 2009). C'est une méthode propre et non couteuse.

❖ Par solvants organiques

L'astaxanthin est une molécule liposoluble qui peut être extraite suite à une macération dans des solvants organiques. L'utilisation du mélange hexane/isopropanol prouve son efficacité avec une récupération de 60% de l'astaxanthine (Sachindra et al., 2006). L'inconvénient de cette méthode c'est que l'extraction chimique provoque des problèmes environnementaux à cause des déchets toxiques générés au cours de ce traitement.

❖ Par huiles végétales

L'astaxanthine peut être également extrait par des huiles végétales. Plusieurs études sur l'extraction avec des huiles végétales ont été réalisées (Sachindra and Mahendrakar, 2005 ; Akdes, 2008 ; Handayani et al., 2008).

❖ Par voie enzymatique

L'extraction de l'astaxanthine à partir des sous-produits de crevettes par voie enzymatique est une méthode récente et propre mais relativement lente (Lee et al., 1999 ; Babu et al., 2008). L'extraction de l'astaxanthine par hydrolyse enzymatique à partir des sous-produits de crevettes semble efficace pour des applications alimentaires grâce à la richesse en acides aminés et en astaxanthine de l'hydrolysate élaboré.

V.6.3. Propriétés biologiques de l'astaxanthine

L'astaxanthine trouve plusieurs applications potentielles dans les domaines de l'agroalimentaire et de la santé.

❖ L'astaxanthine dans l'alimentation humaine et animale

L'astaxanthine est naturellement apportée dans l'alimentation humaine suite à la consommation des produits de la mer telle que les crustacés, et les poissons rouges. L'astaxanthine est utilisé dans l'alimentation comme antioxydant et/ou colorant alimentaire (Capelli et al., 2013). L'astaxanthine est également utilisé en aquaculture et en aviculture (Olaizola, 2008).

❖ L'astaxanthine et l'activité antioxydante

L'astaxanthine est un puissant piègeur de l'oxygène singulet (Naguib, 2000). Il a été montré qu'il neutralisait deux fois plus efficacement l'oxygène singulet que le β -carotène (Di Mascio et al., 1991). L'astaxanthine neutralise également les radicaux libres (Karppi et al., 2007). Plusieurs chercheurs ont étudié l'activité antioxydante de l'astaxanthine (Liang et al., 2009 ; Leite et al., 2010 ; Ngo et al., 2011a ; McCarty, 2011 ; Wang et al., 2012 ; Li et al., 2014).

❖ L'astaxanthine et l'inflammation

Plusieurs études ont montré que l'astaxanthine est une molécule très efficace pour tout type d'inflammation (Lockwooda et al., 2006 ; Pashkow et al., 2008 ; Yasui et al., 2011 ; Zhang et al., 2014). L'astaxanthine aide à combattre les symptômes de la maladie ulcéreuse et il permet de réduire les symptômes de l'inflammation gastrique (Bennedsen et al., 2000 ; Bolin et al., 2010).

❖ L'astaxanthine et le système immunitaire

L'astaxanthine est efficace pour la protection et la régénération du système immunitaire. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré qu'il induit la réponse immunitaire. En effet, l'astaxanthine stimule la production d'anticorps par les cellules de la rate et peut également restaurer la réponse immunitaire humorale endommagée. Nombreuses études *in vitro* ont montré que l'astaxanthine stimule la production d'immunoglobuline (Bennedsen et al., 2000 ; Amar et al., 2004 ; Amar et al., 2012 ; Chew et al., 2013 ; Li et al., 2014).

❖ L'astaxanthine et la vision

Certains caroténoïdes peuvent assurer la protection de la rétine contre les dommages oxydatifs (Ngo et al., 2011a ; McCarty, 2011). Une étude *in vivo* montre que l'astaxanthine atténue les lésions rétinienne associées à la dégénérescence maculaire liée à l'âge (Tso et al., 1996). En effet, les photorécepteurs des rats nourris avec de l'astaxanthine étaient moins endommagés par l'attaque des rayons UV que ceux des rats n'ayant pas reçu d'astaxanthine.

❖ L'astaxanthine et le cancer

L'astaxanthine a un effet protecteur contre la carcinogenèse de (Tanaka et al., 1994). Son activité anticancéreuse peut être liée au rôle que jouent les caroténoïdes dans la communication cellulaire. Plusieurs études récentes, *in vitro* et *in vivo*, ont montré également que l'astaxanthine est doué d'activité antiproliférative et anticancéreuse (Paloza et al., 2009 ; Yasui et al., 2011 ; Inoue et al., 2012 ; Nagaraj et al., 2012 ; Wang et al., 2013 ; Saw et al., 2013 ; Kavitha et al., 2013).

❖ L'astaxanthine et le système cardiovasculaire

L'effet protecteur de l'astaxanthine contre les maladies cardiovasculaires est largement décrit en littérature (Yoshida et al., 2010 ; Khan et al., 2010 ; Monroy-Ruiz et al., 2011). Chez l'homme, l'astaxanthine, liposoluble, est transportée par les lipoprotéines (Pashkow et al., 2008). L'administration de l'astaxanthine chez les rats assure une

augmentation des niveaux sanguins de cholestérol-HDL (Bolin et al., 2010 ; Pashkow et al., 2008).

❖ L'astaxanthine et le système nerveux

L'astaxanthine en synergie avec d'autres micronutriments interviendrait dans de nombreux processus biologiques permettant la réduction de maladies cérébrales. Plusieurs études ont montré une relation entre une consommation régulière en astaxanthine et la diminution d'un certain nombre de maladies cérébrales (Sasaki et al., 2011 ; Chang et al., 2013 ; Zhang et al., 2014).

❖ L'astaxanthine et l'activité antidiabétique

Le stress oxydatif induit par l'hyperglycémie est une des causes du dysfonctionnement des cellules β du pancréas chez les patients atteints de diabète. L'administration d'astaxanthine a permis de réduire la destruction progressive des cellules β dans des modèles animaux diabétiques (Bhuvanewari et al., 2010 ; Leite et al., 2010 ; Marin et al., 2011). L'astaxanthine peut exercer des effets bénéfiques dans le diabète en réduisant la toxicité du glucose et en réduisant la néphropathie diabétique (Uchiyama et al., 2002 ; Naito et al., 2004).

VI. Les peptides bioactifs

VI.1. Généralités

Le terme "peptide bioactif" a été utilisé pour la première fois en 1950 par Mellander. En 1979, Zioudrou et al. ont mis en évidence une activité opioïde dans un hydrolysat de gluten. L'étude des peptides bioactifs, appelés aussi peptides fonctionnels, suscite un intérêt croissant dans le domaine de la recherche en raison de leurs effets potentiellement bénéfiques pour la santé humaine. En plus de leur digestibilité élevée par rapport aux protéines, les peptides peuvent présenter des propriétés fonctionnelles utiles en alimentation, ainsi que des propriétés biologiques intéressantes en nutraceutique. En effet, de nombreux peptides bioactifs ont été isolés à partir des hydrolysats de protéines de céréales, des œufs, du lait et de poissons ayant des effets bénéfiques sur la santé humaine. Ces peptides peuvent être soit synthétisés à partir d'acides aminés, soit générés suite à une hydrolyse chimique ou enzymatique de protéines alimentaires.

VI.2. La synthèse de peptides

La synthèse de peptides peut être réalisée soit par voie chimique, soit par voie enzymatique, soit par génie génétique. Le choix de la méthode dépend principalement de la quantité à produire et de la longueur du peptide (Gill et al., 1996). La synthèse chimique est une méthode répandue et bien maîtrisée, la quantité produite peut atteindre des kilogrammes et la longueur des peptides peut varier entre 10 à 100 acides aminés. Cette méthode chimique présente plusieurs inconvénients. Elle est très coûteuse, entraîne des problèmes de racémisation des acides aminés et nécessite des produits réactionnels dangereux pour l'environnement et la santé. L'utilisation du génie génétique nécessite quant à elle une très coûteuse et très longue phase de recherche afin de générer un organisme producteur du peptide en question. Les faibles rendements limite l'utilisation de cette méthode. Enfin, les peptides peuvent être synthétisés par l'action catalytique des protéases en milieu non-aqueux. Bien que cette méthode est non dangereuse et peu coûteuse, la faible productivité et le manque de connaissances sur la spécificité des protéases dans les milieux non-aqueux restent les principaux obstacles pour utilisation intense de cette méthode (Gill et al., 1996).

VI.3. La production de peptides par protéolyse

Actuellement, il est désormais bien établi que les protéines issues de sources diverses contiennent dans leur séquence primaire des enchaînements d'acides aminés qui, une fois libérés, sont capables d'influencer la physiologie de l'organisme. En fait, la recherche concernant les peptides est principalement focalisée sur les propriétés nutritionnelles et biologiques de ces derniers en vue d'applications alimentaires, pharmacologiques ou médicales (Korhonen et al., 1998).

L'hydrolyse chimique des protéines alimentaires présente beaucoup de désavantages (peu spécifiques, perte de certains acides, production de molécules toxiques, production importante d'acides aminés libres, la racémisation des acides aminés) qu'elle n'est quasiment pas utilisée dans le cadre d'applications alimentaires ou pharmacologiques (Clemente, 2000 ; Linder et al., 2001). L'hydrolyse enzymatique de protéines ne présente pas les désavantages de l'hydrolyse chimique. Ainsi, la composition en acides aminés des hydrolysats protéiques est similaire à celle de la protéine d'origine : l'hydrolyse enzymatique des protéines n'affecte pas la valeur nutritionnelle de la protéine d'origine (Maldonado et al., 1998). L'utilisation des enzymes permet un certain contrôle de la réaction d'hydrolyse et de ses produits d'hydrolyse (Clemente, 2000). La composition

peptidique des mélanges varie selon la spécificité de la protéase utilisée et les conditions de l'hydrolyse. Selon les propriétés visées, l'hydrolyse enzymatique des protéines peut être plus ou moins complète. Une hydrolyse limitée permet d'obtenir des peptides de grande taille moléculaire aux propriétés fonctionnelles intéressantes (Blom et al., 1996). Alors qu'une hydrolyse poussée conduit à la génération de petits peptides utilisables dans les milieux de culture et dans les formulations diététiques.

VI.4. Applications biotechnologiques des peptides

VI.4.1. Support de milieu de culture microbienne

Les peptides issus de l'hydrolyse de sous-produits d'origine aquatique constituent des ingrédients pour des milieux de culture microbienne à coût réduit et de qualité. Des études ont été effectuées sur l'efficacité de leur utilisation en milieu de culture (Guérard et al., 2001). Les peptides constituent ainsi une source d'azote efficace à moindre coût pour la culture microbienne (Vieira et al., 2005).

VI.4.2. Nutrition animale

Les peptides présentent un intérêt particulier dans la nutrition animale à cause de leur digestibilité plus élevée (Heu et al., 2003). Plusieurs études sur l'efficacité de l'utilisation d'hydrolysats de crevette et de poisson en nutrition animale ont été effectuées. Il a été démontré que chez les ruminants la digestibilité est plus élevée dans l'ensilage de sous-produits de crevette par rapport aux sous-produits de crevette non traités (Evers and Carroll, 1998). En aquaculture, l'utilisation d'hydrolysats de sous-produits de poisson a prouvé son efficacité sur la croissance des poissons (Plascencia-Jatomea et al., 2002; Refstie et al., 2004 ; Oliveira Cavalheiro et al., 2007). La production de peptides à activité antioxydante associée à la présence d'astaxanthine dans les autolysats de crevette présente un intérêt particulier en aquaculture (Sachindra and Bhaskar, 2008).

VI.4.3. Nutrition humaine

Les peptides présentent un intérêt particulier en alimentation humaine dû au fait qu'ils présentent des propriétés fonctionnelles, qui leur permettent de jouer un rôle dans les caractères organoleptiques des aliments ou dans leur durée de conservation. Une des raisons principales justifiant d'effectuer des hydrolyses enzymatiques sur les produits et les sous-produits d'origine aquatique est la recherche de peptides avec des propriétés fonctionnelles. En effet, l'hydrolysats de sous-produits d'hareng présente une propriété importantes de solubilité (Sathivel et al., 2003) ; l'hydrolysats d'hareng entier présente des propriétés moussante et émulsifiante (Liceaga-Gesualdo and Li-Chan, 1999) ; une capacité

de rétention d'eau a été observée dans l'hydrolysate de têtes de crevette (Ruttanapornvareesakul, 2006). Les peptides présentent aussi une digestibilité élevée et, de fait, leur valeur nutritionnelle est importante. Les hydrolysats possèdent également des acides aminés libres pouvant être utilisés comme arôme (Heu et al., 2003 ; Cao et al., 2008).

VI.4.4. Bioactivité

Lorsqu'elles subissent une hydrolyse enzymatique avec des protéases, les protéines sont alors clivées en peptides. Les modifications apportées sont souvent requises pour la production de composés possédant des propriétés plus désirables qui pourraient par exemple entrer dans la formulation de produits alimentaires (Quaglia and Orban, 1987). D'une manière générale, les peptides biologiquement actifs sont de petite taille (Tomé, 1998). Cependant, il existe des exceptions concernant la taille des peptides bioactifs. Ces derniers présentent un intérêt dans le domaine pharmaceutique et nutraceutique. Des activités antihypertensive, sécrétagogue, anticancéreuse, immunostimulante, antibactérienne... ont été identifiées dans des peptides d'origine aquatique. Le [Tableau 2](#) présente quelques exemples de bioactivité de peptides obtenus lors de manipulations biotechnologiques de poissons et de crustacés.

Tableau 2 :
Bioactivité de peptides isolés à partir des produits de la mer

Bioactivité	Origine	Références
Antioxydant	Sole	Kim et al., 2008; Jun et al., 2004
	Crevette	He et al., 2007 ; He et al., 2008
	Morue	Jeon et al., 1999
	Merlan	Nakajima et al., 2009
	Hoki	Je et al., 2005 ; Kim et al., 2007
	Thon	Je et al., 2007 ; Bougatef et al., 2012 ; Saidi et al., 2014
	Émissole	Bougatef et al., 2009
Antihypertensive (Inhibition de la conversion de l'angiotensine I)	Seiche	Balti et al., 2010
	Sole	Kim et al., 2008
	Crevette	He et al., 2008
	Morue	Jeon et al., 1999
	Saumon	Nakajima et al., 2009
	Merlan	Nakajima et al., 2009
	Colin	Nakajima et al., 2009 ; Je et al., 2004
	Émissole	Bougatef et al., 2008
Saumon	Lee et al., 2014	
Tortue	Rawendra et al., 2013	
Satiétogène	Émissole	Bougatef et al., 2010a
Accélération de l'absorption du calcium	Hoki	Mellander, 1950 ; Jung et al., 2005 ; Jung and Kim, 2007 ; Kim et al., 2007
Sécrétagogue	Merlan	Cudennec et al., 2008
	Morue	Ravallec and Van, 2003 ; Slizyte et al., 2009
	Crevette	Cudennec et al., 2008 ; Ravallec and Van, 2003
Antiradicalaire	Crevette	Guérard et al., 2007
	Émissole	Bougatef et al., 2009
	Morue	Ngo et al., 2011b
Antiproliférative	Morue	Picot et al., 2006
	Crabe	Picot et al., 2006
	Saumon	Picot et al., 2006
Antibactérien	Crevette	Cudennec et al., 2008
	Crabe	Doyen et al., 2012 ; Beaulieu et al., 2014
	Anchois	Tang et al., 2015
Antidiabétique	Saumon	Li-Chan et al., 2012
	Thon	Huang et al., 2012

VI.5. Peptides et activité antibactérienne

VI.5.1. Généralités sur les peptides antibactériens

Dans les années soixante dix, des peptides présentant une activité antibactérienne furent découverts chez différents organismes (Csordas and Michl, 1970 ; Habermann, 1972 ; Fernandez de Caley et al., 1972). Ces découvertes ont déclenché un intérêt croissant pour isoler et identifier d'autres peptides antibactériens. Les peptides antibactériens sont souvent des molécules amphiphiles contenant un nombre important de résidus arginine et/ou lysine dans leur séquence, leur permettant d'acquérir une charge globale positive et donc d'interagir avec les membranes des bactéries. Les peptides antibactériens sont généralement constitués par un nombre de résidus d'acides aminés inférieur à 50 dont la majorité est des résidus hydrophobes. Ils sont caractérisés par leur capacité à augmenter la perméabilité ionique des membranes cellulaires (Toke, 2005). Actuellement, il existe plus que 1000 peptides antibactériens d'origines différentes, répertoriés dans plusieurs bases de données (Antimic, Antimicrobial Peptide Database, Antimicrobial Sequence Database...). Même si certains peptides ont un spectre d'activité limité aux bactéries, d'autres étendent leurs activités aux virus, aux champignons, à certains parasites, et même aux cellules cancéreuses (Baker et al., 1993; Chinchar et al., 2004 ; Toke, 2005). Les peptides antibactériens se répartissent en deux catégories (Hancock and Chapple, 1999) : ceux synthétisés par voie non ribosomale, et ceux obtenus par synthèse ribosomale. Les peptides antibactériens non ribosomals sont généralement issus de champignon, de levures ou de bactéries. Leur synthèse a lieu au sein des complexes multienzymatique et ils peuvent subir des modifications comme des glycosylations et des cyclisations. Les peptides ribosomals sont synthétisés par les ribosomes. Après leur synthèse, ils sont stockés dans des granules au sein de leucocytes ou de cellules épithéliales, et lorsque l'organisme est attaqué ils sont libérés. Ces peptides constituent une part importante de l'immunité innée (Devine, 2003 ; Levy, 2004).

Certains peptides antibactériens sont issus par la dégradation protéolytique de protéines. Au cours des années 1990, plusieurs peptides possédant des activités antibactériennes ont été mis en évidence dans des hydrolysats protéiques. Tomita et al. (1991), ont été les premiers à mettre en évidence les effets antimicrobiens d'un hydrolysat pepsique de lactoferrine. Recio et Visser (1999), Liepke et al. (2001) et Malkoski et al., (2001) ont identifié des peptides antibactériens à partir de l'hydrolysat enzymatique de la caséine. A partir de l'hémoglobine bovine, plusieurs peptides antimicrobiens ont été isolés

par hydrolyse pepsique (Lignot et al., 1999 ; Froidevaux et al., en 2001 ; Nedjar et al., 2008 ; Yaba Adje et al., 2011 ; Catiau et al., 2011a). Quelques exemples de peptides antibactériens connus d'origine animale et végétale sont présentés dans le [Tableau 3](#).

Tableau 3 :
Peptides antibactériens isolés d'hydrolysats protéiques d'origine animale et végétale

Source	Références
Hémoglobine bovine	Lignot et al., 1999 ; Froidevaux et al., 2001 ; Choisnard et al., 2002 ; Daoud et al., 2005 ; Nedjar et al., 2006 ; Nedjar et al., 2008 ; Yaba Adje et al., 2011 ; Catiau et al., 2011a
Hémoglobine humaine	Liepke et al., 2003 ; Mak et al., 2009
Lactosérum	Gauthier et al., 2006 ; Theolier et al., 2013
Lactalbumine	Biziulevicius et al., 2006
Ovalbumine	
Sérum albumine	
Caséine animale	Recio and Visser, 1999 ; Biziulevicius et al., 2006 ; Lahov and Regelson, 1996 ; Zucht et al., 1995 ; Malkoski et al., 2001 ; Liepke., et al., 2001
Caséine du lait maternel	Liepke et al., 2001
Gluten de blé	Del Castillo et al., 2007
Sésame	Das et al., 2012
Sous-produits de crevette	Cudennec et al., 2008
Crabe	Doyena et al., 2012 ; Beaulieu et al., 2014
Poissons :	
<i>Wallago attu</i>	Sattar et al., 2006
<i>Engraulis japonicus</i>	Tang et al., 2015
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Jiang et al., 2014
Huître japonaise	Liu et al., 2008
Blanc d'œuf	Memarpoor-Yazdi et al., 2012

VI.5.2. Classification des peptides antibactériens

Plusieurs classifications ont été établies, en suivant l'évolution des découvertes. En effet, il n'existe pas à ce jour de nomenclature universelle définie au niveau international. Ils ont tout d'abord été classés en fonction de leur origine, mais l'isolement de plusieurs peptides différents à partir d'une même espèce, a conduit à abandonner cette classification. Actuellement, la classification des peptides antibactériens repose sur leur charge et leur structure (Boman, 1995 ; Gennaro et al., 2000 ; Shai, 2002).

VI.5.2.1. Les peptides antibactériens anioniques

Les peptides antibactériens anioniques sont de petites molécules, présentant des régions d'homopolymère d'acide aspartique. Ils sont présents au niveau d'extraits de surfactants, dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire et dans les cellules épithéliales ciliées des voies aériennes. Ils requièrent la présence de Zinc comme cofacteur pour leur action biologique (Brogden, 2005). Plusieurs peptides antibactériens anioniques ont été découverts (Schitteck et al., 2001 ; Fales-Williams et al., 2002).

VI.5.2.2. Les peptides antibactériens cationiques

Les peptides antibactériens cationiques peuvent être classés en quatre grandes familles.

❖ Peptides antibactériens en hélice α

Des centaines de peptides antibactériens sont regroupés dans cette famille (Orsolya, 2005 ; Castro Fontes, 2005; Lemaitre and Hoffmann, 2007; Lai and Gallo, 2009; Guani-Guerra et al., 2010). Ces peptides sont les premiers antibactériens découverts et ils sont les plus étudiés en raison de leur structure et mode d'action relativement simples. Ces peptides sont généralement cationiques et possèdent 50% à 60% de résidus hydrophobes (Tossi et al., 2000 ; Zasloff, 2002). Ils sont de petite taille (< 40 acides aminés) et ne possèdent pas de résidu cystéine. Ils adoptent une structure secondaire caractérisée par la présence d'une ou plusieurs hélices α amphiphiles lors du contact avec la membrane phospholipidique des bactéries (Brogden, 2005).

❖ Peptides antibactériens linéaires riches en certains acides aminés

Ce sont des peptides linéaires non structurés (Powers and Hancock, 2003). Ils possèdent dans leur structure une séquence dont la composition est dominée par un certain type d'acide aminé (la proline, l'arginine, l'histidine et la glycine) et sont composés

d'environ 44 résidus (Andres and Dimarcq, 2007). Ces peptides agissent au niveau intracellulaire par l'inhibition de la synthèse des protéines chez les bactéries (Andreu and Rivas, 1998). Plusieurs peptides antibactériens riches en proline d'origine aquatique ont été isolés (Cuthbertson et al., 2004).

❖ Peptides antibactériens cycliques riches en ponts disulfures

Cette famille regroupe les peptides antibactériens qui contiennent des ponts disulfures intramoléculaires formés grâce à la présence de résidus cystéine ce qui entraîne la cyclisation partielle ou totale de la molécule (Brogden, 2005; Andres and Dimarcq, 2007). Les défensines sont les plus représentatives de cette famille de peptides (Brogden, 2005). Les peptides antibactériens riches en cystéines sont classés en fonction du nombre de ponts disulfure, de leur forme et de leur origine (Dimarcq et al., 1998). Il existe les peptides ayant une conformation en feuillet β avec trois ponts disulfures, ceux qui possèdent une conformation en épingle à cheveux ou encore des structures mixtes contenant à la fois des hélices α et des feuillets β (Bulet et al., 2004).

❖ Peptides antibactériens à structure « Random coil »

Ce sont des petits peptides (3 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). Ces peptides antibactériens peuvent se structurer au contact de la membrane bactérienne (Powers and Hancock, 2003). La néokyotorphine, peptide isolé de la chaîne α de l'hémoglobine bovine, est le peptide le plus représentatif de cette famille (Lopez et al., 2006).

VI.5.3. Mécanismes d'action des peptides antibactériens

Les peptides antibactériens perturbent de façon sélective les membranes bactériennes. En effet, la charge externe des phospholipides de la membrane et la distribution de charge des peptides semblent rentrer en jeu dans les interactions entre les membranes biologiques et les peptides antibactériens (Bowman et al., 1994 ; Oren and Shai, 1998; Cudi and Otvos, 2002). La plupart des peptides antibactériens semblent agir sur la membrane bactérienne. Cette action directe sur la membrane entraîne la mort de la cellule par des phénomènes osmotiques. Certains, cependant, agissent par inhibition de mécanismes intra-cytoplasmiques (Jenssen et al., 2006).

VI.5.3.1. Mécanismes entraînant la déstabilisation de la membrane cytoplasmique

Les peptides antibactériens vont s'insérer et/ou détruire la membrane bactérienne par quatre mécanismes différents :

❖ Le modèle en douve de tonneau (barrel-stave model)

C'est le mode d'action des peptides antibactériens amphipathiques organisés en hélices α (Figure 15).

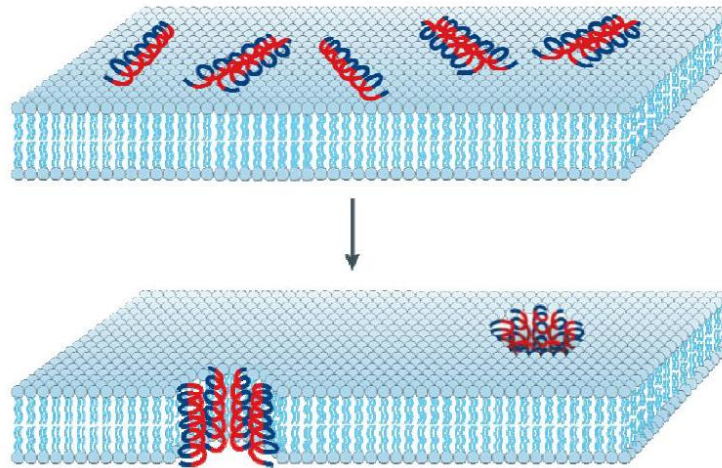


Figure 15 :
Modèle en "douve de tonneaux" (Brodgen, 2005)

Les parties hydrophobes des peptides antibactériens interagissent avec la partie lipidique de la membrane cellulaire alors que les surfaces hydrophiles se tournent et pénètrent vers l'intérieur pour former un pore aqueux (Matsuzaki et al., 1998). Le recrutement progressif de monomères additionnels augmente la taille du pore. Les canaux transmembranaires ainsi formés vont détruire les équilibres osmotiques et conduire à la lyse de la bactérie.

❖ Le modèle des pores toroïdaux (toroid pore model / Wormhole model)

Pour ce mécanisme les lipides membranaires font partie intégrante du pore. Ces lipides sont intercalés avec les peptides dans le canal transmembranaire (Yeaman et al., 2003; Jenssen et al., 2006). Dans le modèle, les peptides vont rester fixés à la tête polaire de la monocouche lipidique, même une fois qu'ils sont insérés perpendiculairement dans la bicouche (Matsuzaki et al., 1996; Yang et al., 2001). Les hélices sont initialement orientées parallèlement à la surface membranaire, puis s'insèrent dans la monocouche extérieure, induisant une distorsion de la membrane. La courbure de cette dernière permet au pore

d'être bordé à la fois par la face polaire des peptides et les têtes polaires des lipides membranaires (Matsuzaki et al., 1996; Yang et al., 2001; Yeaman et al., 2003).

Ainsi, l'invagination des lipides entraîne la jonction des deux feuillets lipidiques, formant un trou toroïdal (Figure 16).

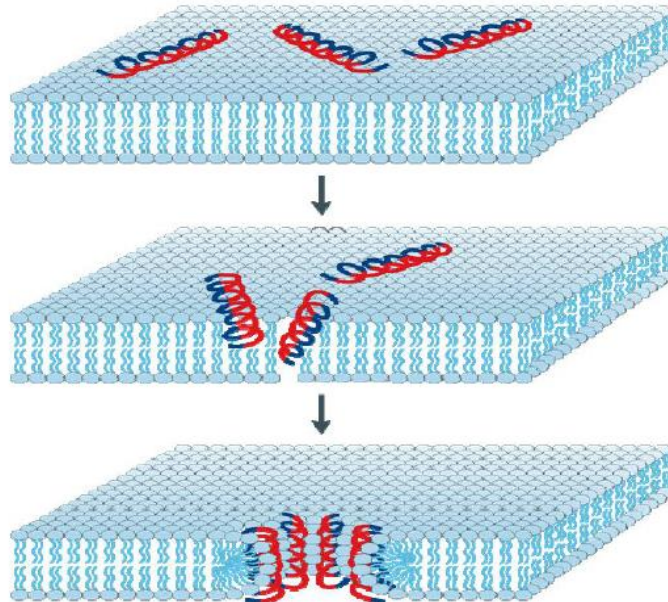


Figure 16 :
Modèle des "pores toroïdaux" (Brodgen, 2005)

❖ Le modèle en tapis (carpet mechanism)

Les peptides antibactériens s'organisent parallèlement à la surface membranaire. Les peptides forment ainsi un tapis à la surface membranaire entraînant des perturbations de la fluidité membranaire (Shai et al., 2002). Ce ci provoque l'effondrement de la membrane créant ainsi un effet détergent, perforant la membrane, laissant ainsi le contenu cytoplasmique s'échapper (Ehrenstein et al., 1977). Pour ce modèle, il est nécessaire que les peptides recouvrent toute la surface membranaire, et qu'ils se trouvent en concentration efficace pour agir (Figure 17). Ce modèle diffère des deux précédents pour deux raisons : les peptides ne s'insèrent pas dans la membrane et il n'est pas nécessaire que les peptides adoptent une structure en hélice α dans ce mode d'action.

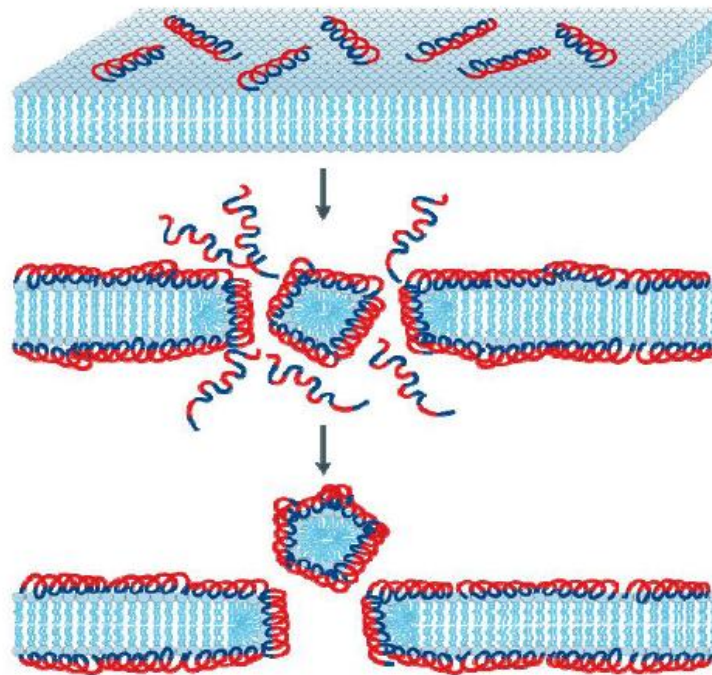


Figure 17 :
Modèle en tapis (Brodgen, 2005)

❖ Le modèle “coarse-grain molecular dynamics”

Ce mécanisme est basé sur des simulations informatiques en utilisant des peptides antibactériens synthétiques de faibles masses moléculaires (Lopez et al., 2006). Le mécanisme repose sur une perméabilisation de la membrane sans la détruire. Les peptides vont se lier à la tête hydrophile de la membrane et lorsque ces peptides sont assez nombreux, ils vont former un domaine hydrophile. Les molécules d'eau ou de tout autre solvant vont alors être expulsées de la bactérie en passant de peptide en peptide. La bactérie va par conséquent se vider de son contenu cellulaire ce qui conduit à sa mort. Ce mécanisme pourrait également avoir lieu pour certains peptides antibactériens naturels de faibles poids moléculaires.

VI.5.3.2. Mécanismes sans interaction avec la membrane cytoplasmique

Les peptides antibactériens dépassent la membrane plasmique et inhibent différentes voies de synthèses au niveau intracytoplasmique (Powers and Hancock, 2003; Jenssen et al., 2006). Une fois à l'intérieur ces peptides antibactériens peuvent agir sur des cibles intracellulaires spécifiques 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 paroi... (Cudi and Otvos, 2002).

VI.6. Peptides et activité antidiabétique

VI.6.1. Le diabète : Généralités

Le diabète est une maladie fréquente très répandue dans le monde. L'organisation mondiale de la santé (OMS), estime 347 millions le nombre de patients diabétiques au sein de la population mondiale (OMS, 2013). En 2010, le diabète a tué environ 3,4 millions de personnes, l'OMS prévoit qu'en 2030, il sera la septième cause de décès mondiale.

Le diabète est une affection métabolique complexe liée à des facteurs génétiques et environnementaux, et caractérisée par la présence d'une hyperglycémie chronique résultant d'une déficience de la sécrétion d'insuline, d'anomalies de son action sur les tissus cibles, ou de l'association des deux (Grimaldi, 2005). Biologiquement, le diabète se définit par une glycémie à jeun dans le plasma veineux supérieure ou égale à 1,26 g/l soit 7,0 mmol/l et ceci à au moins deux reprises. Il est également caractérisé par une glycémie sur plasma veineux supérieure ou égale à 2 g/l soit 11,1 mmol/l quelque soit le moment par rapport à un repas (OMS, 2013). Cette maladie est incurable, mais peut être traitée (Raccach, 2004). En l'absence de traitement, il se reconnaît par une élévation chronique de la glycémie. Celle-ci s'accompagne parfois par les symptômes suivants : polyurie, polyphagie, asthénie, amaigrissement ou obésité, et des troubles de la conscience aboutissant à un coma mortel (Raccach, 2004 ; Calop et al., 2008). Le diabète aboutit à des complications comme les maladies cardio-vasculaires et rénales. Ces complications peuvent être diminuées ou empêchées en maintenant une glycémie près de la normale (0,7-0,8 g/l) (Raccach, 2004). On distingue deux grandes formes de diabète :

❖ Le diabète de type 1

Pour ce type de diabète le pancréas ne produit pas l'insuline à cause de la destruction de la majorité des cellules β des îlots de Langerhans (diabète insulino-dépendant). Il survient le plus souvent pendant l'enfance ou l'adolescence.

❖ Le diabète de type 2

Ce type de diabète apparaît lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline ou que l'organisme n'utilise pas correctement l'insuline qu'il produit (diabète non insulino-dépendant). Il apparaît généralement à l'âge adulte. Le diabète de type 2 est le

plus fréquent et représente environ 90 % des cas à tel point qu'on peut aujourd'hui parler d'une véritable "épidémie".

Le diagnostic du diabète de type 2 est établi lorsqu'une hyperglycémie est maintenue suite à un repas normalisé (Raccab, 2004). Cette hyperglycémie est due à une association d'un défaut de l'action et de la sécrétion d'insuline. Une insulino-résistance et une insulinémie inappropriée à l'hyperglycémie sont les caractéristiques principales de cet diabète. A long terme, le diabète de type 2 se caractérise par la présence de glucose dans les urines "diabète sucré". Ce symptôme suggère que l'hyperglycémie est constante et présage d'une atteinte possible d'autres organes pour lesquels des complications peuvent se développer. Des facteurs génétiques seraient susceptibles d'induire un diabète de type 2. Associées aux causes génétiques le rôle de l'environnement est non seulement important mais devient capital compte tenu du changement d'habitudes alimentaires.

❖ Autres types de diabète

Il existe d'autres formes de diabète: le diabète gestationnel (intolérance au glucose chez les femmes enceintes) ou des diabètes résultant de conditions spécifiques ou génétiques (diabètes dits secondaires).

VI.6.2. Le diabète et les incrétines

Au cours d'un repas, la prise de nourriture va entraîner certaines adaptations physiologiques afin de favoriser l'absorption des nutriments et leur métabolisme. Parmi ces adaptations, la présence d'hormones gastro-intestinales, les incrétines, qui vont favoriser la sécrétion d'insuline.

Le concept des "incrétines" est apparu au début du 20^{ème} siècle. Plus tard, le glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) et le glucagon like peptide-1 (GLP-1), se sont avérés être les principaux acteurs de ce que l'on appelle "effet incrétine" (Gautier et al., 2008). Cet effet se définit comme l'augmentation de l'insulinosécrétion en réponse au glucose oral comparativement à celle obtenue en réponse au glucose administré par voie intraveineuse de manière à obtenir le même profil glycémique. Il est principalement dû à la potentialisation de l'insulinosécrétion, de façon glucodépendante, exercée par le GLP-1 et le GIP. On estime que 50 à 70 % de la sécrétion d'insuline sont liés à l'effet "incrétine" (Virally et al., 2008).

Les incrétines sont des hormones gastro-intestinales qui stimulent la sécrétion d'insuline lorsque la glycémie est trop élevée. Le GIP (peptide de 42 acides aminés) et le GLP-1 (37 acides aminés) sont sécrétés par des cellules endocrines de l'épithélium

intestinal qui sont respectivement les cellules K du duodénum et les cellules L de l'iléon et du côlon proximal en réponse au repas (Guillausseau et al., 2008). Leur action passe par leur liaison à des récepteurs spécifiques, mais dépend aussi de mécanismes indirects impliquant le système nerveux (Figure 18 et 19). Les incrétines (GIP et GLP-1) exercent un effet insulinosécrétagogue strictement glucose-dépendant, ne s'exprimant qu'en cas d'hyperglycémie, et disparaissant quand la glycémie est inférieure à 0,55 g/l (Virally et al., 2008). Ces deux hormones sont dégradées par une enzyme, la dipeptidyl-peptidase-IV. Au cours du diabète de type 2, l'effet "incrétine" est globalement réduit.

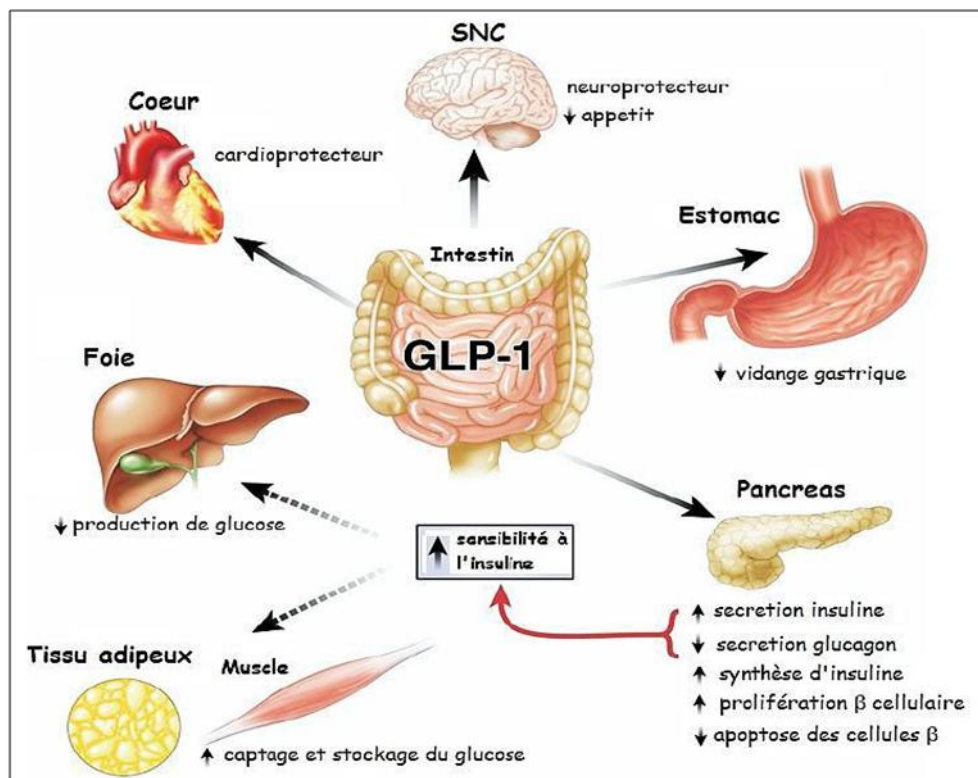


Figure 18 :
Effets physiologiques du GLP-1 (Virally et al., 2008)

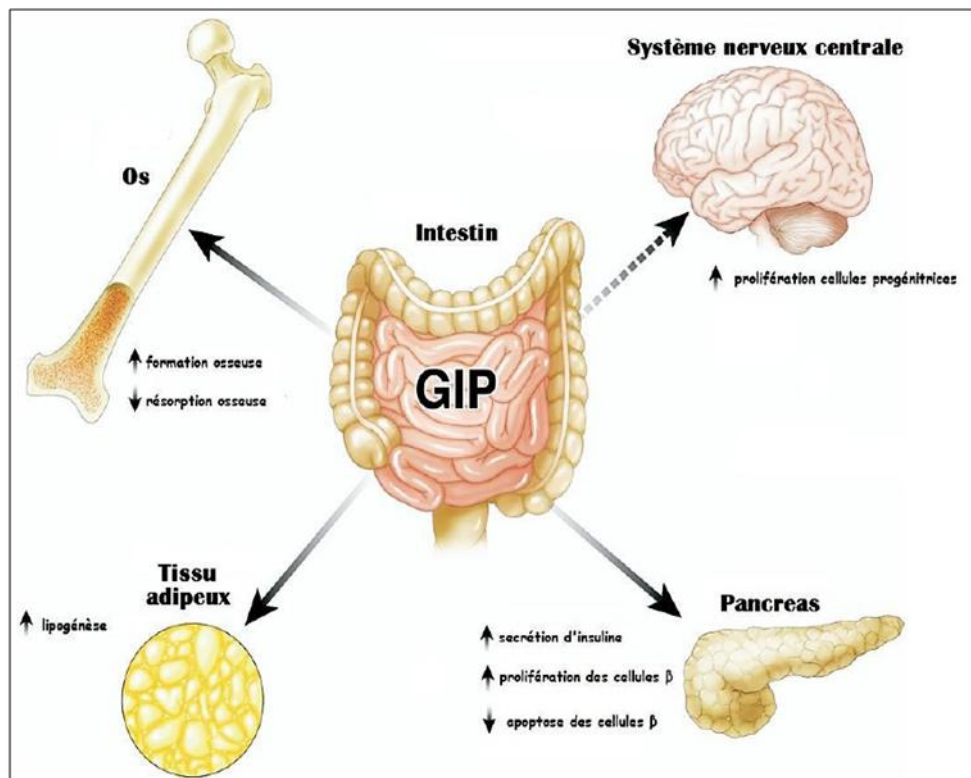


Figure 19 :
Effets physiologiques du GIP (Virally et al., 2008)

VI.6.3. Le diabète et la dipeptidyl-peptidase-IV

❖ La dipeptidyl-peptidase-IV

Les dipeptidyl-peptidases sont des protéases qui libèrent des dipeptides spécifiques à l'extrémité N-terminale des protéines. Selon leur spécificité enzymatique et leur localisation cellulaire, elles sont rangées dans dix classes et désignées par un chiffre romain ou arabe. La dipeptidyl-peptidase-IV (DPP-IV) est une glycoprotéine, composée de 776 acides aminés, qui hydrolyse les petits peptides, en raison des difficultés d'accès au site d'action. La DPP-IV est exprimée de manière ubiquitaire, en particulier, dans la moelle osseuse, la bordure en brosse des entérocytes et dans l'endothélium vasculaire (Matteucci, 2009). La DPP-IV agit sur les peptides et libère un dipeptide à partir de l'extrémité N-terminale de la protéine. Elle agit sur les peptides qui présentent un résidu proline, alanine ou hydroxyproline en avant dernière position au niveau de l'extrémité N-terminale. Les oligopeptides sont ses substrats préférentiels (Matteucci, 2009).

Les incrétines, GIP et GLP-1, sont les principaux substrats de la DPP-IV. Elles sont très rapidement inactivées par la DPP-IV qui clive leur partie N-terminale, les transformant en métabolites inactifs. Cette dégradation par la DPP-IV est responsable de la brièveté de la demi-vie des incrétines (Virally, 2008).

❖ Les inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase-IV

L'inhibition de la DPP-IV entraîne une augmentation importante de la concentration de GLP-1 et de GIP (Figure 20) et donc peuvent exercer leurs effet « incrétine » de façon plus marquée et plus prolongée (Guillausseau et al., 2008). Ceci provoque une augmentation de la sécrétion d'insuline et une diminution de la sécrétion de glucagon, propriété permettant d'améliorer l'équilibre en sucre chez le diabétique et par la suite une prévention contre le diabète de type 2 (Scheen, 2007 ; Debaty et al., 2008 ; Guillausseau et al., 2008). Donc ces nouveaux agents antidiabétiques fondés sur l'effet "incrétine", représentés par les inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase-IV, peuvent être utilisés pour le traitement du diabète de type 2 (Verspohl, 2009). Ces agent sont appelés "Les antidiabétiques oraux" (Debaty et al., 2008).

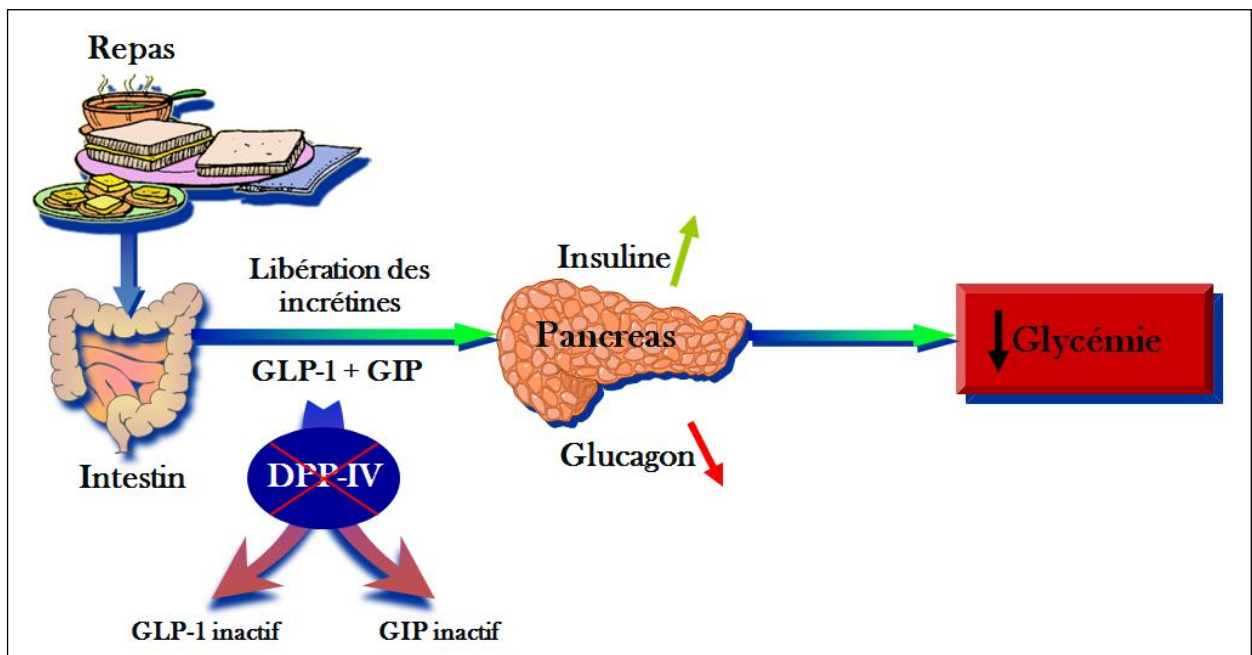


Figure 20 :
Inhibition de la dipeptidyl-peptidase-IV (Guillausseau et al., 2008)

Les inhibiteurs de la DPP-IV augmenteraient de deux à trois fois la concentration circulante sanguine de GLP-1 sous forme active (Herman et al., 2006) ce qui suggère que chez le sujet diabétique, l'absence de GLP-1 est due à un excès d'expression et/ou d'activité

de la DPP-IV ou proviendrait d'un défaut de sa sécrétion. En effet, chez les sujets diabétiques ont remarque une augmentation de l'activité de la DPP-IV dans l'intestin, le foie et le rein (Yang et al., 2007). De point de vue métabolique, l'utilisation des inhibiteurs de la DPP-IV en traitement thérapeutique chronique chez les rongeurs (Reimer et al., 2002 ; Mu et al., 2006) et les patients diabétiques (Ahren et al., 2002 ; Utzschneider et al., 2008), diminue la glycémie et la sécrétion de glucagon, et inversement augmente la sécrétion d'insuline. A long terme, l'effet de ces agents thérapeutiques augmenterait le nombre d'îlots β du pancréas, tout au moins chez l'animal, ce qui favoriserait donc le maintien du contrôle de la glycémie (Buteau, 2008).

VI.6.4. Le diabète et les peptides anti-dipeptidyl-peptidase-IV

Au cours des ces dernières années, plusieurs peptides possédants des activités anti-DPP-IV ont été mis en évidence dans des hydrolysats protéiques d'origines animales et végétales. Le Tableau 4 précise quelques exemples de peptides doués d'activité anti-dipeptidyl-peptidase-IV.

Tableau 4 :
Exemples de peptides anti-dipeptidyl-peptidase-IV

Origine	Séquence	IC ₅₀ (μ M)	Références
Lait	Trp-Trp-Trp	216	Nongonierma et al., 2014
	Ile-Pro-Ile	3,5	
	Trp-Pro	44,2	
Lactosérum	Ile – Pro-Ala-Val-Phe	44,7	Silveira et al., 2013
Caséine	Phe-Leu-Gln-Pro	65,3	Nongonierma et al. 2013
Thon	Pro-Gly-Val-Gly-Gly-Pro-Leu-Gly-	116,1	Huang et al., 2012
	Pro-Ile-Gly-Pro-Cys-Tyr-Glu		
	Cys-Ala-Tyr-Gln-Trp-Gln-Arg-Pro-	78,0	
	Val-Asp-Arg-Ile-Arg	96,4	
Pro-Ala-Cys-Gly- Gly-Phe-Try-Ile-			
Ser-Gly-Arg-Pro-Gly			
Jambon	Lys-Ala	6270	Gallego et al., 2014
	Ala-Ala-Ala-Thr-Pro	6470	
Gélatine porcine	Gly-Pro-Hyp	49,6	Hsu et al., 2013
	Gly-Pro-Ala-Gly	41,9	
Riz	Leu-Pro	2370	Hatanaka et al., 2012
	Ile-Pro	410	

Résultats & Discussion

Chapitre I :

Caractérisation et activités biologiques de l'astaxanthine extrait à partir des sous-produits de crevettes

Les crevettes sont des crustacés décapodes dont le corps est recouvert par une carapace chitineuse. En Tunisie, les crevettes représentent environ 25% des exportations des produits de la mer. Les transformations des crevettes génèrent une quantité importante de sous-produits (environ 50% du poids total). L'élimination de ces sous-produits a toujours été dispendieuse et a souvent eu un impact nuisible sur l'environnement (Islam et al., 2004). Les paramètres des diverses possibilités de traitement des sous-produits considérées comme acceptables pour l'environnement ne sont pas le plus souvent fixés. En effet, le circuit d'élimination des sous-produits de la filière pêche et aquaculture est généralement la mise en décharge et l'incinération. Cette lacune s'est révélée être le point faible de la lutte contre les dommages environnementaux, comme le montrent plusieurs problèmes de pollution causés par des incinérateurs ou des décharges (Muzzarelli, 1997). Donc des stratégies innovatrices devraient être mises en œuvre afin d'optimiser l'utilisation de la biomasse débarquée et la diversification du secteur. Grâce aux progrès techniques, il est maintenant possible, de transformer ce flux de sous-produits en produits utiles et commercialisables. C'est pour cela, l'industrie de valorisation des ressources halieutiques apparaît aujourd'hui comme une composante d'avenir de la filière pêche. Les procédés de valorisation des sous-produits de crevettes sont nombreux et très variés. On note principalement la fabrication de farine et l'extraction de la chitine. Les sous-produits de crevettes peuvent être aussi une source importante de caroténoïdes à usage alimentaire et pharmaceutique.

Les caroténoïdes constituent une famille de pigments naturels largement répandus dans le monde vivant. Leur variété structurale (configuration cis ou trans, groupements hydroxylés...) conditionne leurs propriétés physico-chimiques qui influencent leur absorption au niveau intestinal, leur répartition tissulaire ou leur activités biologiques. La couleur, qui varie du jaune au rouge est l'élément caractéristique de ces molécules. Les caroténoïdes sont souvent responsables des couleurs vives de certains animaux, fruits et légumes (Britton et al., 1995). L'astaxanthine (dihydroxy-3,3'-dioxo-4,4'- β -carotène) est un pigment caroténoïde appartenant à la classe des xanthophylles. Il est présent spécialement dans l'environnement aquatique. La crevette contient l'astaxanthine comme le principal pigment. Elle absorbe ce pigment dans l'alimentation et le transforme en des dérivés hydroxylés (Latscha, 1990). L'astaxanthine, chez les crustacés, peut se complexer avec différents type de molécules tel que les acides aminés (caroténoprotéines), les acides gras (caroténolipoprotéines) et la chitine (chitinocaroténoïdes) (Armenta and Legarreta, 2009). L'astaxanthine est un composé lipophile qui peut être extrait par : les solvants (Ruen-ngam et al., 2010 ; Ranga Rao et al., 2010), les

acides (Mendes-Pinto et al., 2001 ; Ni et al., 2008), les huiles végétales (Ranga Rao et al., 2007), le CO₂ supercritique (Andrea et al., 2011), et les méthodes enzymatiques (Armenta and Legarreta, 2009).

Comme les autres caroténoïdes, l'astaxanthine possède des propriétés biologiques et médicinales puissantes. Plusieurs études ont montrées que l'astaxanthine assure une protection contre les radicaux libres meilleure que celle du β -carotène et la lutéine (Ranga Rao et al., 2007 ; Ranga Rao et al., 2013). L'astaxanthine peut également protéger les cellules β pancréatiques contre la toxicité du glucose (Uchiyama et al., 2002). Il empêche également la néphropathie diabétique par la réduction du stress oxydant (Naito et al., 2004 ; Manabe et al., 2008). L'astaxanthine est, également, un agent thérapeutique potentiel contre les maladies cardiovasculaires (Pashkow et al., 2008 ; Fassett et al., 2011) et oculaire (Ngo et al., 2011a ; McCarty, 2011). Plusieurs autres activités biologiques de l'astaxanthine ont été aprouvées tel que l'activité antiprolifératives (Wang et la., 2013 ; Saw et al., 2013 ; Kavitha et al., 2013), l'activité anti-inflammatoire (Park et al., 2013 ; Chew et al., 2013 ; Bhuvanewari et al., 2014) et l'effet protecteur sur le système nerveux (Chang et al., 2013 ; Zhang et al., 2014).

Au cours de ce travail nous nous sommes intéressés à l'extraction, la caractérisation et l'étude des activités antioxydante, antiproliférative et antidiabétique, *in vitro* et *in vivo*, de l'astaxanthine extrait à partir des sous-produits de crevettes.

Article 1:

Assaâd Sila, Moncef Nasri, Ali Bougatef (2012).

Isolation and characterisation of carotenoproteins from deep-water pink shrimp processing waste. **International Journal of Biological Macromolecules**. 51, 953-959. (IF : 3.096)

Isolement et caractérisation des caroténoprotéines à partir des sous-produits de la crevette rose du large

Assaâd Sila, Moncef Nasri, Ali Bougatef

Les processus de transformation de crevettes génèrent une quantité importante de sous-produits. Ces derniers sont une source de contamination environnementale importante. La non récupération et la non valorisation de ces sous-produits engendrent un coût économique (et environnemental) de plus en plus élevé à la charge des industries. Cependant, ces sous-produits sont riches en protéines et en caroténoïdes, il semble donc intéressant d'adopter une stratégie de récupération de ces biomolécules et de voir s'il est possible de les utiliser notamment comme ingrédients dans les produits alimentaires. L'objectif de ce travail consiste à extraire les caroténoprotéines, à partir des sous-produits de la crevette rose du large (*Parapenaeus longirostris*), par voie enzymatique en utilisant la trypsine de barbeau (*Barbus callensis*). Ces caroténoprotéines ont servi, par la suite, pour isoler l'astaxanthine moyennant cette même trypsine.

Les sous-produits de crevettes (carapaces, têtes, telsons et appendices) utilisés dans cette étude sont issus d'une industrie de transformation et de conditionnement des produits de la mer : Société Calemba située au port de Sfax. Ces sous-produits sont riches en protéines (31,3% ± 0,61) et qu'ils se caractérisent également par une richesse en chitine (34,86%) et en sels minéraux (28,61% ± 0,79) et par une faible teneur en lipides (3,97% ± 0,42). L'étude de la composition minérale a montré que le calcium est le plus abondant dans cette fraction et l'analyse de la composition en acides gras a révélé que ces acides sont majoritairement de type insaturé (54,15%). Le pourcentage des acides gras saturés est de l'ordre de 34,68%. L'acide palmitique (C16:0), l'acide gras saturé majoritaire, représente 13,43%. L'acide icosapentanoïque EPA (C20 :5) et l'acide oléique (C18:1) sont les acides gras insaturés les plus abondants (19,14% et 16,42%) dans la fraction lipidique.

Les caroténoprotéines ont été récupérées à partir de sous-produits de crevettes suite à une homogénéisation, hydrolyse enzymatique, filtration, récupération du filtrat, centrifugation et lyophilisation du surnageant.

L'effet de la trypsine de barbeau sur l'extraction des caroténoïdes à partir des sous-produits de crevettes a été étudié. L'addition de la trypsine de barbeau à l'homogénéat des sous-produits de crevettes améliore considérablement l'efficacité de la récupération des protéines. Le taux de récupération de protéines dans les fractions solubles augmente au cours du temps. La teneur en protéines récupérée évolue rapidement au cours des premières 60 minutes puis elle tend à se stabiliser. Ceci suggère que la réaction enzymatique a atteint la phase d'équilibre après 60 min. L'ajout de la trypsine de barbeau influe également sur la quantité de caroténoïdes extraite. La teneur totale en caroténoïdes dans l'homogénéat des carapaces de crevettes, déterminée avec et sans traitement enzymatique, a atteint son maximum après 1 heure (62,4 µg/g pour le contrôle, alors qu'elle est d'environ 135,14 µg/g en ajoutant la trypsine de barbeau). Après 1 heure d'incubation, la teneur totale en caroténoïde a diminué. Cette diminution en fonction du temps peut être attribuée à l'instabilité des caroténoïdes dans le milieu réactionnel.

L'effet de concentrations croissantes en trypsine sur le taux de récupération de protéines et de caroténoïdes à partir des sous-produits de crevettes a été ensuite étudié. Les résultats ont montré que la teneur en protéines augmente en fonction du nombre d'unité enzymatique jusqu'à 1 unité/g de sous-produits de crevettes, au-delà la teneur en protéine tend à se stabiliser. Le même phénomène a été observé lors de la quantification de caroténoïdes après traitement enzymatique. La récupération des protéines et des caroténoïdes avec la trypsine de barbeau a été comparée à celle de la trypsine bovine. Pour un même nombre d'unité enzymatique (1 unité/g de sous-produits de crevettes), les deux trypsines ont manifesté une efficacité dans l'extraction des caroténoïdes, par rapport au contrôle (sans ajout d'enzyme). Toutefois, la trypsine de barbeau s'est montrée plus efficace dans la récupération de protéines et de caroténoïdes, par rapport à la trypsine bovine. En conclusion, la concentration de la trypsine utilisée et le temps d'hydrolyse affecte considérablement le rendement d'extraction des caroténoïdes. Le meilleur rendement a été obtenu en utilisant un niveau d'activité trypsinique de l'ordre de 1 U/g pendant 1 h à 25 °C.

L'étude comparative de la composition physicochimique des caroténoïdes récupérées avec ou sans ajout de la trypsine de barbeau relève une variation de la teneur en protéines. Les caroténoïdes récupérées moyennant la trypsine de barbeau présentent une teneur en protéines plus élevée (71,09% ± 0,19) en comparaison avec le contrôle. Toutefois, elles ont des faibles taux en cendres (7,78% ± 0,12) et en chitine (1,79% ± 0,04). La composition en acides aminés des deux caroténoïdes obtenues sans ou avec traitement

par la trypsine de barbeau sont comparables. Elles sont riches en glutamate (13,62% et 13,18%) et en aspartate (10,25% et 10,92%) pour la trypsine de barbeau et le contrôle, respectivement. La glycine, l'alanine, la leucine et la lysine sont également présentes à des pourcentages assez importants dans les deux caroténoprotéines.

L'astaxanthine a été récupéré à partir des caroténoprotéines suite à une hydrolyse enzymatique pendant 24 h à 30 °C, trois activités enzymatiques ont été utilisées à savoir : la trypsine bovine, la trypsine de barbeau et le mélange des deux enzymes. Ensuite, une filtration sur membrane d'ultrafiltration avec un seuil de coupure de 30 kDa a été réalisée.

L'analyse par HPLC des trois hydrolysats a montré que l'hydrolysate obtenu par traitement avec le mélange des deux trypsines, présente la teneur en astaxanthine la plus importante de l'ordre de 67 µg/g. Les teneurs en astaxanthine dans les hydrolysats traités avec la trypsine de barbeau ou avec la trypsine bovine sont de l'ordre de 59 µg/g et 51 µg/g, respectivement. Les résultats obtenus prouvent l'effet synergique des deux enzymes dans l'hydrolyse des caroténoprotéines et la libération de l'astaxanthine. Les teneurs en xanthophylles et en protéines solubles dans les trois hydrolysats ont été déterminées. Les résultats ont confirmé ceux obtenus lors de l'analyse par HPLC. En effet, l'hydrolysate obtenu par traitement avec le mélange des deux enzymes a présenté les meilleures teneurs en xanthophylles (93,21 µg/g) et en protéines totales (7,42 mg/g). Les caroténoprotéines hydrolysées par le mélange des deux trypsines ont été ensuite fractionnées avec une membrane d'ultrafiltration (30 kDa). La majorité de xanthophylles a été récupérée dans le perméat ($80,15 \pm 3,5$ µg/g). Ceci prouve que les liaisons entre les pigments et les protéines ont été clivées moyennant l'activité protéolytique des deux enzymes utilisées.

**Isolation and characterisation of carotenoproteins from deep-water
pink shrimp processing wasteHydrolysis**

Assaad Sila¹, Moncef Nasri¹ and Ali Bougatef^{1*}

*¹Laboratory of Microbiology and Enzyme Engineering – National School of Engineering,
P.O. Box 1173, Sfax 3038, Tunisia*

*Corresponding author: Ali Bougatef

E-mail: ali.bougatef79@gmail.com

Tel: +216 74 274 088; fax: +216 74 275595

Abstract

The effect of barbel (*Barbus callensis*) trypsin on the recovery and characteristics of carotenoprotein from pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) waste was studied. The recovery of carotenoprotein was maximized by the hydrolysis of shrimp waste using 1.0 trypsin Units/g of shrimp waste for 1 h at 25 °C. Freeze dried carotenoproteins recovered contained 71.09±0.19% protein, 16.47±0.68% lipid, 7.78±0.12% ash, 1.79±0.04% chitin, 87.42±2.54 µg total astaxanthin/g of sample and are rich in glutamate (13.18%) and aspartate (10.92%). Protein-pigment splitting, for astaxanthin recuperation, was carried out using barbel and bovine trypsins and the mixture of the two enzymes; then the protein was separated from the pigment by ultrafiltration. The hydrolysate obtained by treatment with the mixture of the two enzymes presented the best levels ($p < 0.05$) of xanthophylls (80.15 µg/g) and total protein (7.42 mg/g), respectively. Splitting the protein-pigment complex allows studies on pigment absorption, stability and application.

Keywords: *Parapenaeus longirostris*, barbel trypsin, carotenoprotein, enzymatic hydrolysis, Astaxanthin.

1. Introduction

Oceans constitute an extremely diversified alimentary richness (algae, crustaceans, shellfish, molluscs, and fish). According to the FAO [1], more than 145.1 million of tons of fish are actually caught or farmed annually worldwide. In 2010, the quantity of global releases was estimated at 24 million of tons, i.e., about 16.54% of the total catch. Commercial fish production and seafood processing generate large amounts of fish waste, which create burdensome disposal problems and environmental concerns. This biowaste contains, however, several biomass materials that can be biotechnologically exploited for the production of useful marketable products. It contains large amounts of biomolecules with high added-value that can be used for the formulation and development of various pharmaceutical, medicinal, and nutritional products. In fact, fish waste has traditionally been transformed into flour used as fertilizer or animal feed [2]. The low value-added flour-products of fishing have led researchers and seafood processors to search for new routes to adding value to these co-products. Shrimp processing involves the removal of the head and hard carapace, which account for about 70.0% of the whole animal [3] and produces large amounts of wastes; thereby posing a disposal problem for the shellfish industry. Shrimp and other crustacean-processing waste are a rich source of valuable by-products, such as protein, carotenoid pigments, flavor compounds, as well as chitin and chitosan [4]. Because of its high protein content, this shrimp waste could be a good source of protein for salmonid nutrition. Protein extracted from crustacean has been shown to be a good animal feed supplement in rations of farmed fish, such as salmon, trout or lobster or as a colorant and flavorant for use in food products [3]. During the past decades, increasing concerns have been expressed over the safety of several synthetic colorants, leading to strong pressures for the restriction and banning of their use in the food industry [5-7]. These rising concerns have triggered a pressing search for alternative food colorants from natural origins. In fact, several natural substitutes have been explored during the last few decades. Their effectiveness in real life applications seems, however, to be still challenged by the specific characteristics of the foods and conditions of application. According to Hendry [8], natural colors are derived from natural edible sources and are permitted throughout the world. The most widely distributed pigments are carotenoids, distinctive red to yellow colors in plants and animals. Astaxanthin is a red-orange carotenoid found in several bird and fish species, though being associated mainly with invertebrate animals, such as shrimp, crabs, and lobsters. The pigment is composed of 3 stereoisomers in a racemic mixture, forming a complex with a protein that accumulates in the crustacean exoskeleton [9]. This complex can be green, purple, or blue in

the living animal, acquiring a red color when subjected to heat treatment [10]. Protein-free astaxanthin can be used in a variety of products, such as foods, cosmetics, and pharmaceuticals. The red-orange color of astaxanthin is associated with high quality in various foods, such as salmon and trout; the inclusion of this pigment in their diets could, therefore, result in improved quality. It is also worth noting that natural carotenoids have often been reported to play important roles in fish reproduction [11].

Considering the potential for use, the present study was undertaken to investigate the potential recovery of lipids and carotenoprotein from the waste of shrimp processing, namely of pink shrimp (*P. longirostris*), one of the major species exploited in Tunisia. We also investigated the recuperation of astaxanthin, using an enzymatic hydrolysis process.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Astaxanthin, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), N α -benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA), glycine, bovine serum albumin was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA). Tris (hydroxymethyl) aminomethane was procured from Panreac Quimica SA (Spain). Other chemicals and reagents used were of analytical grade.

2.2. Collection of samples

The Deep-water pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) waste consisted of heads, thorax and appendix, were obtained in fresh condition from the shrimp processing plant located in Sfax, Tunisia. Prior to use, the shrimp shells were washed thoroughly with distilled water and grounded. The shells were then stored at -20 °C until further analysis.

The barbel (*Barbus callensis*) 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.

2.3. Preparation of alkaline crude protease extract from barbel viscera

Crude protease extract was prepared according to the method of Sila et al. [12]. Viscera from *B. callensis* were washed with water then with buffer A (10 mM Tris-HCl, pH 8.0). The cleaned viscera (100 g) were defatted by homogenization with cold acetone at a ratio of 1:2 (w/v) for 30 s using a Moulinex R62 homogenizer (Organotechnie, Courneuve, France). The homogenate was filtered using Whatman No.4 paper. The acetone insoluble material was washed three times with cold acetone and then dried at room temperature overnight. The acetone dried powder was homogenized for 2 h with buffer A at 4 °C (at a ratio of 1:10

(w/v)). The homogenate was centrifuged at 8,500×g and 4 °C for 30 min. The resultant supernatant was collected and used as the crude protease extract.

2.4. Barbel trypsin purification

Trypsin was purified from the viscera of *B. callensis* using ammonium sulphate (0-80.0%) precipitation, Sephadex G-100, and Mono Q-Sepharose ion exchange chromatography as described by Sila et al. [12].

2.5. Assay for trypsin activity

Amidase activity was measured according to a slightly modified version of the method of Erlanger et al. [13] as described by Benjakul et al.[14] using BAPNA as a substrate. The reaction was initiated by adding 200 µl of trypsin with an appropriate dilution to the preincubated reaction mixture that contained 1000 µl of 0.5 mM of BAPNA in reaction buffer (0.1 M glycine-NaOH, pH 10.0) and 200 µl of distilled water. The blend was mixed thoroughly and then incubated for 10 min at 30 °C. The enzymatic reaction was terminated by adding 200 µl of 30.0% (v/v) acetic acid and the reaction mixture was then centrifuged at 8000×g and room temperature for 3 min. Trypsin activity was measured by the increase in absorbance at 410 nm due to the release of *p*-nitroaniline. Trypsin amidase activity was then calculated using the following formula:

$$\text{Amidase activity (U/ml)} = \frac{(A - A_0) \times \text{Final volume of the mixture (ml)} \times 1,000}{8,800 \times \text{Time of the reaction (min)} \times 0.2 \text{ (ml)}}$$

Where 8800 M⁻¹ cm⁻¹ is the extinction coefficient of *p*-nitroaniline; A and A₀ are A₄₁₀ of the sample and the blank, respectively. One unit of activity was defined as the amount of enzyme required to release 1 µmol of *p*-nitroaniline per min. Values are the means of three independent experiments.

2.6. Extraction of Carotenoprotein

Carotenoprotein from shrimp waste was recovered by the method of Simpson and Haard [3], with slight modification. Ground shrimp waste (25 g) were blended with three volumes of 0.5 M EDTA (pH 10.0) using a waring blender. The mixture was added with barbel or bovine trypsin at a level of 1.0 U/g sample and shaken at 200 rpm in a shaking incubator (DAIHAN Labtech CO., LTD) at 25 °C for various time intervals (0, 1, 3, 5 and 7 h). For carotenoprotein extraction using bovine trypsin, the hydrolysis was conducted using the enzyme at the same level at 25 °C for 1 h. A control study was performed by incubating the mixture at 25 °C without trypsin for different times. At the time designated, the mixtures were filtered through several layers of cheesecloth, and the filtrate was adjusted to pH 4.5 with 2 M HCl. The precipitate was recovered by centrifugation at 5,000 g for 30 min at 4 °C using a refrigerated

centrifuge (MED-instrument MPW-350 R). The pellet obtained was dissolved in cold 20 ml of 5 mM sodium phosphate buffer, pH 7. The sample was lyophilized and the dry matter was referred to as “carotenoprotein.”

To determine the effect of enzyme concentration on the recovery of carotenoprotein, different amounts of barbel trypsin (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 and 3.0 U/g sample) were used. The hydrolytic reaction was carried out at 25 °C for 1 h, and the recovery of carotenoprotein was performed as previously described.

2.7. Protein Concentration

The protein content of the samples was measured by the Biuret method [15] using bovine serum albumin as a standard. Prior to analysis, 100 mg of sample were dissolved in 10 ml of 0.5 M NaOH for 1 h at 85 °C, followed by centrifugation at 9,000 g for 10 min. The supernatant was subjected to protein determination.

2.8. Estimation of Total Carotenoid Content

Total carotenoid content was determined according to the method of Saito and Regier [16] and Simpson and Haard [3], with slight modification. One gram of carotenoproteins, previously prepared, was homogenized in 25 ml of cold acetone (- 20 °C) for 2 min and the homogenate was filtered through a Whatman No. 1 filter paper under vacuum. The filtrate was placed in a separatory funnel and was partitioned with 25 ml of petroleum ether. The separatory funnel and contents were shaken gently and were left to stand at room temperature (25 °C) for 10 min. The lower layer was drawn off. The top layer was washed twice with 25 ml of distilled water. The petroleum ether layer obtained was dried by occasional shaking with 15 g of anhydrous sodium sulphate for 30 min. The dried material was filtered through a coarse sintered glass funnel. The residual sodium sulphate was then washed with small volumes of petroleum ether for several times to remove all pigments. The washings were pooled with the filtrate and then evaporated under vacuum at 50 °C using a rotary evaporator (Rotary evaporator, Stuart, UK). The residue was dissolved in petroleum ether and made up to a final volume of 10 ml. The absorbance of the extract, appropriately diluted, was measured at 468 nm. The concentration (C) of carotenoid in the extract was calculated using the equation given by Saito and Regier [16]:

$$C \text{ (}\mu\text{g/g sample)} = \frac{A_{468} \times \text{volume of extract} \times \text{dilution}}{0.2 \times \text{weight of sample used in grams}}$$

Where 0.2 is the A_{468} of 1 $\mu\text{g/ml}$ standard canthaxanthine

2.9. Compositional Analyses

The moisture and ash contents of shrimp shells and the carotenoprotein recovered with or without barbel trypsin were determined according to the [17]. Total nitrogen content was determined by using the Kjeldahl method. Crude protein was estimated by multiplying total nitrogen content by the factor of 6.25. Fat were determined gravimetrically after Soxhlet extraction of dried samples with hexane. All measurements were expressed on a dry weight basis and were performed in triplicate.

Chitin was determined according to the method of Spinelli et al [18] as modified by Simpson and Haard [3]. Samples (2 g) were mixed with 30 mL of 2.0% NaOH at 25 °C for 6 h. The mixture was filtered under vacuum using a Whatman No. 1 filter paper. The residue was shaken with 15 ml of 1 M HCl for 30 min at 25 °C, filtered and washed with deionized water. The washed residue was then homogenized with cold acetone (- 20 °C) to remove the pigment. After washing, 30 ml of 0.3% NaOCl were mixed with the sample and stirred for 6 h at 25 °C. The mixture was then filtered and washed with deionized water. The residue was dried at 60 °C for 24 h using a Universal oven (Karl Kolb. Scientific Technical Supplies, Germany) and dried material was referred to as “chitin.”

2.10. Determination of amino acid composition

In order to determine the amino acid composition, dry carotenoprotein was dissolved in distilled water at 1 mg/ml, and 50 ml of a sample was dried and hydrolyzed in vacuum-sealed glass tubes at 110 °C for 24 h in the presence of constant boiling 6 N HCl containing 0.1% phenol and using norleucine (Sigma Aldrich, Inc., St . Louis. MO, USA) as the internal standard. After hydrolysis, samples were again vacuum-dried, dissolved in application buffer and injected into Beckman 6300 amino acid analyzer (Beckman Instruments Inc., Fullerton, Calif., U.S.A). Determinations were performed in triplicate and data correspond to mean values. Standard deviations were in all cases lower than 2.0%.

2.11. Fatty acids analysis

Upon lipid extraction, the fatty acids methyl esters (FAMES) were prepared according to the method of Metcalfe et al. [19]. FAMES were analysed by an Auto System XL gas chromatograph (Perkin–Elmer, Waltham, MA) equipped with a flame ionisation detector was used to analyse the fatty acids pattern. The column used was an Elite-5 (cross-bond 5.0% diphenyl-95.0% dimethyl polysiloxane) capillary column (30 m x 0.53 mm i.d., 0.50 µm film thicknesses; Supelco, Bellefonte, PA). The oven temperature was held at 110 °C for 1 min, and then increased to 250 °C at 30° C/min, where it was held for 1.0 min, followed by an increase of 25 °C/min to 285 °C, where it was held for 2.0 min, when all peaks appeared. The

injector and detector were held at 285 and 290 °C, respectively. Helium was used as carrier gas at 3.0 cm/s linear velocity. Fatty acids were identified by comparison of retention times with known standards. The gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) analyses were performed on a single quadrupole mass spectrometer (Varian 1200L, Varian Inc., Palo Alto, CA) under electron impact (EI, ionisation energy 70 eV) conditions with an on-column injector set at 110 °C for confirmation of the identities of the fatty acids.

2.13. Protein-pigment hydrolysis

Dried carotenoprotein (100 mg) was resuspended in 100 ml of 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0. Three enzymatic systems were tested, each one equivalent to 5 enzymatic Units (BAPNA Units): bovine and barbel trypsins; and the mixture of the two using 2.5 BAPNA Units of each enzyme. One unit of activity was defined as the amount of enzyme required to release 1 µmol of *p*-nitroaniline per min. Proteolysis was carried out at 30 °C with continuous stirring. Soluble protein concentration and total xanthophylls were determined at a 24 h of incubation.

Soluble protein concentration was determined in the hydrolysate according to the method reported by Gornall et al. [15].

Xanthophyll concentration expressed as µg pigment/g residue, was spectrophotometrically determined at $\lambda = 474$ nm. Pigment concentration was obtained from the equation [17]:

$$\text{total xanthophylls } (\mu\text{g/g}) = \left(\frac{A \times D}{P \times 236} \right) (1000)$$

where A is absorbance at $\lambda = 474$ nm; D is dilution factor; P is sample weight; and 236 is trans-lutein specific absorption.

2.14. Astaxanthin and peptide separation and analysis

The hydrolyzed protein and pigment moieties in the reaction mixture were separated by ultrafiltration using stirred ultrafiltration cell (Millipore 8400) with 30.0 KDa. MW cut-off membrane (PBGC membrane, Millipore). The extract was concentrated by lyophilization and further resuspended in phosphate buffer.

Total xanthophylls concentration in the three hydrolysates (proteins and pigments), was evaluated according to the method described before. The three hydrolysates were analyzed for astaxanthin content using HPLC system equipped with refractive index detector (RID), the column was C-18 reversed phase analytical (250 mm × 4.6 mm Eurosphere 100-5 KNAWER).

The separation of different components of the hydrolysate was performed using a gradient of methanol (2.0% in water) and acetonitrile at the flow of 1 ml/min. Astaxanthin

was eluted in the fraction between 10.0% and 35.0% acetonitrile as a single peak and identified on the basis of retention time in comparison with that of standard astaxanthin. Calibration curves were established by injecting pure astaxanthin (Sigma-Aldrich, Germany) at different concentrations as a standard in the HPLC mobile phase.

2.15. 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 analyzed 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. Physicochemical characterization of shrimp waste

Table 1 shows the chemical composition of the pink shrimp residues. The crude protein content obtained ($31.3\% \pm 0.61$) showed that the pink shrimp residues were rich in this component, in agreement with values reported in the literature. Ibrahim et al. [20] reported values of 47.75% and 47.43% protein in the heads and shells of *Penaeus* spp. shrimp. Nargis et al. [21] found 49.47% protein in a mixture of residues from the species *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. In the same context, Sánchez-Camargo et al. [22] reported a protein content in Brazilian redspotted shrimp waste (*Farfantepenaeus paulensis*) reaching 49.0%. In addition to the high protein content, the analyses also showed high ash content of 28.16%. It was also noted that *P. longirostris* waste contains high percentages of chitin ($34.86\% \pm 1.67$).

Table 1

The fatty acid composition of *P. longirostris* lipids was determined (Table 2). Four fatty acids are highly represented in the lipidic composition of the shrimp waste: palmitic, stearic, oleic and bosseopentanoic acid. These fatty acids account for 6.54%, 13.43%, 16.42% and 19.14% of the total fatty acids of shrimp waste lipids, respectively. Among saturated fatty acids (SFAs), palmitic and stearic acids prevail. Among, monounsaturated fatty acids (MUFAs), oleic acid was the major component, with amount of 16.42%. The oleic acid content is two fold higher than that of *M. galloprovincialis* (8.90%) [23]. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) representing 22.48% of the total fatty acids in the shrimp waste with ω -6 being the most abundant.

Table 2

3.2. Carotenoprotein extraction by barbel trypsin

3.2.1. Effect of the extraction time on carotenoprotein recovery from shrimp waste

In a previous work [12] we have reported the effect of barbel trypsin at 1.0 U/g of shrimp waste on protein hydrolysis of pink shrimp waste. The findings suggested that only after 60 min did the enzyme reaction reach the equilibrium phase. The addition of barbel trypsin was also noted to have significant effect ($p < 0.05$) on the amount of carotenoids extracted. As 1 hour was the most efficient hydrolysis time, the rest of the study reported here was carried out with this time value.

3.2.2. Effect of barbel trypsin concentration on the recovery of carotenoprotein

The recovered protein was used as an indicator for barbel trypsin efficiency in the cleavage of the peptide bonds of the proteins from carotenoprotein complex. The total carotenoid pigment reflects the amounts that could be recovered after enzymatic hydrolysis. The effect of increasing trypsin concentrations on the recovery of protein and carotenoids from shrimp waste was then investigated (Fig. 1).

Figure. 1

The results presented in Fig. 1A show that the protein content increased with the addition of trypsin to a 1.0 U/g of shrimp waste, beyond which the protein tended to stabilize. The final amount of protein recovered was 8.5 mg/g for trypsin concentration of 3.0 U/g of shrimp waste. A similar amount was also recorded for the carotenoids (Fig. 1B) that were treated with barbel trypsin. In fact, Cano-Lopez et al. [24] previously reported that the increase in protease concentration had a positive effect on proteolysis and improved the recovery yields of proteins and carotenoid pigments, which was further demonstrated in the work of Klomklao et al. [25].

The recovery yields of protein and carotenoids attained with barbel trypsin were higher ($p < 0.05$) than those obtained with bovine trypsin. The two trypsins were noted to show more efficiency in the extraction of carotenoprotein compared to the control (without addition of enzyme). In the same context, Cano-Lopez et al. [24] showed that atlantic cod trypsin was more efficient in the extraction of carotenoprotein from shrimp waste than bovine trypsin. Likewise, Chakrabarti [26] showed that the recovery yield of carotenoprotein from shrimp waste using trypsin was higher than that obtained by pepsin or papain.

3.3. Chemical composition of carotenoprotein

The waste from the pink shrimp (*P. longirostris*) was made up to $34.86 \pm 1.67\%$ by the dry weight of chitin. The protein obtained was relatively high, in the range of $31.31 \pm 0.61\%$. This waste was, however, noted to have low lipid content ($3.97 \pm 0.42\%$) (Table 1). The

comparative study on the proximate composition of the carotenoprotein recovered with and without the addition of barbel trypsin showed a change in protein content.

The carotenoprotein recovered through trypsin showed higher protein content (71%) when compared to the control ($p < 0.05$) (Table 1). The high levels of protein and fat could be attributed to the solubilisation of protein during hydrolysis and the elimination of non-protein substances. The carotenoprotein derived by hydrolysis with barbel trypsin was observed, however, to have low ash ($7.78 \% \pm 0.12$) and chitin ($1.79\% \pm 0.04$). Similar shortages in terms of those two components were previously reported for carotenoprotein recovered from shrimp waste (*Pandulus borealis*) [3] and lobster [4,27]. Low levels of ash and chitin in carotenoprotein extracted from shrimp waste were also reported in the work of Chakrabarti [26].

3.4. Amino acid composition of carotenoprotein

The amino acid composition of carotenoprotein obtained with or without barbel trypsin treatment is presented in Table 3. The findings revealed comparable ($p > 0.05$) amino acid compositions. Both the carotenoproteins obtained with barbel trypsin and that of the control were rich in glutamate (13.62% and 13.18%) and aspartate (10.25% and 10.92%), respectively. This is, in fact, in agreement with the findings of Klomkiao et al. [25] and Zagalsky and Herring [28], reporting on the high abundance of glutamate and aspartate in the carotenoprotein from shrimp and black zebra copped, respectively. Likewise, Simpson and Haard [3] reported that the carotenoprotein extracted from shrimp waste treated with bovine trypsin was also rich in these amino acids.

Table 3

Glycine, alanine, leucine, and lysine were present in relatively large percentages in both carotenoproteins. Fish are unable to synthesize about half of the amino acids, including arginine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, cystine, tyrosine, threonine, tryptophan, and valine [27, 29]. For rearing salmonids, these amino acids must be supplemented to the diet to meet the protein requirements of these fish. The results showed that the carotenoprotein recovered by means of trypsin barbel was relatively rich, and can, therefore, be used as a supplement in the diet of salmonid fish.

3.5. Recovery after carotenoprotein enzymatically hydrolysis of astaxanthin

Astaxanthin is a Ketocarotenoid oxidized from β -carotene, which plays biological roles and possesses a number of desired features for food applications, such as natural origin, nil toxicity, high versatility, and both hydro and liposolubility [30]. Its attractive pink color, its

biological functions as vitamin A precursor and antioxidant, make astaxanthin widely sought for food and medical applications [31].

Astaxanthin was recovered from carotenoprotein after enzymatic hydrolysis for 24 h at 30 °C and filtration through an ultrafiltration membrane with a cut-off of 30 kDa; the filtrate was lyophilized to obtain a homogeneous fine powder called astaxanthin. To recover astaxanthin from the hydrolysate of carotenoprotein, three enzymes including: barbel and bovine trypsins, and a mixture of both enzymes, were used. The HPLC analysis (Fig. 2) of the three hydrolysates showed that the ones obtained by treatment with mixed trypsins presented the highest astaxanthin content ($p < 0.05$) reaching about 67 $\mu\text{g/g}$ of carotenoprotein.

Figure. 2

The levels of astaxanthin in each of the hydrolysates treated with barbel trypsin or bovine trypsin were in the order of 59 $\mu\text{g/g}$ of carotenoprotein and 51 $\mu\text{g/g}$ of carotenoprotein, respectively. These results reflected the synergistic effect of both enzymes in the hydrolysis of carotenoprotein and the release of astaxanthin. The small peaks recorded at the end of the profile presumably corresponded to oxidized forms of astaxanthin. In fact, similar results were reported by Armenta-Lopez et al. [32].

The levels of xanthophylls and soluble proteins in the three hydrolysates were determined. The results shown in Figs. 3 A and B, corroborated those obtained in the HPLC analysis. In fact, the hydrolysate obtained by treatment with the mixture of the two enzymes presented the best levels ($p < 0.05$) of xanthophylls (93.21 $\mu\text{g/g}$) and total protein (7.42 mg/g), respectively.

Figure. 3

The carotenoprotein hydrolyzed by a mixture of barbel and bovine trypsins were then fractionated with an ultrafiltrated membrane (30 kDa). The levels of xanthophylls and protein were then determined (Table 4). A small fraction of proteins passed through the membrane. The majority of xanthophylls was, however, recovered in the permeate (80.15 $\mu\text{g/g}$). This shows that the links between the pigments and proteins were cleaved through the proteolytic activity of the two enzymes used.

Table 4

4. Conclusion

In line with several reports in recent research showing that fishing biowaste can be biotechnologically exploited to produce various marketable products with high added value, the present study was undertaken to extract and characterize carotenoprotein from fishing biowaste, namely shrimp waste (*P. longirostris*), using trypsin barbel. The findings revealed

that trypsin concentration and hydrolysis time greatly affected the carotenoprotein extraction yields. The best results were obtained using a trypsin activity level of about 1.0 U/g of shrimp waste for 1 h at 40 °C. The study then aimed to isolate astaxanthin, from the carotenoprotein complex obtained during the first extraction. Different proteolytic preparations were used: barbel and bovine tryptins, and a mixture of the two latter enzymes. The astaxanthin levels that were obtained were in the ranges of 51.85, 59.31, and 67.42 µg/g of carotenoprotein, respectively. Further analysis using HPLC confirmed the purity of this molecule.

Acknowledgements

This work was funded by the “Ministry of Higher Education, Scientific Research and Technology, Tunisia”. The authors would like to express their sincere gratitude to Anouar Smaoui from the Faculty of Science of Sfax, Tunisia who provided professional support in the proofreading, editing, and language polishing of the present manuscript.

References

- [1] FAO, (2010). Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, Département des pêches et de l'aquaculture de la FAO, Rome.
- [2] S. Benjakul, M.T. Morrissey, Protein hydrolysates from pacific whiting solide wastes. *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 3423-3430.
- [3] B.K. Simpson, N.F Haard, The use of proteolytic enzymes to extract carotenoproteins from shrimps wastes. *J. Applied Biochem.* 7 (1985) 212-222.
- [4] H.S. Ramaswamy, B.K. Simpson, T.U. Ya, V. Yaylayan, Tray-drying of carotenoproteins recovered from lobster waste. *J. Food Process Preserv.* 15 (1991) 273-284.
- [5] A. Baublis, A. Spomer, M.D. Berber-Jiménez, Anthocyanin pigments: comparison of extract stability. *J. Food Sci.* 59 (1994) 1219-1234.
- [6] M.M. Giusti, R.E. Wrolstad, Characterization of red radish anthocyanins. *J. Food Sci.* 61 (1996) 322-326
- [7] L. Gao, G. Mazza, Extraction of anthocyanin pigments from purple sunflower hulls. *J. Food Sci.* 61 (1996) 600-603.
- [8] G.A.F. Hendry, Natural pigments in biology. In: Hendry GAF, Houghton JD, editors. *Natural food colorants*. 2nded. New York: Blackie Academic and Professional. 1996, pp. 1-39.
- [9] K. Schiedt, S. Bischof, E. Glinz, Metabolism of carotenoids and in vivo racemization of (3S, 3'S)-astaxanthin in the crustacean *Penaeus*. *Methodes in Enzymol.* 214 (1993) 148-168.

- [10] G. Britton, Carotenoids. In: Hendry GAF, Houghton JD, editors. Natural food colorants. 2nd ed. New York: Blackie Academic and Professional. 1996, pp. 197-243.
- [11] H.M. Chen, S.P. Meyers, Ensilage treatment of crawfish waste for improvement of astaxanthin pigment extraction. *J. Food Sci.* 48 (1983) 1516-1521.
- [12] A. Sila, R. Nasri, M. Jridi, R. Balti, M. Nasri, A. Bougatef, Characterisation of trypsin purified from the viscera of Tunisian barbel (*Barbus callensis*) and its application for recovery of carotenoproteins from shrimp wastes. *Food Chem.* 132 (2012) 1287–1295.
- [13] B.F. Erlanger, N. Kokowsky, W. Cohen, The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95 (1961) 271-278.
- [14] S. Benjakul, W. Visessanguan, P. Thummaratwasik, Isolation and characterization of trypsin inhibitors from some Thai legume seeds. *J. Food Biochem.* 24 (2000)107-127.
- [15] A.G. Gornall, C.J. Bardawill, M.M. David, Determinations of serum proteins by means of the biuret reactions. *J. Biol. Chem.* 177 (1949) 751-767.
- [16] A. Saito, L.W. Regier, Pigmentation of brook trout by feeding dried crustacean wastes. *J. Fish Res. Board of Canada.* 28 (1971) 509-512.
- [17] AOAC, (Association of Official Analytical Chemists). 2000. Official Methods of Analysis , 17th ed., Association of Official Chemists, Gaithersberg, MA.
- [18] J. Spinelli, L. Lehman, D. Wieg, Composition, processing and utilization of red crab (*Pleuroncodes planipes*) as an aquacultural feed ingredient. *J. Fish Res. Board of Canada.* 31 (1974) 1025-1029.
- [19] L.D. Metcalfe, A.A. Schmitz, J.R. Pelka, BF₃–methanol procedure for rapid quantitative preparation of methyl esters from lipids. *Anal. Chem.* 38 (1996) 514-516.
- [20] H.M. Ibrahim, M.F. Salama, H.A. El-Banna, Shrimp's waste: chemical composition, nutritional value and utilization. *Nahrung.* 43 (1999) 418-423.
- [21] A. Nargis, K.N. Ahmed, G.M. Ahmed, M.A. Hossain, M. Rahman, Nutritional value and use of shrimp head waste as fish meal. *Bangladesh J. Scien. Ind. Res.* 4 (2006) 63-66.
- [22] A.P. Sánchez-Camargo, M.A. Almeida Meireles, B.L. Fontoura Lopes, F.A. Fernando Antonio Cabral, Antonio Cabral, F. A. Proximate composition and extraction of carotenoids and lipids from Brazilian redspotted shrimp waste (*Farfantepenaeus paulensis*). *J. Food Eng.* 102 (2011) 87-93.
- [23] I. Miletic, M. Miric, Z. Lalic, S. Sobajic, Composition of lipids and proteins of several species of molluscs, marine and terrestrial, from the Adriatic Sea and Serbia. *Food Chem.* 41 (1991) 303–308.

- [24] A. Cano-Lopez, B.K. Simpson, N.F. Haard, Extraction of carotenoprotein from shrimp process wastes with the aid of trypsin from Atlantic Cod. *J. Food Sci.* 52 (1987) 503-506.
- [25] S. Klomklao, S. Benjakul, W. Visessanguan, H. Kishimura, B.K. Simpson, Extraction of carotenoprotein from black tiger shrimp shells with the aid of bluefish trypsin. *J. Food Biochem.* 33 (2009) 201-217.
- [26] R. Chakrabarti, Carotenoprotein from tropical brown shrimp shell waste by enzymatic process. *Food Biotechnol.* 16 (2002) 81-90.
- [27] T. Ya, B.K. Simpson, H. Ramaswamy, V. Yaylayan, J.P. Smith, C. Hudon, Carotenoproteins from lobster waste as a potential feed supplement for cultured salmonids. *Food Biotechnol.* 5 (1991) 87-93.
- [28] P.F. Zagalsky, P.J. Herring, Studies on carotenoprotein isolated from the copepod, *Labidocera acutifrons* and its relationship to the decapod carotenoproteins and other polyene-binding proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* 41 (1972) 397-415.
- [29] J.W. Hilton, S. Slinger, Nutrition and feeding of rainbow trout. *J. Canada Spec. Publ. Fish. Aquatic Sci.* 55 (1981) 1-15.
- [30] F. Delgado-Vargas, O. Paredes-López, Natural colorant for food and nutraceutical uses. FL, USA: CRC Press, Boca Raton. 2003, pp. 137-160
- [31] J. López-Cervantes, D.I. Sánchez-Machado, M.A. Gutiérrez-Coronado, N.J. Ríos-Vázquez, Quantification of astaxanthin in shrimp waste hydrolysate by HPLC. *Biomed. Chromatography.* 20 (2006) 981-984.
- [32] I. Armenta-Lopez, L. Guerrero, S. Huerta, Astaxanthin extraction from shrimp waste by lactic fermentation and enzymatic hydrolysis of the carotenoprotein complex. *J. Food Sci.* 67 (2002) 1002-1006.

Figures

Figure 1. Recovered protein (A) and total carotenoid (B) contents of pink shrimp waste homogenate in the presence of different levels of barbel and bovine trypsins. The hydrolytic reaction was conducted at 25 °C for 1 h.

Bars represent standard deviation from triplicate determinations.

Figure 2. HPLC profiles of hydrolysates obtained by treatment with barbel trypsin, bovine trypsin and mixture of both enzymes.

Figure 3. Total soluble protein (A) and total xanthophylls (B) obtained by 3 enzymatic treatments (bovine and barbel trypsins; and the mixture) of carotenoprotein.

Table 1. Proximate composition of deep-water pink shrimp shell and carotenoprotein recovered with or without barbel trypsin

Compositions (% dry weight basis)	Shrimp waste	Carotenoprotein	
		Control	Barbel trypsin-aided
Protein	31.3± 0.61	60.45± 0.31	71.09±0.19
Fat	3.97± 0.42	12.89± 0.02	16.47± 0.68
Ash	28.61± 0.79	14.71± 0.09	7.78± 0.12
Chitin	34.86± 1.67	5.96± 0.07	1.79± 0.04

Table 2. Fatty acid composition of shrimp waste (% of total fatty acids)

Fatty acids	Shrimp waste (%)
SFA	34.68 ± 0.81
MUFA	31.67 ± 0.77
PUFA	22.48 ± 0.5
UFA	54.15 ± 1.01
UFA/SFA	1.61 ± 0.01
PUFA/MUFA	0.71 ± 0.01
$\sum n-3$	5.64 ± 0.19
$\sum n-6$	22.02 ± 0.91
n-3/n-6	0.26 ± 0.03
$\sum n-9$	6.34 ± 0.84
C12:0	0.14 ± 0.01
C13:0	0.07 ± 0.01
C14:0	3.36 ± 0.50
C15:0	2.55 ± 0.20
C16:0	13.43 ± 1.30
C16:1 <i>n-3</i>	5.64 ± 0.22
C16:1	1.24 ± 0.04
C17:0	2.98 ± 0.10
C18:0	6.54 ± 0.15
C18:1 <i>n-9</i>	1.30 ± 0.09
C18:1	16.42 ± 1.15
C18:2 <i>n-6</i>	0.85 ± 0.07
C19:0	0.60 ± 0.11
C19:1 <i>n-9</i>	0.54 ± 0.01
C20:0	1.03 ± 0.12
C20:1 <i>n-9</i>	3.82 ± 0.71
C20:2	2.49 ± 0.46
C20:5 <i>n-6</i>	19.14 ± 2.64
C21:0	0.64 ± 0.09
C22:0	3.03 ± 0.75
C22:1 <i>n-9</i>	0.68 ± 0.09
C24:0	0.31 ± 0.02
C24:1 <i>n-6</i>	2.03 ± 0.31

SFA: C12:0 + C13:0 + C14:0 + C15:0 + C16:0 + C17:0 + C18:0 + C19:0 + C20:0 + C21:0 + C22:0 + C24:0

MUFA: C16:1 + C16:1 *n-3* + C18:1 + C18:1 *n-9* + C19:1 *n-9* + C20:1 *n-9* + C22:1 *n-9* + C24:1 *n-6*

PUFA: C18:2 *n-6* + C20:2 + C20:5 *n-6*

Table 3. Amino acid composition of carotenoprotein recovered with or without barbel trypsin

Amino acid composition	Carotenoprotein	
	Control (mol %)	Barbel trypsin-aided (mol %)
Asp + Asn	10.25	10.92
Thr	5.08	5.10
Ser	6.11	6.23
Glu + Gln	13.62	13.18
Pro	5.06	5.01
Gly	9.32	9.13
Ala	8.62	8.70
Cys	0.82	0.66
Val	5.23	5.50
Met	2.73	2.75
Ile	4.82	4.65
Leu	8.49	8.44
Tyr	3.56	3.50
Phe	3.72	3.71
His	2.12	2.12
Lys	7.52	7.51
Arg	6.30	6.41

Table 4. Total xanthophylls and soluble protein in the hydrolyzed carotenoprotein, obtained by treatment with the mixture of two trypsins, before and after separation by ultrafiltration

	Hydrolysate de caroténoprotéines	Retentât	Perméat
Xanthophylle (µg/g)	93,21 ± 2,54	5,87 ± 0,75	80,15 ± 3,5
Protéine (mg/g)	7,42 ± 0,88	6,54 ± 0,33	0,43 ± 0,07

Figure 1

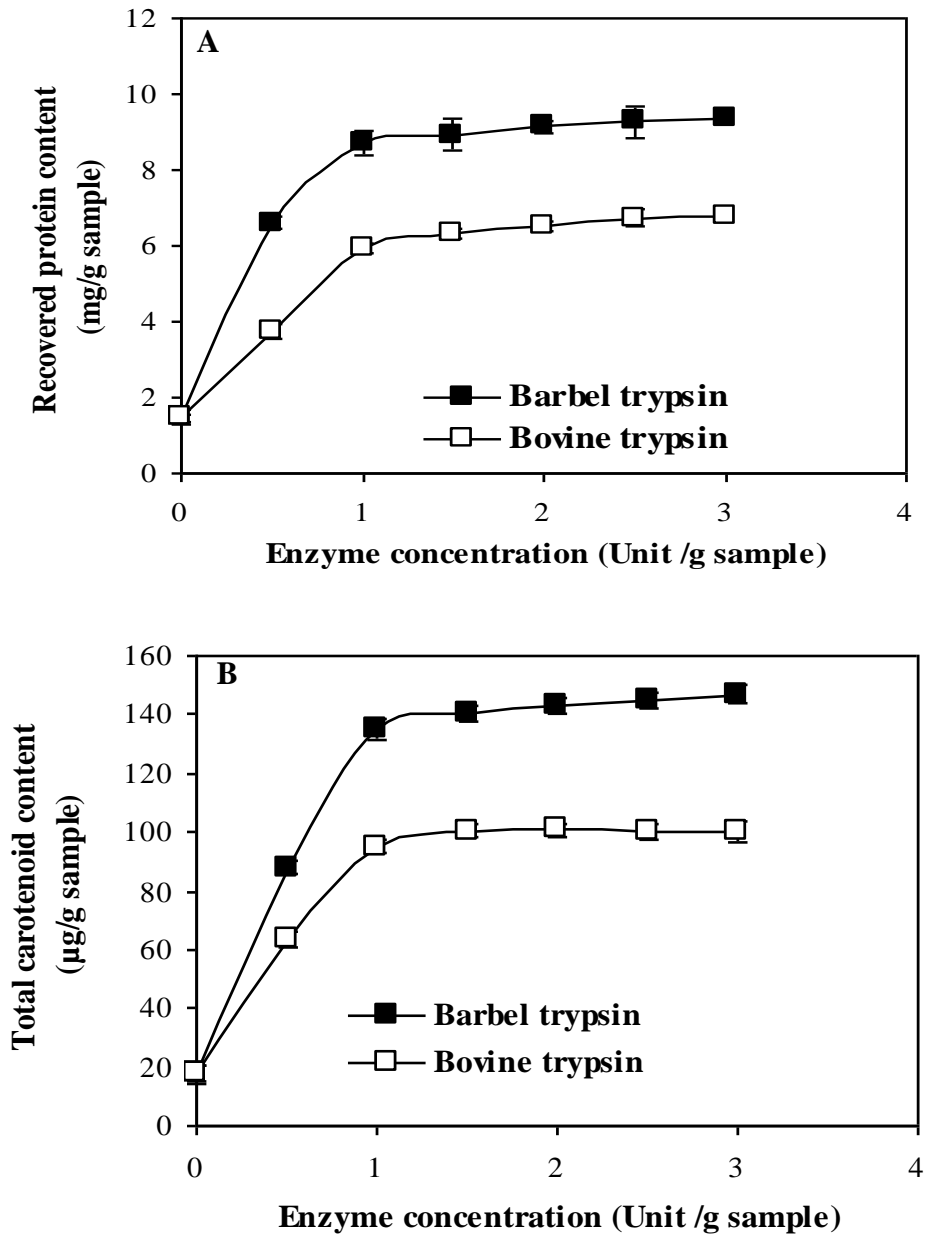


Figure 2.

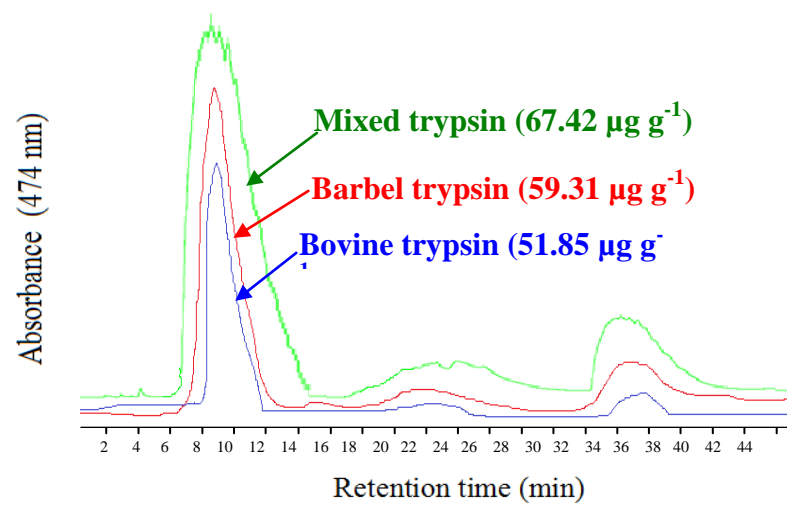
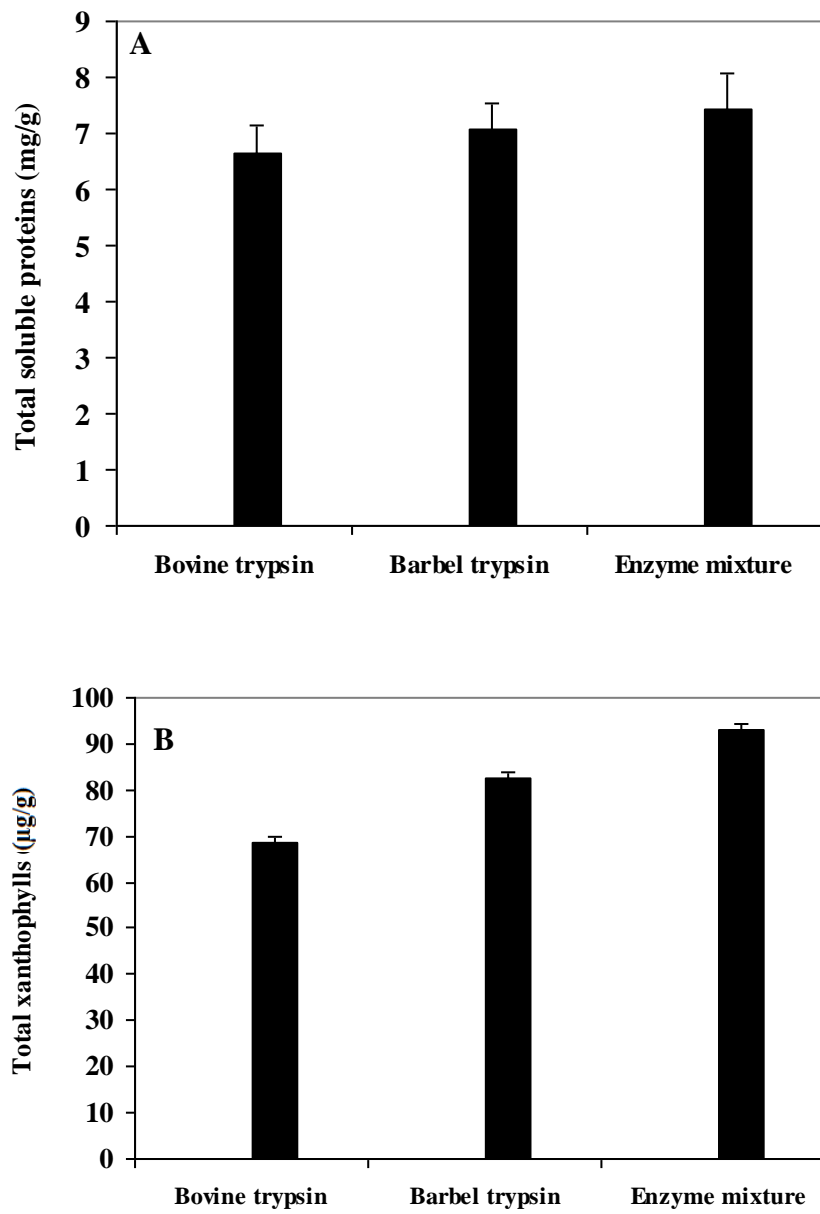


Figure 3.



Article 2:

Assaâd Sila, Yosra Ayed-Ajmi, Nadhem Sayari, Moncef Nasri, Oscar Martinez-Alvarez, Ali Bougatef (2013).

Antioxidant and anti-proliferative activities of astaxanthin extracted from the shell waste of deep-water pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). **The Natural Products Journal**. 3, 82-89.

Activités antioxydante et antiproliférative de l'astaxanthine extrait à partir des sous-produits de la crevette rose du large (*Parapenaeus longirostris*)

Assaâd Sila, Yosra Ayed-Ajmi, Nadhem Sayari, Moncef Nasri,
Oscar Martínez-Alvarez, Ali Bougatef

L'utilisation des pigments caroténoïdes par l'homme a subi une expansion rapide depuis le début des années cinquante. En aviculture et en aquaculture les animaux et les poissons reçoivent maintenant dans leur alimentation des suppléments de pigments caroténoïdes leur permettant d'obtenir les caractéristiques pigmentaires propre à leur espèce et, dans certains cas, de subvenir à leurs besoins physiologiques en caroténoïdes. Au-delà de leur rôle pigmentaire, ces composés sont susceptibles d'avoir des activités biologiques, certaines d'entre elles étant fondamentales: précurseurs de la vitamine A, activité antioxydante ou immuno-stimulante. Ces pigments sont aussi d'excellents anticancérigènes et possèdent des vertus antitumorales. Dans ce contexte et dans le cadre de la valorisation des sous-produits de la mer, les sous-produits de la crevette rose du large (*Parapenaeus longirostris*) ont été utilisés comme matrice pour l'extraction de l'astaxanthine. Les activités antioxydante et antiproliférative de ce dernier ont été évaluées.

Afin d'extraire ce pigment, deux solvants ont été utilisés à savoir l'acétone et l'éther de pétrole. La teneur en astaxanthine est de l'ordre de 72,42 µg/g de sous-produits. L'analyse de ce caroténoïde par chromatographie sur couche mince a montré la présence de trois bandes distinctes. Ceci suggère la présence de trois types de caroténoïdes. Les valeurs des rapports frontales R_f de ces trois bandes sont 0,33, 0,61 et 0,80 qui correspondent probablement à l'astaxanthine, l'astaxanthine monoester et l'astaxanthine diester, respectivement.

L'astaxanthine appartient à la grande famille des caroténoïdes dont elle possède de puissantes propriétés antioxydantes. La capacité de ce pigment à neutraliser l'oxygène singulet et à éliminer les radicaux libres de l'oxygène a éveillé l'intérêt des chercheurs. L'activité antioxydante ne peut pas être mesurée directement mais plutôt déterminée par l'effet de l'antioxydant sur l'étendu de la réaction d'oxydation. Au cours de cette étude, nous avons utilisé plusieurs tests : le test d'inhibition du radical libre DPPH, le test de réduction des ions

Fe³⁺ (pouvoir réducteur), le test de blanchiment du β -carotène et le test d'inhibition de l'oxydation de l'ADN.

Le pouvoir antiradicalaire de l'astaxanthine a été évalué moyennant le test au DPPH[•]. Ce test a montré que l'astaxanthine utilisée à des concentrations de 150 et 200 μ g/ml présente un pouvoir antiradicalaire qui est de l'ordre de 100%. L'astaxanthine à une concentration de 150 μ g/ml possède un pouvoir réducteur puissant qui est de l'ordre de 1,8. Quelque soit la concentration testée, les valeurs obtenues sont supérieures à celles du BHA (utilisé comme antioxydant de référence). L'addition de l'astaxanthine au mélange d'acide linoléique- β -carotène empêche le blanchiment de ce dernier, ce qui témoigne qu'il s'agit d'un puissant piègeur de radicaux libres. Les activités antioxydantes déterminées à des concentrations de l'ordre de 100 et 150 μ g/ml d'astaxanthine sont de l'ordre de 98,2% et 100%, respectivement.

L'oxydation de l'ADN est un problème assez grave chez les organismes vivants. Le radical hydroxyle est considéré comme la principale espèce réactive de l'oxygène causant l'oxydation de l'ADN cellulaire. Ce radical est produit *in vivo* par des réactions de type Fenton induite par les métaux de transition. Afin d'évaluer la capacité de l'astaxanthine à inhiber l'oxydation de l'ADN et sa dégradation sous l'action des radicaux hydroxyles le plasmide pCRTMII TOPO a été utilisé. La capacité de l'astaxanthine à inhiber la dégradation de l'ADN plasmidique est évaluée par l'observation des produits de migration du plasmide sur gel d'agarose. Les résultats ont montré que les radicaux hydroxyles générés par la réaction de Fenton dégradent complètement l'ADN plasmidique qui était initialement sous ses deux formes superenroulée et circulaire ouverte. Alors qu'au niveau des puits renfermant le plasmide, le réactif de Fenton et différentes concentrations en astaxanthine on a remarqué une protection de l'ADN contre l'oxydation.

L'activité antiproliférative de l'astaxanthine a été mise en évidence moyennant des cellules tumorales de carcinome laryngé humain (cellules Hep-2). Pour cela deux tests colorimétriques de cytotoxicité ont été réalisés : le test du sel de tétrasolium (test MTT) et le test du rouge neutre (test RN).

Le test MTT est un test de viabilité cellulaire basé sur la mesure de l'activité d'une enzyme mitochondriale : la succinate déshydrogénase. La conversion du succinate en fumarate peut être couplée à la réaction colorimétrique de réduction du MTT de couleur jaune en formazan de couleur bleue détectable spectrophotométriquement à 540 nm. La diminution ou l'absence de l'absorbance correspond à l'inactivation de la succinate déshydrogénase et donc à l'inactivité mitochondriale qui indique une mortalité cellulaire. L'exposition des cellules Hep-2 à des doses croissantes d'astaxanthine pendant 24 heures a montré une nette

diminution du pourcentage de viabilité cellulaire qui a passé de $94,7\% \pm 0,04$ à $40,9\% \pm 0,02$ respectivement pour les concentrations en astaxanthine allant de 20 à 350 $\mu\text{g/ml}$. Cette augmentation est dose dépendante. La concentration inhibitrice de 50% des cellules (CI_{50}) déterminée est de l'ordre de 320 μg d'astaxanthine/ml.

Le rouge neutre, utilisé dans le test de cytotoxicité RN, est un colorant cationique faible qui pénètre facilement dans les membranes cellulaires et s'accumule au niveau intracellulaire dans les lysosomes. L'altération de la surface cellulaire de la membrane lysosomale sensible entraîne une diminution de la fixation du rouge neutre, sur la base de laquelle on peut distinguer les cellules vivantes, des cellules mortes ou abîmées. Les résultats obtenus par ce test sont similaires à ceux obtenus par le test MTT. Une diminution de la prolifération cellulaire des cellules Hep-2 est nettement observée en présence de concentrations croissantes de l'astaxanthine. L'activité antiproliférative de l'astaxanthine est donc dose dépendante avec une CI_{50} de l'ordre de 300 μg d'astaxanthine/ml.

**Antioxidant and anti-proliferative activities of astaxanthin
extracted from the shell waste of deep-water pink shrimp
(*Parapenaeus longirostris*)**

**Asaâd SILA^{1*}, Yosra AYED-AJMI², Nadhem SAYARI¹, Moncef NASRI³
Oscar MARTÍNEZ-ALVAREZ⁴ and Ali BOUGATEF¹**

¹*Unité Enzymes et Bioconversion. Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, Université de Sfax.
B.P "1173" 3038 Sfax, Tunisia;*

²*Laboratoire de Recherche sur les Substances Biologiquement Compatibles, Faculté de
Médecine Dentaire de Monastir, Rue Avicenne 5019 Monastir, Tunisia;*

³*Laboratoire de Génie Enzymatique et de Microbiologie – Ecole Nationale d'Ingénieurs de
Sfax, Université de Sfax. B.P "1173" 3038 Sfax, Tunisia;*

⁴*Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Ciudad Universitaria,
28040 Madrid, Spain; 5Institut Supérieur de
Biotechnologie de Sfax, Route Sokra km 4, BP 1175, 3038, Sfax Tunisie*

*Corresponding author: Tel.: 216 74-274-088; fax: 216 74-275-595;

E-mail address: assaadsila@gmail.com

Abstract

Shrimp processing waste is the single largest industrial waste in Tunisia causing diverse environmental problems. Extraction of astaxanthin from the shell waste of the deep-water pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) was investigated. A high astaxanthin yield was obtained using acetone (72.42 µg/g). Thin layer chromatographic separation of carotenoid extracts from *P. longirostris* yielded three distinct bands. The R_f values for the three bands were respectively 0.33, 0.60, 0.80 which corresponded to astaxanthin, astaxanthin monoester and astaxanthin diester.

The antioxidant activities of astaxanthin at different concentrations were evaluated using various *in vitro* antioxidant assays, including 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, reducing power, β -carotene bleaching and DNA nicking assays. Interestingly, astaxanthin extract showed strong antioxidant activity. The radical scavenging activities and reducing powers of astaxanthin were close to and even better than those of the synthetic antioxidant BHA. The astaxanthin extract from shrimp shell waste exhibited high inhibition of β -carotene bleaching and also showed a well DNA protection against degradation by hydroxyl radicals. The anti-proliferative activity of the astaxanthin extract was also investigated. The inhibition concentration (CI_{50}) of proliferation of tumor cells of human laryngeal carcinoma (Hep 2 cells) was 300 µg astaxanthin /ml.

Keywords: Antioxidant activity, antiproliferative activity, Astaxanthin, *Parapenaeus longirostris*, Shrimp waste.

INTRODUCTION

In several of the major fish-producing countries, the by-products of seafood harvesting comprise about 50% of the entire harvest. These materials, which represent an environmental problem to the fishing industry, constitute an important source of proteins, enzymes and carotenoids.

Shrimp processing is one of the important marine industry in Tunisia that generates considerable quantities of solid waste in the form of head and body carapace. These body parts comprise 48–56% depending on the species [1]. Shrimp waste is one of the important sources of natural carotenoids [2]. The recovery of these valuable components from the waste would not only improve the economy for shrimp processors, but also would minimize the pollution potential of the shrimp waste. These by-products could be the cheapest raw materials for carotenoid recovery, and later could be a better alternative to synthetic carotenoid. The major carotenoids in the wastes of shrimps are astaxanthin and its esters [1]. The carotenoids would find use as a pigment source in feed for cultured salmon and shrimps and also as a food colorant particularly in seafood analogs [2].

Synthetic antioxidants have been widely used in the stabilization of food. The two most commonly used are butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT), which are added to fatty and oil foods to prevent oxidative deterioration [3]. However, the use of these chemical compounds has begun to be restricted because of their induction of DNA damage and their toxicity [4]. Moreover, both BHT and BHA appear to be involved in tumor promotion [5]. Therefore, there is great interest in finding new and safe antioxidants from natural sources.

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β,β -carotene-4,4'-dione) is a ketocarotenoid derived from the oxidation of β -carotene. Its structure contains both ketonic and hydroxylic functional groups, which are responsible for its exceptional antioxidant properties in free radicals scavenging and in quenching singlet oxygen [6]. Astaxanthin, the main carotenoid found in crustaceans, has been shown to be an effective pigment when incorporated into feeds for salmonidae and crustaceans [7, 8, 9]. Astaxanthin also has other important applications in food industries [10]. This pigment is a potent antioxidant and has a possible role in human health, according to Guerin et al [10].

The present study was undertaken to investigate the potential recovery of astaxanthin using organic solvents from the waste of shrimp processing, namely of pink shrimp (*P. longirostris*), one of the major species exploited in Tunisia. The *in vitro* antioxidant property and anti-antiproliferative activity of shrimp shell astaxanthin were also studied.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), butylated hydroxyanisole (BHA), β -carotene and linoleic acid were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium, Foetal Calf Serum (FCS), Phosphate Buffer Saline (PBS), Trypsine-EDTA, Penicilline and Streptomycin mixture were from GIBCO-BCL (UK), 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl), 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). All other chemicals, namely potassium ferricyanide, trichloroacetic acid (TCA), ferric chloride, sodium hydroxide, Folin-Ciocalteu reagent, aluminium chloride, sodium nitrite, sodium carbonate, Tween 40 and other solvents, were of analytical grade. All solutions were freshly prepared in distilled water.

Raw material

The shrimp (*Parapenaeus longirostris*) shell consisted of heads, thorax and appendix, were obtained in fresh condition from a local shrimp processing plant at Sfax, Tunisia. Prior to use, the shrimp shells were thoroughly washed with distilled water and grounded. The shells were then stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further use.

Compositional Analyses

The moisture and ash contents of shrimp shells were determined according to the AOAC [11]. The total nitrogen contents were measured by Kjeldahl in an automated apparatus (Buchi, Switzerland). Protein contents in the shells and crude chitin were determined (in three replicates) by extracting (0.5 g/50 ml) samples with 10% (w/v) NaOH for 20 min at $121\text{ }^{\circ}\text{C}$. The supernatant was retained by filtration and diluted to 100 ml with distilled water. This extract (10 ml) was used for protein determination ($N \times 6.25$) according to the Kjeldahl procedure. Fat were determined gravimetrically after Soxhlet extraction of dried samples with hexane. All measurements were expressed on a dry weight basis and were performed in triplicate.

Astaxanthin extraction

Astaxanthin was extracted according to the method of Sindhu and Sherief [12]. One hundred grams of shrimp shells were mixed with 200 ml of acetone containing 100 mg of BHT/l. The mixture was mechanically agitated for 16 h in the dark at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The red pigmented solvent was recovered under slight vacuum filtration (filter paper no. 1, Whatman, SIGMA, USA). Fresh acetone (125 ml) was added to the flasks and they were agitated for another 2 h. The pooled extract was collected in a separating funnel, 125 ml of petroleum ether and 94 ml

of 0.73% (w/v) NaCl solution were added. After thorough mixing the epiphase was collected. To the lower phase an equal volume of water was added, mixed and the epiphase was collected, the pooled epiphase was concentrated under vacuum (Rotary evaporator, Stuark, UK) at temperatures not exceeding 45°C.

Quantification of astaxanthin

The organic solvent extracted astaxanthin was quantified by measuring absorbance at 470 nm and using the equation of Kelley and Harmon [13]

$$AST \ (\mu\text{g/g}) = \frac{A \times D \times 10^6}{100 \times G \times d \times E_{1\text{cm}}^{1\%}}$$

Where AST is astaxanthin concentration in $\mu\text{g/g}$, A is absorbance, D is volume of extract in hexane, 10^6 is dilution multiple, G is weight of sample in g, d is cuvette width (1cm) and E is extinction co-efficient, 2100.

Identification of different components in shrimp shell waste extract by thin layer chromatography (TLC)

Analysis of different components in the shrimp shell extract was done using thin layer chromatography (TLC) based on the method of Kobayashi and Sakamoto [14]. For this, a small volume of the extract was spotted on silica gel G plate and developed using acetone: hexane 3:7 (v/v). The separated bands were identified using internationally accepted R_f values for astaxanthin monoester and astaxanthin diester.

Antioxidant activity

DPPH assay

The DPPH radical-scavenging activity of astaxanthin was determined by the method of Kirby and Schmidt [15] with some modifications. A volume of 500 μl of astaxanthin at different concentrations (25 to 200 $\mu\text{g/ml}$) was added to 375 μl of 99% ethanol and 125 μl of DPPH solution (0.2 mM in ethanol) as free radical source. The mixtures were incubated for 60 min in the dark at room temperature. Scavenging capacity was measured spectrophotometrically (Labomed. Inc, USA) by monitoring the decrease in absorbance at 517 nm. In its radical form, DPPH has an absorption band at 517 nm which disappears upon reduction by an antiradical compound. Lower absorbance of the reaction mixture indicated higher free radical-scavenging activity. BHA was used as positive control. DPPH radical-scavenging activity was calculated as:

$$DPPH \text{ radical - scavenging activity } (\%) = \frac{A_{\text{control}} + A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

Where A control, A blank and A sample are, respectively, the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the sample), the astaxanthin extract without DPPH solution and the astaxanthin extract with DPPH solution. The test was carried out in triplicate.

Ferric-reducing activity

The reducing power of astaxanthin was determined by the method of Yildirim et al [16]. Sample solutions (0.5 ml) containing different concentrations of astaxanthin (25 to 200 µg/ml) were mixed with 1.25 ml of 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6) and 1.25 ml of 10 g/l potassium ferricyanide solution. The mixtures were incubated for 30 min at 50 °C. After incubation, 1.25 ml of 100 g/l TCA was added and the reaction mixtures were centrifuged for 10 min at 3000 g. A 1.25 ml aliquot of the supernatant from each sample mixture was mixed with 1.25 ml of distilled water and 0.25 ml of 1.0 g/l ferric chloride solution in a test tube. After a 10 min reaction time, the absorbance was measured at 700 nm. Higher absorbance of the reaction mixture indicated higher reducing power. The control was conducted in the same manner, except that distilled water was used instead of sample. The test was carried out in triplicate.

β-carotene bleaching assay

The ability of astaxanthin to prevent β-carotene bleaching was assessed as described by Koleva et al [17]. A stock solution of β-carotene/linoleic acid mixture was prepared by dissolving 0.5 mg of β-carotene, 25 µl of linoleic acid and 200 µl of Tween 40 in 1 ml of chloroform. The chloroform was completely evaporated under vacuum in a rotatory evaporator at 40 °C, then 100 ml of bi-distilled water were added, and the resulting mixture was vigorously stirred. The emulsion obtained was freshly prepared before each experiment. Aliquots (2.5 ml) of the β-carotene/linoleic acid emulsion were transferred to test tubes containing different astaxanthin concentrations (25, 50, 100, 150 and 200 µg/ml). After two hours incubation at 50 °C, the absorbance of each sample was measured at 470 nm. BHA was used as positive standard. The control tube contained no sample.

Antioxidant activity in β-carotene bleaching model in percentage was calculated with the following equation:

$$\text{Antioxidant activity \%} = [1 - (A_0 - A_t) / (A'_0 - A'_t)] \times 100$$

Where A_0 and A'_0 are the absorbances of the sample and the blank, respectively, measured at time zero, and A_t and A'_t are the absorbances of the sample and the blank, respectively, measured after 2 h. Tests were carried out in triplicate.

DNA nicking assay

DNA nicking assay was performed using pCRII™TOPO plasmid (Invitrogen) by the method of Lee et al [18] with slight modifications. A mixture of 10 µl of astaxanthin at the concentration of 25 to 150 µg/ml and plasmid DNA (0.5 µg/well) were incubated for 10 min at room temperature followed by the addition of 10 µl of Fenton's reagent (30 mM H₂O₂, 50 mM L-ascorbic acid and 80 µM FeCl₃). The mixture was then incubated for 5 min at 37 °C. The DNA was analysed on 1% (w/v) agarose gel using ethidium bromide staining.

Anti-proliferative activity

Cell culture and treatment

The tumor cells of human laryngeal carcinoma (Hep 2 cells), (Biovalori, France), were grown as monolayer culture in RPMI 1640 medium (pH 7-8) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1% L-glutamine (200 mM), 1% of mixture Penicillin (100 µg/ml) and Streptomycin (100 µg/ml) incubated at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂.

Determination of cell viability

MTT assay

Cytotoxicity of astaxanthin was defined using the colorimetric method described by Carmichael et al [19]. This method assesses the ability of viable cells to form MTT formazan by the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase.

Hep2 cells were seeded on 96-well culture plates (Polylabo, France) at 105 cells/well and treated with the following concentrations of 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 and 350 µg/ml for 24 hours at 37 °C. At the end of the designed reaction time, the culture medium was replaced by 200 µl medium containing 0.5 mg/ml MTT and the plates were incubated 3 hours at 37 °C. The medium was then removed and replaced by 200 µl of (0.04 M HCl/isopropanol) to solubilize the converted purple dye in culture plates. The absorbance was measured on a spectrophotometer microplate reader (Dynatech 4000) at 545 nm.

Cell viability was expressed as the relative formazan formation in treated samples as compared to control cells [(A₅₄₅ treated cells/A₅₄₅control cells) 100%]. IC₅₀ value defined as the concentration inducing 50% loss of cell viability.

Neutral Red (NR) assay

This second cytotoxicity assay was carried out using NR dye. This assay is based on the incorporation of the supravital dye NR, into the lysosomes of viable cells only. The NR assay was performed as described by Borenfreund and Puerner [20].

Hep 2 cells were seeded in 96-well plates at a density of 2.104 cells/well. After 24 h, the growing cells were treated with increasing concentrations of astaxanthin (25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 and 350 µg/ml) for 24 h. The solutions were removed from the plates and the cells were washed with 200 µl of PBS/well. Then, cells received 150 µl of the NR solution (50 mg/ml NR in RPMI) and were incubated for 3 h, and washed three times with PBS. The dye within viable cells was released by extraction with a mixture of acetic acid, ethanol and water (1:50:49). Absorbance of NR was measured using a spectrophotometric microplate reader at 540 nm. NR uptake, which is proportional to the number of viable cells, was expressed as a percentage of uptakes as compared to control.

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 analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 10.0 (Chicago, Illinois, USA). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical characterization of shrimp waste

Table 1 shows the chemical composition of the pink shrimp residues. The crude protein content obtained ($31.3\% \pm 0.61$) showed that the pink shrimp residues were rich in this component, in agreement with values reported in the literature. Ibrahim et al [21] reported values of 47.75% and 47.43% protein in the heads and shells of *Penaeus spp.* shrimp. Nargis et al [22] found 49.47% protein in a mixture of residues from the species *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. In the same context, Sánchez-Camargo et al [23] reported a protein content in Brazilian redspotted shrimp waste (*Farfantepenaeus paulensis*) reaching 49%. In addition to the high protein content, the analyses also showed high ash content of 28.16%. It was also noted that *P. longirostris* waste contains high percentages of chitin ($34.86\% \pm 1.67$).

Extraction and quantification of astaxanthin from shrimp shell waste

The raw material used for the present study was shrimp shell wastes of deep-water pink shrimp (*P. longirostris*). To ensure maximum yield of carotenoid pigments this deep sea species was selected. The astaxanthin was quantified in the shrimp shell extract of *P. longirostris* in the present study at 470 nm in hexane. The level of astaxanthin was in the order of 72.42 µg/g. Sachindra et al [24] reported that a mixture of isopropyl alcohol and

hexane gave the highest yield (43.91 µg/g wet waste) of carotenoid compared to acetone (40.60 µg/g wet waste). On the contrary in the study of Sindhu and Sherief [12] highest carotenoid yield was obtained with acetone (87.14 µg/g), when compared to 60:40 solution of hexane: isopropanol that yielded (70.27 µg/g). Vimala and Paul [25] have reported that maximum yield of carotenoids from *Penaeus monodon* waste was obtained with acetone, compared to other solvents used for extraction.

Our results are better compared to other works may be due to the high polarity of acetone compared to other solvents and to the use of vegetable oils for extraction. In addition, the amount of asthaxantin can change from one species to another.

Determination of different components in shrimp shell waste extract by thin layer chromatography

Thin layer chromatographic separation of carotenoid extracts from *P. longirostris* yielded three distinct bands (Photoplate 1). The R_f values for the three bands were respectively 0.33, 0.60, 0.80 which corresponded to astaxanthin, astaxanthin monoester, astaxanthin diester (Table 2). The R_f values obtained for astaxanthin monoester and astaxanthin diester are in agreement with the results reported by Kobayashi and Sakamoto [14], 0.60 for astaxanthin monoester and 0.75-0.85 for astaxanthin diester. The R_f value of astaxanthin obtained in the present study is in accordance with the R_f value obtained for the standard astaxanthin and also the R_f value reported by Todd [26].

Antioxidant activity

DPPH assay

DPPH method is widely used for investigating the free radical-scavenging activities of compounds. DPPH is a stable free radical that shows maximum absorbance at 517 nm. When DPPH radicals encounter a proton-donating substrate such as an antioxidant, the radicals would be scavenged and the absorbance at 517 nm would be reduced [27]. The decrease in absorbance is taken as a measure for radical scavenging activity.

DPPH radical scavenging activities of astaxanthin and BHA (used as positive control) as shown in Fig.1 are concentration-dependent. The astaxanthin extracted from shrimp shell was a strongest radical scavenger with an IC_{50} of 15.87 µg/ml.

It is interesting to note that under the same conditions, astaxanthin showed similar ($p > 0.05$) free radical-scavenging activity as BHA over the entire concentration range tested. For example, at 150 µg/ml concentrations, the scavenging activities of BHA and astaxanthin were 100%. The obtained results suggested that astaxanthin are significantly strong radical

scavengers. The radical-scavenging activity of astaxanthin was higher than that of the Carotenoids from the arabian red shrimp *Aristeus alcocki* [12].

Reducing power

The reducing power assay is often used to evaluate the ability of an antioxidant to donate electron or hydrogen [27]. Different studies have reported that there is a direct correlation between antioxidant activities and reducing powers of some bioactive compounds.

In this study, the ability of astaxanthin to reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} was determined. BHA was used as positive control. As shown in Fig. 2, the reducing activity of astaxanthin and BHA increased with increasing concentration. Astaxanthin had an important reducing power at all concentrations tested. Interestingly, astaxanthin displayed higher reducing power activity than that of BHA. At 25, 50, 100 and 150 $\mu\text{g/ml}$, the reducing power of astaxanthin were 0.8, 1.5, 1.71 and 1.802, respectively, while those of BHA were 0.6, 1.22, 1.541 and 1.683, respectively.

β -carotene bleaching assay

The antioxidant assay using the bleaching of β -carotene is widely used to measure the antioxidant activity of bioactive compounds. In this assay, the oxidation of linoleic acid produces hydroperoxyl radicals evolving towards lipid hydroperoxides, conjugated dienes, and volatile by-products, which simultaneously attack the highly unsaturated β -carotene resulting in bleaching of the reaction emulsion [28]. In this test, β -carotene undergoes a rapid discolouration in the absence of antioxidant, which results in a reduction in the absorbance of the test solution with increasing reaction time. The presence of antioxidant can hinder the extent of β -carotene-bleaching by neutralizing the linoleic hydroperoxyl radicals formed [29].

The antioxidative activities of astaxanthin extracted from shrimp shell, as well as the positive control BHA, as measured by the bleaching of β -carotene, are presented in Fig. 3. In this assay, the antioxidant activity of astaxanthin extracts increased with increasing extract concentration. The antioxidant activities of astaxanthin at a concentration of 100 and 150 $\mu\text{g/ml}$ were 98.2% and 100 %, respectively. The control, without sample, rapidly oxidized and the absorbance at 470 nm tends to zero. Therefore, the high detected antioxidant activity of astaxanthin suggests their possible efficiency in preventing the oxidative degradation of membrane lipids.

DNA nicking assay

Hydroxyl radical is the most reactive free radical. It has the highest 1-electron reduction potential (2310 mV) [30] and can react with everything in living organisms: lipids,

polypeptides, proteins and DNA, especially thiamine and guanosine [31]. In order to find new compounds to control oxidative DNA damage which has been particularly implicated in carcinogenesis, the effect of astaxanthin at 25, 50, 100 and 150 $\mu\text{g/ml}$ concentrations on DNA cleavage was investigated (Fig. 4).

Hydroxyl radicals generated by the Fenton reaction are known to cause oxidative induced breaks in DNA strands to yield its open circular or relaxed forms. Figure 4 shows the agarose gel electrophoresis pattern of plasmid DNA incubated with Fenton's reagent in the absence and presence of astaxanthin. Lane 1 showed an untreated plasmid with its two forms: the upper one is open-circular (nicked) DNA and the faster migrating band corresponded to supercoiled (closed circular) plasmid. Incubation of plasmid DNA with Fenton's reagent in the absence of astaxanthin resulted in the complete degradation of the two DNA bands (native supercoiled circular DNA and open circular form) (lane 2). This DNA damage was reduced in the presence of astaxanthin.

The results show that the protective affect of astaxanthin is dose dependent (line 3 to 6). The astaxanthin at a concentration of 150 $\mu\text{g/ml}$ is most protective against DNA degradation by hydroxyl radicals. Indeed, the increases in the intensity of the circular shape open at the expense of that of the supercoiled form means there are few hydroxyl radicals that have escaped the action of astaxanthin and that contributed to the conversion of supercoiled form in a relaxed shape.

Anti-proliferative activity

In this study, we performed tow tests to assess the cytotoxicity of astaxanthin after 24 hours. The effect of astaxanthin on cell viability was investigated by the MTT assay. Growing cultures of Hep 2 cells were exposed to increasing concentrations of astaxanthin: 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 and 350 $\mu\text{g/ml}$ for 24 h; a concentration-dependent decrease in the cell viability was observed (Fig.5. a). After 24 h of treatment, the IC_{50} determined was 320 $\mu\text{g/ml}$.

Similar results (Fig.5. b) were obtained with the NR assay. A dose-dependent decrease of cell proliferation was clearly observed with increasing concentrations of astaxanthin (25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 and 350 $\mu\text{g/ml}$), for 24 h, with an IC_{50} value was of 300 $\mu\text{g/ml}$.

The NR cytotoxicity assay is based on the incorporation of the supravital dye neutral red, into the lysosomes of viable cells. Compounds that injure the plasma or lysosomal membrane decrease uptake and subsequent retention of the dye [32]. NR was successfully used to determine the cytotoxic effects of astaxanthin on cultured Hep 2 cells. Results demonstrated that Hep 2 cells are extremely sensitive to astaxanthin. Results obtained by MTT assay, which monitors a reduction of yellow tetrazolium salt by mitochondrial

dehydrogenase (enzyme of metabolically active/viable cells) to purple formazan crystals [33-35], were slightly different.

In addition, astaxanthin affected cultured cells, inducing mortality. By mean of these assays, the IC₅₀ was determined after 24 h which are respectively of 300 µg/ml by NR assay, and 320 µg/ml by MTT assay. This cytotoxicity was dose dependent as shown in Figure 5. The IC₅₀ values measured by the NR assay were obviously lower than the ones measured by MTT assay at equivalent astaxanthin treatments (Fig.5. a and b). This suggests that NR assay is the most suitable to evaluate astaxanthin induced cytotoxicity. The differences obtained from each assay might reflect a differential mode of action of astaxanthin extract on cells. In fact, while the NR assay reflects the lysosome integrity, the MTT assay measures the mitochondrial activity. Thus, the higher sensitivity revealed by the NR assay, could be explained by the fact that lysosomes are primarily affected by astaxanthin extract followed by the mitochondria or other organelles. Therefore, our results on Hep 2 cells suggest that the NR assay is an important tool to evaluate cytotoxic effects of astaxanthin extract in this cancer cell line.

CONCLUSION

The Industrial shrimp shell discards can be utilized for the isolation of important bioactive compounds like natural carotenoids, mainly astaxanthin. The antioxidant and antiproliferative activities of astaxanthin extracted from shrimp shell were very interesting. The extracts of astaxanthin may be an alternative additive in food, pharmaceuticals and cosmetic preparations instead of many toxic synthetic antioxidants. Although the results obtained are for the waste from the species *P.longirostris*, it would be applicable to waste from other species of shrimps. The residue available after astaxanthin extraction may be used for the preparation of chitin/chitosan, thus having an integrated approach for efficient utilization of shrimp waste.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Ministry of Higher Education and Scientific Research-Tunisia.

REFERENCES

- [1] Sachindra, N.M.; Bhaskar, N.; Mahendrakar, N.S. Carotenoids in different body components of Indian shrimps. *J. Sci. Food Agric.*, **2005**, 85, 167-172.
- [2] Shahidi, F.; Metusalach, B.; Brown, J.A. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. *CRC Crit. Rev. Food Sci.*, **1998**, 38, 167-171.

- [3] Löliger, J. The use of antioxidants in foods. *Free radicals and food additives*, (Eds.), by Aruoma OI and Halliwell B, London, **1991**, pp. 121-150.
- [4] Ito, N.; Hirose, M.; Fukushima, S.; Tsuda, H.; Shirai, T.; Tatematsu, M. Studies on antioxidants: Their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Food Chem. Toxicol.*, **1986**, 24, 1071-1081.
- [5] Botterweck, A.A.M.; Verhagen, H.; Goldbohm, R.A.; Kleinjans, J.; van den Brandt, P.A. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. *Food Chem. Toxicol.*, **2000**, 38, 599-605.
- [6] Ribeiro, H.S.; Rico, L.G.; Badolato, G.G.; Schubert, H. Production of O/W emulsions containing astaxanthin by repeated premix membrane emulsification. *J. Food Sci.*, **2005**, 70, 117-123.
- [7] Omara-Alwala, T.R.; Chen, H.M.; Ito, Y.M.; Simpson, K.L.; Meyers, S. P. Carotenoid pigment and fatty acid analysis of crawfish oil extracts. *J. Agric. Food Chem.*, **1985**, 33, 260-263.
- [8] Guillou, A.; Khalil, M.; Adambounoub, L. Effects of silage preservation on astaxanthin forms and fatty acid profiles of processed shrimp (*Pandalus borealis*) waste. *Aquaculture.*, **1995**, 130, 351-360
- [9] Wathene, E.; Bjerken, B.; Storeabakken, T.; Vassvik, V.; Odaland, A.B. Pigmentation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed astaxanthin in all meals or in alternating meals. *Aquaculture.*, **1998**, 159, 217-31.
- [10] Guerin, M.; Huntley, M.E.; Olaizola, M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol.*, **2003**, 21, 210-216.
- [11] AOAC, (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis, 17th ed., **2000**, Association of Official Chemists, Gaithersberg, MA.
- [12] Sindhu, S.; Sherief, P.M. Extraction, Characterization, Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Carotenoids from the Shell Waste of Arabian Red Shrimp *Aristeus alcocki*, Ramadan 1938. *Open Conf. Proc. J.*, **2011**, 2, 95-103
- [13] Kelley, C.E.; Harmon, A.W. Method of determining carotenoid contents of Alaska pink shrimp and representative values for several shrimp products. *Fish. Bull.*, **1972**, 70, 11-17.
- [14] Kobayashi, M.; Sakamoto, Y. Singlet oxygen quenching ability of astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Lett.*, **1999**, 21, 265-269.
- [15] Kirby, A.J.; Schmidt, R.J. The antioxidant activity of Chinese herbs for eczema and of placebo herbs. *J. Ethnopharmacol.*, **1997**, 56, 103-108.

- [16] Yildirim, A.; Mavi, A.; Kara, A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *J. Agri. Food Chem.*, **2001**, 49, 4083-4089.
- [17] Koleva, I.I.; van Beek, T.A.; Linssen, J.P.H.; de Groot, A.; Evstatieva, L.N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. *Phytochem Anal.*, **2002**, 13, 8-17.
- [18] Lee, J.C.; Kim, H.R.; Kim, J.; Jang, Y.S. Antioxidant property of an Ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var *Saboten*. *J. Agri. Food Chem.*, **2002**, 50, 6490-6496.
- [19] Carmichael, J.; De Graff, W.G.; Gadza, A.F.; Minna, J.D.; Mitchell, J. Evaluation of a tetrazolium-based semi-automated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, **1987**, 47, 936-942.
- [20] Borenfreund, E.; Puerner, J.A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett.*, **1985**, 24, 119-24
- [21] Ibrahim, H.M.; Salama, M.F.; El-Banna, H.A. Shrimp's waste: chemical composition, nutritional value and utilization. *Nahrung.*, **1999**, 43, 418-423.
- [22] Nargis, A.; Ahmed, K.N.; Ahmed, G.M.; Hossain, M.A.; Rahman, M. Nutritional value and use of shrimp head waste as fish meal. *Bangl. J. Sci. Indus. Res.*, **2006**, 41, 63-66.
- [23] Sánchez-Camargo, A.P.; Almeida Meireles, M.A.; Fontoura Lopes, B.L.; Fernando Antonio Cabral, F.A. Proximate composition and extraction of carotenoids and lipids from Brazilian redspotted shrimp waste (*Farfantepenaeus paulensis*). *J. Food Eng.*, **2011**, 102, 87-93.
- [24] Sachindra, N.M.; Bhaskar, N.; Mahendrakar, N.S. Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. *Waste Manage.*, **2006**, 26, 1092-1098.
- [25] Vimala, S.; Paul, V.I. Utilization of crustacean fishery waste as a source of carotenoids. *J. Exp. Zool. Ind.*, **2009**, 12, 377-380.
- [26] Todd, L. Thin layer chromatography (TLC) system for Natu Rose Cartenoids. *Natu Rose. Technol. Bull.*, **1998**, 3, 1-3.
- [27] Shimada, K.; Fujikawa, K.; Yahara, K.; Nakamura T. Antioxidative properties of xanthum on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agri Food Chem.*, **1992**, 40, 945-948.
- [28] Frankel, E.N. Hydroperoxide formation. *In Lipid oxidation*, 10 (pp. 23-41). Dundee: **1998**, The Oily Press.
- [29] Kulisic, T.; Radonic, A.; Katalinic, V.; Milos, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem.*, **2004**, 85, 633-640.
- [30] Korycka-Dahl, M.B.; Richardson, T. Activated oxygen species and oxidation of food constituents. *Food Sci Nutr.*, **1978**, 10, 209-241.

- [31] Ashok, B.; Ali, R. The aging paradox: free radical theory of aging. *Experim Gerontol.*, **1999**, 34, 293-303.
- [32] Gutleb, A.C.; Helsberg, A.; Mitchell, C. Heavy metal concentrations in fish from a pristine rainforest valley in Peru: a baseline study before the start of oil-drilling activities. *Bull Environ Contam Toxicol.*, **2002**, 69, 523-529.
- [33] Holt, P.S.; DeLoach, J.R. Cellular effects of T-2 mycotoxin on two different cell lines. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1988**, 971, 1-8.
- [34] Visconti, A.; Minervini, F.; Lucivero, G.; Gambatesa, V. Cytotoxic and immunotoxic effects of Fusarium mycotoxins using a rapid colorimetric bioassay. *Mycopathologia.*, **1991**, 113, 181-186.
- [35] Hanelt, M.; Gareis, M.; Kollarczik, B. Mycopathologia Cytotoxicity of mycotoxins evaluated by the MTT-cell culture assay. **1994**, 128, 167-74.

Table 1. Proximate composition of deep-water pink shrimp shell

Shrimp waste	
Compositions *	
(% dry weight basis)	
Protein	31.3± 0.61
Fat	3.97± 0.42
Ash	28.61± 0.79
Chitin	34.86± 1.67

* Values expressed are means of three independent determinations.

Table 2. R_f value of different form of astaxanthin in the extract from *Parapenaeus longirostris*, (Mean of three determinations)

Different form of astaxanthin	R _f value
Astaxanthin diester	0.80
Astaxanthin monoester	0.60
Astaxanthin	0.33

Photoplate. 1. TLC of different form of astaxanthin extract. Lanes 1, 2, 3, 4, 5: different concentrations of astaxanthin.

Fig. 1: DPPH free radical-scavenging activities of astaxanthin at different concentrations. BHA was used as reference antioxidant (The test was carried out in triplicate).

Fig. 2: Reducing power of astaxanthin at different concentrations. BHA was used as reference antioxidant. Values are means \pm SD ($n=3$).

Fig. 3: Antioxidant activity of astaxanthin at different concentrations measured by the β -carotene bleaching method. BHA was used as reference antioxidant. (The test was carried out in triplicate).

Fig. 4: Gel electrophoresis pattern of the plasmid pCRIITMTOPO incubated with Fenton's reagent in the presence and absence of astaxanthin at different concentrations (10 to 50 μ g).

Lane 1: untreated control: native pCRIITMTOPO DNA (0.5 μ g); lane 2: DNA sample incubated with Fenton's reagent; lanes 3, 4, 5, 6, 7, 8: Fenton's reagent + DNA + 25 to 150 μ g astaxanthin.

Fig. 5: Cytotoxic effects of astaxanthin on Hep2 cells after 24 h. Cell viability was determined using MTT (a) and NR uptake (b) and expressed as percentages of control, which was exposed to vehicle only. Control value was taken as 100%. (The test was carried out in triplicate).

Photoplate. 1.

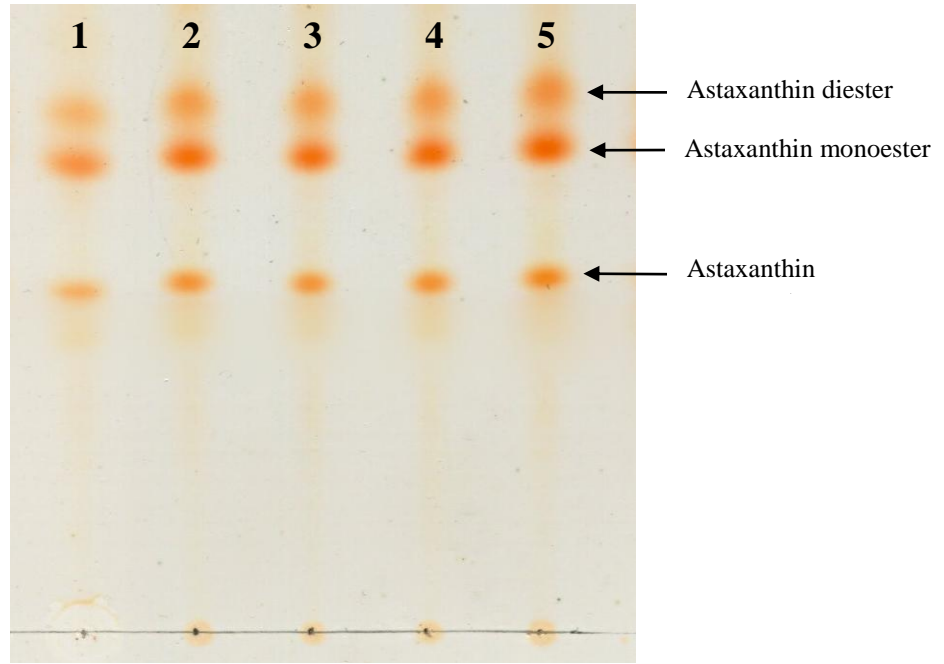


Fig. 1

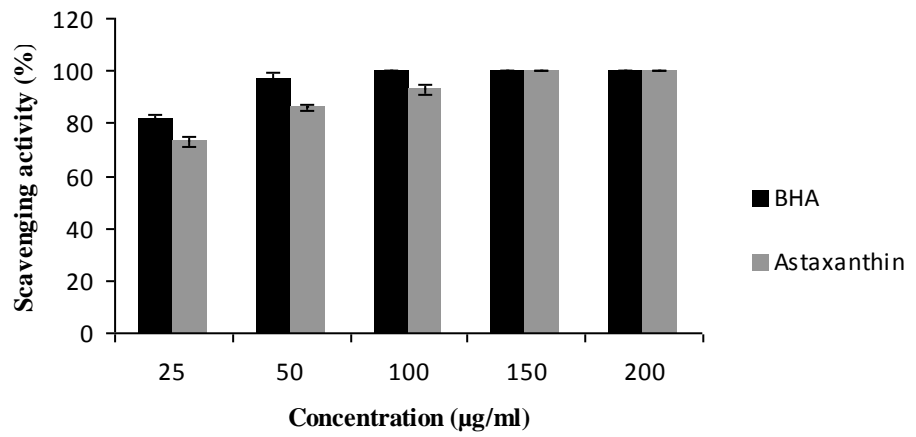


Fig. 2

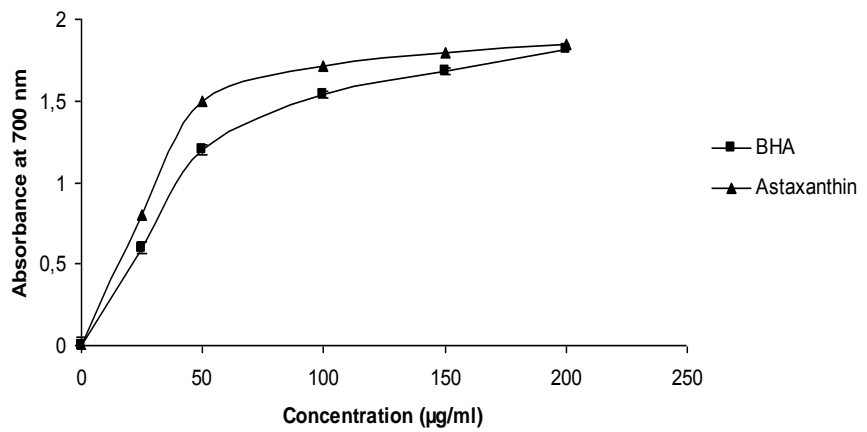


Fig. 3

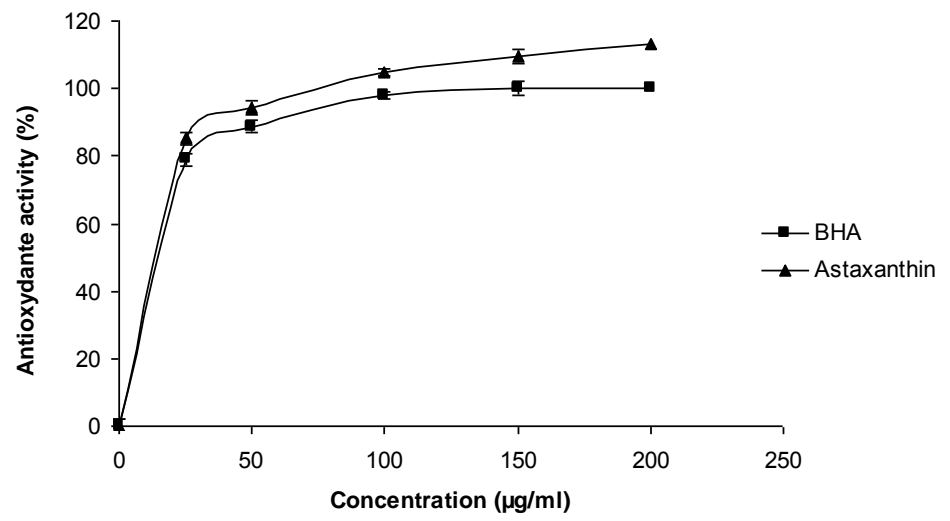
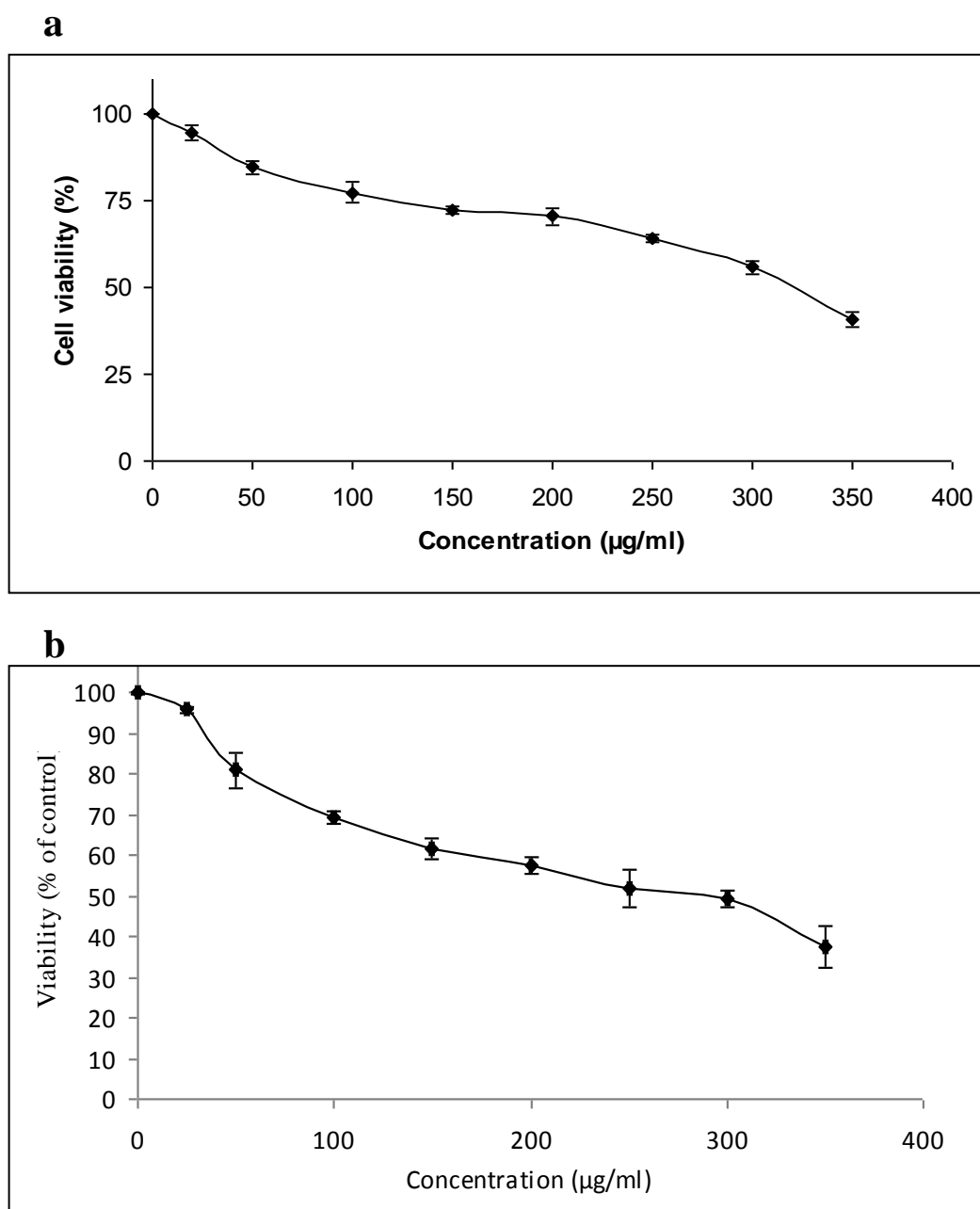


Fig. 4



Fig. 5



Article 3:

Assaâd Sila, Zohra Ghliissi, Zeineb Kamoun, Mohamed Makni, Moncef Nasri, Ali Bougatef, Zouheir Sahnoun (2015).

Astaxanthin from shrimp by-products ameliorates nephropathy in diabetic rats. **European Journal of Nutrition**. 54, 301-307. (IF : 3.84)

L'astaxanthine extrait à partir des sous-produits de crevettes améliore la néphropathie chez les rats diabétiques

Assaad Sila, Zohra Ghilissi, Zeineb Kamoun, Mohamed Makni, Moncef Nasri,
Ali Bougatef, Zouheir Sahnoun

Le diabète de type 2 est une maladie chronique qui a atteint des proportions épidémiques dans le monde. Ce diabète est caractérisé par une défaillance des cellules β qui ne peuvent plus faire face à la demande. Une fois le diabète installé, la fonction de ces cellules s'effondre, conduisant à l'aggravation progressive de la maladie et à la nécessité de recourir à un traitement médicamenteux de plus en plus compliqué, y compris le passage à une insulinothérapie. Cette maladie demeure la première cause de neuropathie douloureuse et d'insuffisance rénale chronique avant et sous dialyse. Les complications du diabète sont fortement liées à certain nombre de facteurs. A coté de l'hyperglycémie chronique et la glycation non enzymatique des protéines, un facteur très important impliqué dans la genèse de ces complications est le stress oxydatif. Ce stress est défini comme un déséquilibre entre les processus biochimiques de production des radicaux libres d'une part et ceux des défenses antioxydantes d'autre part. Le patient diabétique présente une surproduction d'espèces oxygénées activées d'une part et d'autre part, une diminution des antioxydants, ce qui génère un état de stress oxydatif. Lorsque l'un des systèmes protectifs de l'organisme contre la toxicité des radicaux libres montre un échec, l'action des radicaux libres devient incontrôlable, ce qui conduit à des dommages au niveau des cellules- β . La prévention et le traitement du diabète de type 2 constituent ainsi des enjeux majeurs.

Le présent travail a pour objectif la mise en évidence, *in vivo*, des effets antidiabétique et néphroprotecteur de l'astaxanthine, extrait à partir des sous-produits de crevettes, Nous avons évalué les paramètres du stress oxydant et de l'aspect histologique rénal chez des rats rendus diabétiques moyennent l'alloxane (agent diabétogène) qui est un agent oxydant fort. Ce dernier exerce une activité cytotoxique sur les cellules- β par le produit de sa réduction, l'acide diallurique.

Au cours de cette étude, 24 rats mâles de souche Wistar (~ 200g) ont été répartis en quatre groupes de six rats : un groupe témoin (C), un groupe diabétique (D) recevant par gavage 120 mg d'alloxane /Kg de poids corporel, un groupe (D+As) diabétique traité, pendant 21 jours, par gavage avec de l'astaxanthine (20 mg/ Kg de poids corporel) dissout dans l'huile

d'olive et un 4^{ème} groupe (D+OO) diabétique recevant de l'huile d'olive. La période expérimentale a duré 30 jours. L'alimentation et l'eau ont été fournies à volonté pendant toute la période du traitement. A la fin de la période d'expérimentation, ces rats ont été sacrifiés par décapitation afin d'éviter le stress supplémentaire. Le sang a été collecté dans des tubes héparinés. Après centrifugation, le sérum a été séparé puis stocké à -20 °C pour l'analyse des paramètres biochimiques. Après la dissection, les reins de chaque rat ont été rapidement prélevés et bien rincés avec l'eau physiologique. Ensuite, ces organes ont été coupés en petits morceaux et homogénéisés dans un tampon phosphate. L'homogénat obtenu a été centrifugé et le surnageant a été stocké à -20 °C pour les dosages tissulaires. Pour l'étude histologique, après le rinçage avec l'eau physiologique froide, les échantillons de reins ont été immédiatement fixés dans une solution de formol (10%).

Les rats des groupes C, D, D+As et D+OO ont été pesés avant et après l'étude expérimentale. Les résultats obtenus ont montré qu'il n'y a pas une différence significative ($p > 0,05$) entre les poids des rats des quatre groupes. La concentration de glucose dans le plasma a été mesurée. La glycémie des rats diabétiques (D) est significativement plus élevée ($p < 0,001$) par rapport aux rats normaux (C) puisqu'elle a dépassé 17 Mm à la fin de la période du traitement. Par contre, on a noté une diminution significative ($p < 0,001$) de la glycémie chez les rats diabétiques traités avec l'astaxanthine (6,8 mM). Pour le groupe D+OO traité avec l'huile d'olive seule, la baisse de la glycémie était faible, voire non significative ($p > 0,05$). On a constaté également qu'il y a une variation positive de l'insulinémie dans le sang des rats traités avec l'astaxanthine. En effet, les valeurs de l'insulinémie obtenues pour le groupe D+As étaient significativement élevées par rapport à celles des rats diabétiques non traités ($p < 0,01$).

L'effet du traitement avec de l'astaxanthine sur les taux de l'urée, la créatinine, l'acide urique et le malondialdéhyde a été étudié. Les résultats ont montré que les taux plasmatiques de la créatinine, de l'urée et de l'acide urique sont significativement ($p < 0.001$) plus élevés chez les rats du groupe diabétique (49, 58 et 16%, respectivement) que ceux chez les rats du groupe contrôle. Chez les rats diabétiques traités avec l'astaxanthine (D+As), on a noté que ces paramètres ont gardé des taux presque normaux. Le traitement des rats diabétique avec l'huile d'olive (D+OO) n'aboutit à aucun changement significatif par rapport au groupe des diabétiques non traités (D). Les taux du malondialdéhyde (MDA) ont été à la fois déterminés au niveau plasmatique et rénal. Une augmentation significative des taux du MDA dans le plasma (149%) et le rein (90%) chez les rats diabétique (D) par rapport au groupe témoin (C) a été détectée. L'administration de l'astaxanthine chez les rats diabétiques a induit une

diminution significative ($p < 0.001$) du taux de MDA plasmatique (42%) et rénale (38%) par rapport au groupe D. Une diminution significative ($p < 0.01$), au niveau plasmatique et rénale, des activités des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase et catalase) et du taux du glutathion (GSH) a été enregistrée chez les rats diabétiques non traités. Pour les rats diabétiques traités du groupe D+As, une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) de ces paramètres a été observée par rapport au groupe D. L'activité de la glutathion peroxydase tissulaire a manifesté une baisse significative ($p < 0.001$) chez les rats diabétiques et les rats diabétiques traités avec de l'huile d'olive (60 et 50%, respectivement) par rapport aux rats normaux témoins (C). Le taux de protéines carbonylées a été également déterminé au niveau rénal. On a constaté une élévation hautement significative ($p < 0.001$) chez les rats diabétiques et les rats recevant de l'huile d'olive (2,44 et 2,2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéine, respectivement) par rapport au groupe témoin non diabétique (0,99 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéine). Le gavage de l'astaxanthine aux rats du groupe D+As semble très efficace car le niveau de protéines carbonylées chez les rats de ce groupe était très proche à celui détecté chez les rats témoins du groupe C. A fin de confirmer ces résultats biochimiques, une étude histologique a été réalisée sur les reins des rats des quatre groupes C, D, D+As et D+OO. Les analyses des coupes histologiques sont en corrélation avec les analyses biochimiques. L'histologie des tissus rénaux des rats témoins (C) et des rats diabétiques traités avec l'astaxanthine (D+As) a montré la présence de glomérules uniformes avec des membranes bien définies. L'architecture du tissu rénal chez les rats diabétiques est sévèrement altérée où la plus part des glomérules sont nécrosés et délatés avec des espaces glomérulaires réduits. La même observation a été notée pour les rats du lot diabétique traité avec de l'huile d'olive.

Astaxanthin from shrimp by-products ameliorates nephropathy in diabetic rats

**Asaâd SILA^{1*}, Zohra GHLISSI², Zeineb KAMOUN³, Mohamed MAKNI³,
Moncef NASRI⁴, Ali BOUGATEF¹, and Zouheir SAHNOUN²**

¹ *Unité Enzymes et Bioconversion, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, Université de Sfax, 3038 Sfax, Tunisie.*

² *Unité de Recherche Pharmacologie et Toxicologie des Xénobiotiques, Faculté de médecine de Sfax, Tunisie.*

³ *Unité de Recherche Toxicologie, Microbiologie Environnementale et Santé. FSS, Tunisie.*

⁴ *Laboratoire de Génie enzymatique et de Microbiologie, Université de Sfax, Tunisie.*

*Corresponding author: Tel.: + 216 97-013-118; fax: + 216 74-275-595;

E-mail address: assaadsila@gmail.com

Abstract

Aim: This study investigated the hypoglycemic and antioxidant effects of shrimp astaxanthin on the kidney of alloxan-induced diabetic rats.

Methods: Animals were distributed into four groups of six rats each: a control group (C), a diabetic group (D), a diabetic group supplemented with Astaxanthin (D+As) dissolved in olive oil and a diabetic group supplemented with olive oil (D+OO). In vitro antidiabetic effect was tested in plasma and kidney tissue.

Results: The group D of rats showed significant ($P < 0.05$) increase of glycemia, creatinine, urea and uric acid levels compared to those of the control group (C). Moreover, plasma and kidney malonaldehyde (MDA) and protein carbonyl (PCO) levels for the rats of the group D were significantly increased compared to the control group. Contrariwise, antioxidant enzyme activities such as catalase (EC 1.11.1.6), superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) and non-enzymatic levels of reduced glutathione (GSH) were significantly ($P < 0.05$) decreased in the plasma and kidney of diabetic rats compared to the control ones. The astaxanthin supplementation in rats diet improved the antioxidant enzyme activities and significantly decreased the MDA and protein carbonyl levels compared to diabetic rats. Indeed, no significant ($P \geq 0.05$) improvement was observed for the fourth group (D+OO) compared to the control group (C). Histological analysis of kidney showed glomerular hypertrophy and tubular dilatation for the diabetic rats. For D+As rats, these histopathological changes were less prominent.

Conclusions: Our results suggest that shrimp astaxanthin may play an important role in reduction of oxidative damage and could prevent pathological changes in diabetic rats suggesting promising application of shrimp astaxanthin in diabetes treatment.

Keywords: Astaxanthin; diabetes; oxidative stress; lipid peroxidation; nephropathy.

Introduction

The industrial processing of fish has become a problem for both environment and processing plants. Indeed, about 45% of processed seafood consists of shrimp waste which is composed of exoskeleton and cephalothorax [1]. Shrimp processing generates considerable quantities of waste mainly composed of heads, tails, and cephalothorax [2]. Shrimp waste is a rich source of biomolecules like chitin, proteins, enzymes, flavors, nutritive components, and carotenoids [3]. Therefore, the valorization of such wastes is of economical impact and has drawn much interest from researchers in recent years. Shrimp waste is one of the important natural sources of carotenoids [4]. In Tunisia, the shrimp waste generated by shrimp processing industries is not exploited for the recovery of valuable components. Moreover, it forms one of the cheapest raw materials for recovery of carotenoids.

Astaxanthin is a ketocarotenoid oxidized from β -carotene, which plays biological roles and possesses a number of desired features for food applications, such as natural origin, nil toxicity, high versatility, and both hydro and liposolubility [5,6]. Astaxanthin can be synthesized by plants, bacteria, some fungi and green algae. Astaxanthin can also be extracted from the crustacean byproducts, including shrimp, crawfish, crabs and lobster. Astaxanthin represents between 74 and 98% of the total pigments in crustacean shells [7]. In addition, to its pigmentation function, one of the most important properties of astaxanthin is its antioxidant activity which is ten times higher than other biomolecules such as polyphenolic compounds, canthaxantin, β -carotene and zein [8]. Several *in vitro* and *in vivo* studies have identified astaxanthin antioxidant mechanisms that quench active oxygen species and free radicals [9]. Regarding its antioxidant properties, astaxanthin may have a role in the treatment of chronic diseases such as cardiovascular diseases, some types of cancer and diabetes.

Diabetes mellitus (DM) is a health problem that affects millions of individuals all over the world. The World Health Organization (WHO) predicts that 300 millions of people will have diabetes mellitus by the year 2025 [10]. DM is a prevalent systemic disease with well documented devastating effects [11]. Hyperglycemia has been found to play a key role in reactive oxygen species (ROS) generated damage [12]. Oxygen free radicals are formed disproportionally in diabetes by glucose oxidation, non-enzymatic protein glycation and subsequent oxidative degradation of glycated proteins [12]. Several reports indicated that diabetic complications are associated with overproduction of ROS and accumulation of lipid peroxidation byproducts [13]. In diabetes, major damage occurs in tissues such as kidney where the glucose entry is not regulated by insulin [14]. Free radicals generated in diabetes may lead to several kinds of diabetic complications including nephropathy, neuropathy, cardiopathy and many other diseases. Many biomolecules used as single agents or in different

oral formulations have been recommended to prevent diabetes mellitus since they are less toxic than oral hypoglycemic agents such as sulfonylureas, metformin, etc. [15]. Antioxidants play a major role in protection against molecular oxidative damage [16]. The World Health Organization recommended the evaluation of traditional agrifood for prevention and possibly treatments of chronic diseases such as diabetes because they are effective, non-toxic, with less or no side effects and considered as excellent candidates for oral therapy [17].

The main objectives of this research were to explore the antidiabetic and nephroprotective effects of astaxanthin extracted from the shrimp waste in alloxan diabetic animals, which is one of the frequently used beta-cytotoxic agents for the induction of diabetes in animal models to evaluate the therapeutic potential of drugs and dietary antioxidants [18,19, 20].

Materials and methods

Astaxanthin extraction

Astaxanthin was extracted from shrimp shell waste (head, thorax and appendix) according to the method of Sila et al. [21]. Astaxanthin purity was verified by high-pressure liquid chromatography. Astaxanthin was identified on the basis of retention time in comparison with a standard (Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA)).

Experimental design

Male Wistar rats (~ 200 g) were obtained from the Central Pharmacy of Tunisia (SIPHAT, Tunisia). They were maintained under standard laboratory conditions (22 ± 3 °C, 12h light/dark cycle), with pelleted food (Industrial Company of Rodent Diet, Sfax, Tunisia) and tap water given ad libitum during 30 days of experimental period. Animals were handled in accordance with the guidelines of the Animal Care Committee at the Faculty of Medicine, Sfax University (Tunisia). The present study was conducted with four groups of six rats each: control rats (C), diabetic rats (D). Animals of the third group (D+As) were fed during 21 days with daily gavage of astaxanthin (20 mg /kg BW) dissolved in 200 µl olive oil (0.9% free fatty acids) seven days after the administration of alloxan. The fourth group (D+OO) represented diabetic rats treated with olive oil alone. After 2 weeks of acclimatization, diabetes was induced in male rats by receiving 120 mg/kg BW of alloxan monohydrate (Sigma-Aldrich, Germany) freshly prepared in normal saline (9 g/l NaCl), according to Mansour et al. [22]. Rats were orally supplemented with 20% glucose solution (5-10 ml) after 6 h. The rats received 5% glucose water solution for the next 24 h. Rats which harbour moderate diabetes and blood glucose concentration about 2-3 g/l were selected for further experimental tests.

After treatment, the rats were weighed and sacrificed by decapitation and the blood collected into clean dry beakers for serum preparation and the serum was prepared as described by Akanji and Nlumanze [23]. The kidney of each rat was excised, homogenized in ice-cold normal saline, and centrifuged at 5000 g for 20 min. The obtained supernatants were frozen and stored at -80 °C for further biochemical study.

Biochemical assays

Protein content was measured by the method of Lowry et al. [25] using bovine serum albumin as standard. Glucose levels in plasma were assayed by enzymatic methods, using the Enzymatic Colorimetric (GOD-PAP) glucose assay kit (Biomaghreb, Tunisia) according to the manufacturer instruction. Plasma insulin level was determined using rat insulin enzyme linked immunosorbent assay kit ref. RIT-461 No. AKRIN-010T (Shibayagi, Japan). The levels of urea, uric acid and creatinine in plasma were estimated spectrophotometrically using commercial diagnostic kits, respectively (Refs. 20151, 20143, and 20091) purchased from Biomaghreb (Ariana, Tunisia). Concentrations of malonaldehyde (MDA), an index of lipid peroxidation, were determined spectrophotometrically according to Draper and Hadley [25].

Antioxidant system assays in plasma and kidney

Total superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) activity was estimated according to Beauchamp and Fridovich [26]. Catalase (EC 1.11.1.6) activity was assayed by the method of Aebi [27]. Reduced glutathione (GSH) was determined by the method of Jollow et al. [28]. Glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) activity in the kidney was determined as described by Flohe and Gunzler [29]. The level of protein carbonyl (PCO) in the kidney homogenates was measured as described by Reznick and Packer [30].

Histopathological examination

All kidneys removed from the control and tested rats were cleaned and fixed in 10% buffered formalin solution. They were then embedded in paraffin and stained with hematoxylin–eosin for histopathological studies. All sections were evaluated for the degree of tubular and glomerular injury and necrosis.

Statistical analysis

The obtained data were analyzed using the statistical package program Stat view 5 Software for Windows (SAS Institute, Berkley, Calif., U.S.A.). Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test as a post hoc test for comparison between the groups. All values were expressed as mean \pm SD. Differences were considered significant when $P \leq 0.05$

Results

Body weights and biochemical assays

The obtained results showed no significant intra-group variation in the basal body weight of rats. The plasma glucose concentration in the diabetic group (D) increased significantly ($P < 0.05$) comparing to the normoglycemic group (C) (Table 1). Astaxanthin administration to rats with hyperglycemia resulted in significant decrease of plasma glucose level in comparison with the results obtained for the diabetic group. The plasma glucose level of D+OO rats don't change in comparison to group (D). Insulin concentration in plasma of the diabetic treated group decreased in comparison to the control group (Table 1). Treatment with astaxanthine increased insulin concentration as compared with the diabetic rats. In diabetic rats, urea, creatinine and uric acid levels were significantly higher in plasma (49%, 58% and 16%, respectively) comparing to the control ones (Table 2). The administration of astaxanthin to diabetic rats significantly reversed these changes to near normal values. The levels of urea, creatinine and uric acid in group D+OO significantly decreased in comparison with the control group (C). MDA levels were determined in plasma and kidney. Results (Table 3) showed significant increase in MDA levels in plasma (149%) and kidney (90%) for the group D of rats compared to the control group C. Diet supplemented with astaxanthin induced a significant decrease of MDA levels in plasma (42%) and in kidney (38%) compared to the group D. Unlike, astaxanthin supplemented diet, MDA level seemed to be not affected in D+OO group when compared to C and D+AS groups.

Antioxidant system assays in plasma and kidney

GSH levels and antioxidant enzyme activities (catalase and superoxide dismutase) in plasma and kidney of the control and tested groups are presented in Table 3. In diabetic group (D), a significant decrease of GSH levels, catalase and superoxide dismutase activities was observed in plasma (51%, 36% and 55%) and in kidney (26%, 36% and 18%), respectively. Indeed, D+As group harbour significant improvement of GSH levels, catalase and superoxide dismutase activities in plasma (79%, 37% and 108%) and kidney (19%, 35% and 17%), respectively, as compared to those of the group D. Therefore, as observed in MDA determination, GSH levels and antioxidant enzyme activities in plasma and kidney were not affected in the group D+OO compared to the diabetic group (D). In the present study, we have also investigated the contribution of Glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) in response to oxidative stress. As shown in Table 3, glutathione peroxidase activity in diabetic kidney (39 ± 3 nkat/mg protein) significantly decreased after 4 weeks of experiment compared to the control animals (99 ± 11 nkat/mg protein) ($P < 0.001$). Furthermore, significant increase of glutathione peroxidase level was observed in the astaxanthin treated group (D+As) (78 ± 4

nkat/mg protein) when compared to diabetic group. Co-administration of olive oil did not affect glutathione peroxidase level compared to the diabetic group (D). Protein carbonyl levels (PCO) was also determined in the kidney. Results (Table 3) showed higher protein carbonyl levels in diabetic group (D) when compared to those of control group (C). Gavage of astaxanthin to diabetic rats (D+As) significantly decreased the levels of protein oxidation products compared to the diabetic group. No significant improvement was observed for the group (D+OO) compared to the control group.

Light microscopy study of kidney tissue

The kidney histological examination of control and D+As groups showed normal cells architecture (Figure 1 A and C). Alloxan treatment elicited significant morphological changes in renal of the group D of rats. This changes were manifested by a severe injury of tubular and glomeruli (Figure 1B). Kidney histological examination of the group D+OO showed damaged cells' architecture (Figure 1D).

Discussion

In diabetic patients, chronic hyperglycemia depletes the activities of antioxidative defense systems [31] and increased the generation of reactive oxygen species (ROS) [32]. The present work shows the protective effects of astaxanthin extracted from the shell waste of shrimp on diabetes and their complications in kidney functions. We showed that the supplementation of astaxanthin indicating its ability to suppress oxidative stress.

Fasting blood glucose level in diabetic rats is an important basal parameter for monitoring diabetes [33]. We showed that the administration of astaxanthin for diabetic rats led to hypoglycemic and antihyperglycemic effects by reducing the fasting blood glucose level. This significant decrease in the fasting blood glucose levels for the D+As group of rats may be explained by the stimulation of the residual pancreatic mechanism, regeneration or protection of pancreatic cells that were partially destroyed by alloxan, potentiating of insulin secretion from protected β -cells of the islets of Langerhans [34], and probably by increasing peripheral utilization of glucose [35].

In fact, the concentrations of the metabolites increased in blood during renal diseases or damage associated with uncontrolled diabetes mellitus [36]. This may be due to metabolic disturbance in diabetes reflected in high activities of xanthine oxidase, lipid peroxidation, and increased triacylglycerol and cholesterol levels [37]. In the present study, we found an increase in urea, uric acid and creatinine in the D group indicating renal damage. In the other hand, a significant decrease in these parameters was observed in the animals of D+As group

but no significant improvement was observed in the rats of group (D+OO) in comparison to group (C).

Nephrotoxicity was also evidenced by a significant increase in kidney PCO and MDA contents after the administration of astaxanthin. These parameters were used by Makni et al. [32] to determine early kidney oxidative stress. They were also used to investigate the oxidative damage of protein and lipid peroxidation of the membrane and lipoproteins as possible pathogenic mechanism for kidney injury [38]. Astaxanthin has been shown to exert higher antioxidant properties than β -carotene in some *in vitro* studies [39]. The antioxidant activity of astaxanthin has been found to be 80 times stronger than α -tocopherol and twice as strong as β -carotene [40].

Free radicals and associated reactive oxygen species have been implicated in diabetes and their complications [31]. It has been suggested that a variety of antioxidants scavenging the reactive oxygen species might improve hyperglycemia and prevent diabetic complications. Several recent studies have identified astaxanthin antioxidant mechanisms that quench active oxygen species and free radicals [9]. Other *in vitro* studies reported that astaxanthin is an effective inhibitor of peroxidation in the microsomal membrane [41]. Antidiabetic activity of astaxanthin may be due to its protective role in quenching free radicals and inhibition of lipid peroxidation to ensure beneficial role in survival of pancreatic β -cells.

The biochemical parameters were correlated with the renal histological studies. In fact, we revealed that alloxan caused a significant damage in renal structure showing marked glomeruli and tubular damages, due probably to the generation of reactive radicals and to subsequent lipid peroxidation induced by alloxan. So, hydroperoxides accumulated in kidney could cause cytotoxicity associated with membrane phospholipids peroxidation, the basis for renal cellular damage and necrotic renal cells. The administration of astaxanthin for diabetic rats improved the histological alterations induced by alloxan, which could be attributed to its strong antioxidant activity.

Conclusion

In this experimental study, the authors demonstrated that astaxanthin extracted from the shell waste of shrimp had significant hypoglycemic effect on alloxan-induced diabetic rats. Astaxanthin can be effective in inhibiting hyperglycemia, oxidative stress and cell damage in kidney, by enhancing antioxidant enzyme activity, scavenging ROS and eventually by contributing to the improvement of tissue dysfunction in diabetic rats. Due to its safety and activity, astaxanthin from shrimp waste is an ideal lead molecule for further antidiabetic drug development.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgement

This work was funded by the Ministry of Higher Education and Scientific Research, Tunisia.

References

1. Ibraim HM, Salama MF, El-Banna HA (1999) Shrimp's waste: chemical composition, nutritional value and utilization. *Nahrung* 43:418-423.
2. Sachindra NM, Mahendrakar NS (2005) Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils. *Biores Technol* 96: 1195-1200.
3. Heu MS, Kim JS, Shahidi F, Jeong YH, Jeon YJ (2003) Characteristics of protease from shrimp processing discards. *J Food Biochem* 27:221-236.
4. Shahidi F, Metusalach C, Brown, JA (1998) Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. *Crit Rev Food Sci Nutr* 38: 1-67.
5. Delgado-Vargas F, Paredes-López O (2003). Natural colorant for food and nutraceutical uses (pp. 137–160). FL, USA: CRC Press, Boca Raton.
6. McCoy M (1999) Astaxanthin market a hard one to crack. *Chem. & Eng. News*, 77: 15-17.
7. Shahidi F, Metusalach, Brown, JA (1998). Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. *Crit Rev Food Sci* 38: 1-67.
8. Miki W (1991) Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl Chem* 63: 141-146.
9. Rengel D, Diez-Navajas A, Serna-Rico A, Veiga P, Muga A, Milicua JCG (2000) Exogenously incorporated ketocarotenoids in large unilamellar vesicles. Protective activity against peroxidation. *Biochi Bioph Acta Biomemb* 1463: 179-187.
10. Pradeepa R, Mohan V (2002) The changing of the diabetes epidemic implications for India. *Ind J Med Res* 116: 121-132.
11. Duckworth WC (2001) Hyperglycemia and cardiovascular disease. *Cur Atherosclerosis* 3: 381-391.
12. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB (2003) Diabetes, oxidative stress and antioxidants. A review. *J Biochem Molec Toxicol* 17: 24-38.
13. Palanduz S, Ademoglu E, Gokkusu C (2001) Plasma antioxidants and type 2 diabetes mellitus. *Pharmacology* 109: 309-318.

14. Limaye PV, Raghuram N, Sivakami S (2003) Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin induced diabetic rats. *Molec Cell Biochem* 243: 147-152.
15. Chattopadhyay RR (1993) Hypoglycemic effect of *Ocimum sanctum* leaf extract in normal and streptozotocin diabetic rats. *Ind J Exper Biol* 31: 891-893.
16. Evans JL (2000) Antioxidants: do they have a role in the treatment of insulin resistance. *Ind J Med Res* 125: 355-372.
17. Day C (1998) Traditional plant treatments for diabetes mellitus: pharmaceutical foods. *Br Jo Nutr* 80: 203-208.
18. Ahmad SS, Tsou KC, Ahmad SI, Rahman MA (1985) Studies on cataractogenesis in humans and in rats with alloxan-induced diabetes. *Ophthalmic Res* 17: 12-20.
19. Vats V, Yadav SP, Biswas NR, Grover JK (2004) Anti-cataract activity of *Pterocarpus marsupium* bark and *Trigonella foenum-graecum* seeds extract in alloxan diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 93: 289-294.
20. Makni M, Sefi M, Fetoui H, Garoui E, Gargouri NK, Boudawara T, Zeghal N (2010) Flax and Pumpkin seeds mixture ameliorates diabetic nephropathy in rats. *Food Chem Toxicol* 48: 2407–2412.
21. Sila A, Ayed-Ajmi Y, Sayari N, Nasri M, Bougatef A (2013) Antioxidant and anti-proliferative activities of astaxanthin extracted from the shell waste of deep-water pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *Nat Prod J* 3: 82-89.
22. Mansour HA, Sayeda AL, Youssef MI, Sheweita SA (2002) Biochemical study on the effects of some Egyptian herbs in alloxan-induced diabetics rats. *Toxicology* 170: 221–228.
23. Akanji MA, Nlumanze SE, (1987) Alkaline phosphatase activities repeated suramin administration in some rat tissues cellular systems. *Pharmacol Toxicol* 61: 182–183.
24. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.
25. Draper HH, Hadley M (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Method Enzymol* 86: 421–431.
26. Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gel. *Anal Biochem* 44: 276–287.
27. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Method Enzymol* 105: 121–126.
28. Jollow DJ, Mitchell JR, Zampaglione N, Gillete JR (1974) Bromobenzene induced liver necrosis: protective role of glutathione and evidence for 3,4 bromobenzeneoxide as the hepatotoxic intermediate. *Pharmacology* 11: 151–169.

29. Flohe L, Gunzler WA (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Method Enzymol* 105:114-121.
30. Reznick AZ, Packer L (1994) *Method enzymol*. New York: Academic Press pp 357.
31. Baynes JW, Thorpe SR (1999) Role of oxidative stress in diabetic complications (a new perspective to an old paradigm). *Diabetes* 48: 1–9.
32. Rajasekaran S, Ravi K, Sivagnanam K, Subramanian S (2006) Beneficial effects of aloe vera leaf gel extract on lipid profile status in rats with streptozotocin diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33: 232-237.
33. Rajkumar M, Uttam Kumar D, Ghosh D (2005) Attenuation of hyperglycemia and hyperlipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats by aqueous extract of seed of *Tamarindus indica*. *Biol Pharma Bulletin* 28: 1172–1176.
34. Suba V, Murugesan T, Bhaskara Rao R, Ghosh L, Pal M, Mandal SC (2004) Antidiabetic potential of *Barleria lupulina* extract in rats. *Fitoterapia* 75: 1–4.
35. Erah PO, Osmde GE, Omogbai EKI (1996) Hypoglycemic effect of the extract of *Solenostemon monostachys* leaves. *J West Afr Pharm* 10: 21–27.
36. Almdal TP, Vilstrup H (1988) Strict insulin treatment normalizes the organic nitrogen contents and the capacity of urea–N synthesis in experimental diabetes in rats. *Diabetologia* 31: 114–118.
37. Anwar MM, Meki AMR (2003) Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin. *Compar Biochem Physiol* 135: 539–547.
38. Noeman SA, Hamooda HE, Baalash AA (2011) Biochemical Study of Oxidative Stress Markers in the Liver, Kidney and Heart of High Fat Diet Induced Obesity in Rats. *Diabetolo Metabol Syndr* 3:17
39. Lawlor SM, O'Brien NM (1995) Astaxanthin: antioxidant effects in chicken embryo fibroblasts. *Nutr. Res* 15:1695-1704.
40. Ohgami K, Shiratori K, Kotake S, Nishida T, Mizuki N, Yazawa K (2003) Effects of astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:2694-2701.
41. Nishigaki I, Dmitrovskil AA, Miki W, Yagi K (1994) Suppressive effect of astaxanthin on lipide peroxidation induced in rats. *J Clin Biochem Nutr* 16: 161-166.

Table 1. Body weights, blood glucose levels and plasma insulin levels in control group (C), diabetic rats (D) and those treated with astaxanthin (D+As), olive oil (D+OO) alone. Values are given as means \pm standard deviation (mean of six determinations).

Parameters and treatments	C	D	D+As	D+OO
Weights of rats (g)				
Initial	196 \pm 2	194 \pm 2	197 \pm 3	193 \pm 4
At sacrifice	280 \pm 3	261 \pm 4	276 \pm 2	264 \pm 4
Glucose (mM)	5.9 \pm 0.1	17.1 \pm 0.6 ^{***}	6.8 \pm 0.3 ^{YYY}	16.8 \pm 0.6 ^{***}
Insulin (nM)	0.18 \pm 0.02	0.12 \pm 0.02 ^{***}	0.15 \pm 0.01 ^{*YY}	0.12 \pm 0.03 ^{**}

Significant differences between the D, D+As or D+OO and C groups: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. Significant differences between the D+As and D groups: ¥ $P < 0.05$; YY $P < 0.01$ and YYY $P < 0.001$.

Table 2. Plasma levels of creatinine, urea and uric acid of C, D, D+As and D+OO experimental rats. Values are given as means \pm standard deviation (mean of six determinations).

Parameters and treatments	C	D	D+As	D+OO
Creatinine (μ M)	109 \pm 5	173 \pm 8 ^{***}	115 \pm 6 ^{YYY}	162 \pm 9 ^{***}
Uric acid (μ M)	301 \pm 7	345 \pm 12 ^{***}	308 \pm 8 ^{YYY}	341 \pm 6 ^{**}
Urea (mM)	8.1 \pm 1	10.6 \pm 2 ^{**}	7.6 \pm 1 ^{*YY}	9.8 \pm 1 ^{**}

Significant differences between the D, D+As or D+OO and C groups: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. Significant differences between the D+As and D groups: ¥ $P < 0.05$; YY $P < 0.01$ and YYY $P < 0.001$.

Table 3. Malonaldehyde levels (MDA), glutathione levels (GSH) and enzymes activities (SOD, CAT) in plasma and kidney and renal glutathione peroxidase levels and kidney protein carbonyl levels of control group (C), diabetic rats (D) and those treated with astaxanthin (D+As), olive oil alone (D+OO). Values are given as means \pm standard deviation (mean of six determinations).

Parameters and treatments	C	D	D+As	D+OO
MDA^a				
Plasma	4.3 \pm 0.1	10.7 \pm 0.1 ^{***}	5.9 \pm 0.07 ^{*YY}	9.9 \pm 0.4 ^{***}
Kidney	4.8 \pm 0.4	9.1 \pm 0.6 ^{***}	5.6 \pm 0.7 ^{*YYY}	8.1 \pm 1 ^{**}
GSH^b				
Plasma	9.1 \pm 1	4.5 \pm 0.4 ^{***}	8.0 \pm 0.5 ^{*YYY}	4.9 \pm 0.2 ^{**}
Kidney	6.2 \pm 0.4	4.8 \pm 0.5 ^{**}	5.8 \pm 0.4 ^{*YY}	5.0 \pm 0.5 [*]
Superoxide dismutase^c				
Plasma	336 \pm 3	152 \pm 1 ^{***}	316 \pm 4 ^{YYY}	151 \pm 8 ^{***}
Kidney	334 \pm 3	264 \pm 1 [*]	320 \pm 2 ^{YY}	267 \pm 1 [*]
Catalase^d				
Plasma	94.5 \pm 10	60.4 \pm 5 ^{**}	82 \pm 3 ^{*YYY}	58.5 \pm 4 ^{**}
Kidney	264 \pm 20	170 \pm 5 ^{**}	260 \pm 12 ^{YYY}	191 \pm 16.7 ^{**}
Glutathione peroxidase^e				
	99 \pm 11	39 \pm 3 ^{***}	78 \pm 4 ^{*YYY}	51 \pm 3 ^{**}
Protein carbonyl^f				
	0.99 \pm 0.02	2.44 \pm 0.3 ^{***}	1 \pm 0.2 ^{YYY}	2.2 \pm 0.4 ^{**}

Significant differences between the D, D+As or D+OO and C groups: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. Significant differences between the D+As and D groups: ¥ $P < 0.05$; ¥¥ $P < 0.01$ and ¥¥¥ $P < 0.001$.

^a MDA = nmol/ml in plasma and nmol/100 mg tissue in kidney.

^b GSH = mg/ml in plasma and mg/mg protein in kidney.

^c Superoxide dismutase = nkat/mg protein.

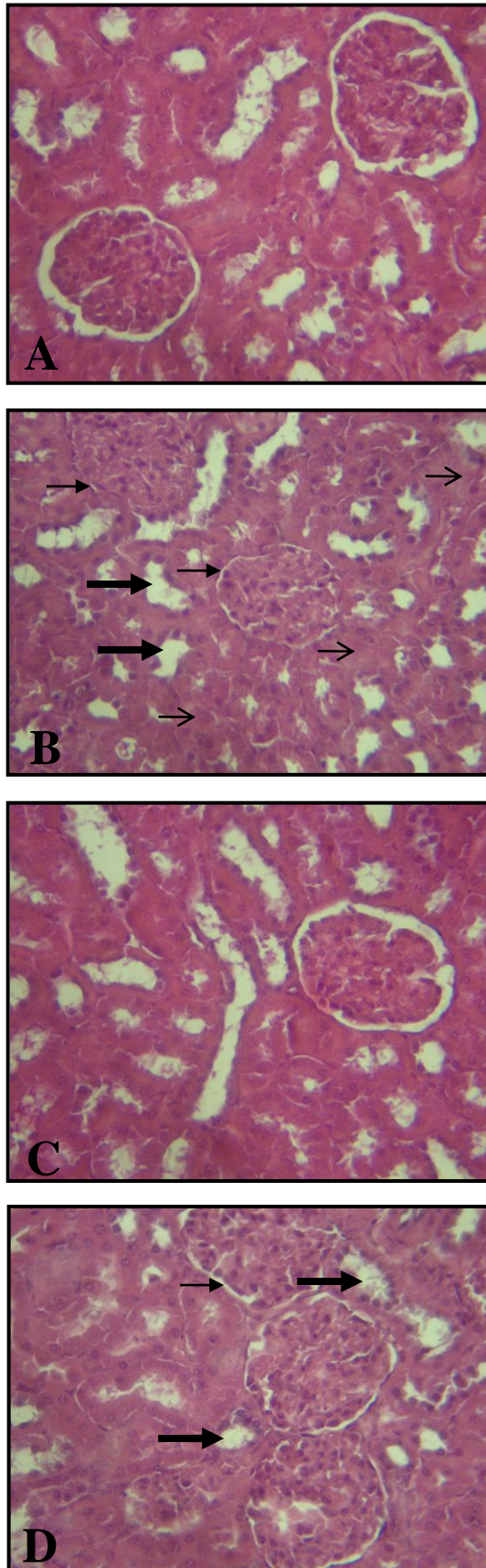
^d Catalase = nkat/mg protein.

^e Glutathione peroxidase = nkat/mg protein.

^f Protein carbonyl = μ mol/mg protein.

Figure 1. Kidney histological sections in control rats (**A**), diabetic rats (**B**) and those treated with astaxanthin (**C**) and olive oil (**D**) alone. Optic microscopy: H.E ($\times 400$).

Arrows indicate: \blackrightarrow : Tubular dilatation, \rightarrow : Glomerular space reduction; \dashrightarrow : Necrosis.



Article 4:

Assaâd Sila, Zeineb Kamoun, Zohra Ghlissi, Mohamed Makni, Moncef Nasri, Zouhaier Sahnoun, Naima Nedjar-Arroume, Ali Bougatef (2015).

Ability of natural astaxanthin from shrimp by-products to attenuate liver oxidative stress in diabetic rats. **Pharmacological Reports**. 67, 310-316. (IF : 2.165)

Capacité de l'astaxanthine naturel extrait à partir des sous-produits de crevettes à atténuer le stress oxydatif hépatique chez les rats diabétiques

Assaâd Sila, Zeineb Kamoun, Zohra Ghliissi, Mohamed Makni, Moncef Nasri, Zouhaier Sahnoun, Naima Nedjar-Arroume, Ali Bougatef

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est défini comme un déséquilibre profond de la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants en faveur des premiers. Ce déséquilibre peut se produire quand le système de défense antioxydant est surmené par l'augmentation d'espèces oxygénées activées (pro-oxydants) ou lorsque les défenses sont affaiblies par une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants. Les pro-oxydants peuvent engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles. Dans le diabète, il a été observé à la fois une augmentation de la production des pro-oxydants et une diminution des défenses antioxydantes, conduisant à une augmentation des marqueurs du stress oxydant. Les pro-oxydants générés lors de l'hyperglycémie causent principalement des dommages de l'ADN, des protéines et des lipides. En plus, il est évident que dans le diabète de type 2, l'activation des voies de stress sensible à l'élévation du glucose conduit à la dysfonction des cellules β sécrétrice de l'insuline. La présente étude est focalisée sur l'évaluation de l'effet de l'astaxanthine, extrait à partir des sous-produits de crevettes, sur les paramètres du stress oxydant et les dommages qu'il peut provoquer au niveau hépatique chez des rats atteints du diabète type 2.

Au cours de cette étude, 24 rats mâles de souche Wistar (~ 200g) ont été répartis en quatre groupes de six rats : un groupe témoin (C), un groupe diabétique (D) recevant par injection intrapéritoniale 120 mg d'alloxane /Kg de poids corporel, un groupe (D+As) diabétique traité, pendant 21 jours, par gavage avec de l'astaxanthine (20 mg/ Kg de poids corporel) dissout dans l'huile d'olive et un 4^{ème} groupe (D+OO) diabétique recevant de l'huile d'olive. La période expérimentale a duré 30 jours. L'alimentation et l'eau ont été fournies à volonté pendant toute la période du traitement. A la fin de la période d'expérimentation, ces rats ont été sacrifiés par décapitation afin d'éviter le stress supplémentaire.

L'alloxane a provoqué une augmentation significative ($p < 0,001$) de la glycémie et une diminution des taux d'insuline chez les rats diabétiques des groupes D et D+As par rapport

aux témoins (C). L'administration de l'astaxanthine aux rats diabétiques du groupe D+As a induit une diminution hautement significative ($p < 0,001$) de la glycémie et une augmentation des taux d'insuline, par rapport aux rats du groupe D.

Généralement, le diabète sucré est associé à une hyperlipoprotéïnémie. Pour cette raison, quatre paramètres lipidiques, à savoir le cholestérol total (TC), les triglycérides (TG), les lipoprotéines de faible densité (LDL-C) et les lipoprotéines de haute densité (HDL-C), ont été évalués. L'analyse de ces paramètres a montré que chez les rats diabétiques (groupe D) et les rats diabétiques recevant de l'huile d'olive (groupe D+OO) les taux de TC, TG et LDL-C sont élevés par rapport à ceux mesurés chez les rats du groupe C. L'administration de l'astaxanthine aux rats diabétiques (groupe D+As) a induit une diminution de 40% du cholestérol total, 33% de triglycérides et 58% de lipoprotéines de faible densité, par rapport aux rats diabétiques. On a noté également, une augmentation significative ($p < 0.001$) du taux des lipoprotéines de haute densité chez les rats diabétiques (31%) par rapport aux rats témoins (C), alors qu'il a significativement ($p < 0.001$) diminué chez les rats diabétiques traités avec l'astaxanthine (D+As).

Le malondialdéhyde (MDA) est l'un des produits terminaux de la décomposition des acides gras polyinsaturés sous l'effet des radicaux libres libérés au cours du stress. Le traitement des rats diabétiques avec l'astaxanthine (D+As) a significativement ($p < 0.001$) réduit le taux du MDA hépatique (7,18 nmol/g) par rapport à celui détecté chez les rats diabétiques (14,97 nmol/g). Aucune amélioration significative n'a été observée chez les rats diabétiques du groupe D+OO traités par l'huile d'olive (14,61 nmol/g).

Les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques jouent un rôle important dans la lutte contre le stress oxydant. Les activités enzymatiques de la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) au niveau du foie et le taux du glutathion hépatique (GSH) ont significativement ($p < 0.001$) baissé chez les rats diabétiques du groupe D (7,17 U/mg de protéine, 2,12 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg}$ de protéine, 4,24 nmol GSH/min/mg de protéine et 3,93 $\mu\text{g/g}$ de foie, respectivement) par rapport aux rats du groupe témoins (C). Par contre, chez les rats du groupe D+As les taux de ces paramètres sont proches à ceux enregistrés chez les rats du groupe C. Donc l'astaxanthine a amélioré l'efficacité du système antioxydant au niveau du foie.

Les taux des bio-marqueurs (l'aspartame aminotransférase, l'alanine aminotransférase et la phosphatase alcaline) dans le sang augmentent lorsqu'il existe une lésion cellulaire principalement au niveau du foie. Leur dosage est donc utile dans le diagnostic de certaines maladies tel que le diabète. Les résultats ont montré que, les taux de ces bio-marqueurs chez

les rats diabétiques et les rats du groupe D+OO sont élevés par rapport à ceux enregistrés chez les rats normaux utilisés comme témoins (groupes C). L'administration de l'astaxanthine aux rats diabétiques (groupe D+As) a induit une diminution significative ($p < 0.01$) par rapport aux rats diabétiques (D) non traités.

L'histologie du foie d'un rat du groupe contrôle (C) a montré des cellules hépatiques normales, un cytoplasme granuleux et absence de toute nécrose cellulaire. Chez les rats diabétiques (D) et les rats diabétiques traités avec de l'huile d'olives (D+OO) on a noté une altération sévère de l'architecture du foie avec dégradation des membranes cellulaires, infiltration leucocytaire, inflammation et nécrose. Pour les rats diabétiques traités avec l'astaxanthine, l'histologie du foie est normale avec absence de nécrose et d'inflammation.

En conclusion, il existe une évidence considérable à partir de cette étude, c'est qu'une hyperglycémie semble augmenter les perturbations métaboliques et par conséquent l'apparition du stress oxydant chez les diabétiques. En absence d'une réponse compensatoire appropriée par les antioxydants endogènes cellulaires, le système devient plus faible. Le stress oxydant résultant de l'hyperglycémie est ultimement responsable du développement des complications diabétiques. La présente étude est réalisée pour évaluer l'effet de l'astaxanthine, extrait à partir des sous-produits de crevettes, contre le diabète. On a révélé son effet positif non seulement sur l'hyperglycémie mais aussi sur les perturbations métaboliques associées et principalement sur le stress oxydant qui résulte de cet état pathologique.

Ability of natural astaxanthin from shrimp by-products to attenuate liver oxidative stress in diabetic rats

Assaâd Sila ^{a,b,*}, Zeineb Kamoun ^c, Zohra Ghlissi ^d, Mohamed Makni ^c, Moncef Nasri ^e,
Zouhaier Sahnoun ^d, Naima Nedjar-Arroume ^b and Ali Bougateg ^a

^a *Unité Enzymes et Bioconversion, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, Université de Sfax, 3038 Sfax, Tunisia.*

^b *Institut Charles Viollette, équipe ProBioGEM, Polytech'Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.*

^c *Unité de Recherche Toxicologie, Microbiologie Environnementale et Santé. FSS, Tunisia.*

^d *Unité de Recherche Pharmacologie et Toxicologie des Xénobiotiques, Faculté de médecine de Sfax, Tunisia.*

^e *Laboratory of Microbiology and Enzyme Engineering, ENIS, University of Sfax, Tunisia.*

*Corresponding author: Tel.: +216 74 674 354; fax: 216 74 674 364;

E-mail addresses: assaadsila@gmail.com

Abstract

Background: Reactive oxygen species play a crucial role in the pathogenesis of diabetes and its complications. The present study was undertaken, *in vivo*, to examine the protective effect of astaxanthin extracted from the shell waste of deep-water pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) against oxidative stress of alloxanic adult male rats.

Results: Alloxan treatment revealed a significant elevation in plasma glycemia and lipid parameters such as total lipid, total cholesterol and triglycerides compared to the control group (C). In addition, liver malonaldehyde levels (MDA), an index of lipid peroxidation, significantly increased compared to control group. The activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) and reduced glutathione (GSH) levels decreased significantly compared to control group. Moreover, diabetic rats (D-D) presented a significant increase in the activities of aspartate transaminase (AST) alanine transaminase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP) in plasma, indicating considerable hepatocellular injury. Astaxanthin treatment restores these parameters near to control values. Histological studies on the liver tissue of (D-As) treated rats confirmed the protective effects of astaxanthin.

Conclusions: The results revealed that astaxanthin may be helpful in preventing diabetic complications in adult rats by reversing hepatotoxicity. It can be one of the ingredients in a number of healthy products.

Keywords: Diabetes; Rats; Liver; Astaxanthin; Oxidative stress.

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM), characterized by hyperglycaemia and development of diabetic complication) is a health problem affecting millions of individuals worldwide [1]. Several experimental studies have suggested the participation of reactive oxygen species (ROS) in the onset of diabetes. Oxidative stress was caused by an imbalance between antioxidant systems and the production of oxidant including ROS and was involved in alteration of physiologically critical molecules such as proteins, lipids, carbohydrates and nucleic acids and generated damage to the tissues like pancreas, kidney and liver. DM depletes also the capacity of antioxidative defense. Enzymatic and non-enzymatic antioxidants play important roles during the process of oxidation by scavenging or preventing the generation of ROS [2]. Natural antioxidants can be provided in many natural product such as fruit and vegetables but also in by products of seafood harvesting. Many studies have confirmed that exogenic antioxidants are essential for counteracting oxidative stress [3]. These antioxidants scavenge free radicals and prevent lipid peroxidation which plays an important role in protection against problems of chronic disease such as diabetes [4].

In several of the major fish-producing countries, the by-products of seafood harvesting comprise about 50% of the entire harvest. These materials, which represent an environmental problem to the fishing industry, constitute an important source of proteins, enzymes and carotenoids. Shrimp processing is one of the important marine industry in Tunisia that generates considerable quantities of solid waste in the form of head and body carapace. These body parts comprise 48–56% depending on the species. Shrimp waste is one of the important sources of natural carotenoids [5]. The recovery of these valuable components from the waste would not only improve the economy for shrimp processors, but also would minimize the pollution potential of the shrimp waste. The major carotenoids found in crustaceans and salmonidae and in the wastes of shrimps are astaxanthin and its esters [6].

Astaxanthin (3, 3'-dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione) is a ketocarotenoid derived from β -carotene oxidation. Its structure contains both ketonic and hydroxylic functional groups, which are responsible for its exceptional antioxidant properties by scavenging free radicals and quenching singlet oxygen [7]. Astaxanthin was reported to be a potent antioxidant and has a variety of biological activities [8].

Astaxanthin have beneficial effects supporting human health and well-being and by preventing pathologies. Significant antioxidant powers have been ascribed to astaxanthin, based primarily on experimental findings. In this context, human brain cells were subjected to an oxidative stress-induced neuronal cell damage system. Significant protection was found in cells pre-treated with astaxanthin. Additionally, pre-treatment with astaxanthin inhibited the

generation of reactive oxygen species. The authors concluded the neuroprotective effect of astaxanthin is suggested to be dependent upon its antioxidant potential and mitochondria protection; therefore, it is strongly suggested that treatment with astaxanthin may be effective for oxidative stress-associated neurodegeneration and a potential candidate for natural brain food” [9]. Astaxanthin can also protect against damage from ischemia. The researchers attributed astaxanthin’s benefits to its intense antioxidant activity [10]. Another study found that pretreatment with astaxanthin 5 hours before ischemia provided protection against brain damage [11].

Astaxanthin has demonstrated safety in numerous human clinical trials. In one open-label clinical study on subjects with metabolic syndrome [12], astaxanthin (16 mg/day, for three months) significantly raised blood bilirubin, potassium, and creatine kinase, although all three values remained within normal range. Also, astaxanthin significantly lowered the liver enzyme gamma-glutamyl transpeptidase.

Investigations seeking alternative solutions for the treatment of diabetes have been subject of interest in the medical science, including the administration of compound with antidiabetic properties and its potential as a therapeutic agent. Antioxidant therapy has shown positive effects, inhibiting the progression of late diabetic complications. The biological potential of astaxanthin is related to its antioxidant capacity and the protective action of astaxanthin in the treatment of diabetes can be related to its ability as a ROS scavenger of singlet oxygen, superoxide radical and peroxy radical species involved in tissue damage. We focus in this study to confirm this important role in combating diabetes complication.

2. Materials and Methods

2.1. Collection of samples

The deep-water pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) waste consisted of heads, cephalothorax, shells and appendix, which were obtained in fresh condition from a shrimp processing plant located in Sfax, Tunisia. Prior to use, the shrimp shells were washed thoroughly with distilled water and grounded. The shells were then stored at -20 °C until further analysis.

2.2. Astaxanthin extraction

Astaxanthin was extracted according to the method of Sila et al. [13]. One hundred grams of shrimp shells were mixed with 200 ml of acetone containing 100 mg of BHT/l. The mixture was mechanically agitated for 16 h in the dark at 4°C. The red pigmented solvent was recovered under slight vacuum filtration (filter paper no. 1, Whatman, SIGMA, USA). Fresh acetone (125 ml) was added to the flasks and they were agitated for another 2 h. The pooled extract was collected in a separating funnel, 125 ml of petroleum ether and 94 ml of 0.73%

(w/v) NaCl solution were added. After thorough mixing, the epiphase was collected. To the lower phase an equal volume of water was added, mixed and the epiphase was collected, the pooled epiphase was concentrated under vacuum at temperatures not exceeding 45°C.

2.3. Quantification and identification of astaxanthin

The organic solvent extracted astaxanthin was quantified by measuring absorbance at 470 nm and using the equation of Kelley and Harmon [14].

Sample was analyzed for astaxanthin purity using HPLC system equipped with refractive index detector (RID), the column was C-18 reversed phase analytical (250 mm × 4.6 mm Eurosphere 100-5 KNAWER). Analysis was performed using a gradient of methanol (2.0% in water) and acetonitrile at the flow of 1 min/ml. Calibration curves were established by injecting pure astaxanthin (Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA)) at different concentrations as a standard in the HPLC mobile phase

2.5. Animals

The investigation was conducted in accordance with the International Principles for Laboratory Animal Use and Care as found in the guidelines [15], and in accordance with the guidelines of the Animal Care Committee at the Faculty of Medicine, Sfax University (Tunisia).

Twenty-four male adult Wistar rats, weighing ~ 200 g, were purchased from the Central Pharmacy (Tunisia) and were maintained under conditions of controlled temperature (22 °C ±1), relative humidity of 40% and a daily 12 hours photoperiod.

2.6. Experimental procedure

Diabetes was confirmed after the injection of alloxan monohydrate (Sigma-Aldrich, Germany) by measuring the fasting blood glucose concentration. The rats with blood glucose level ≥ 200 mg/dl were considered to be diabetic and were used in the experiment. The treatment with astaxanthin was started 7 days after diabetes confirmation and continued for 30 days.

The animals were allocated randomly to four groups of six animals each:

- **[Control group]**, group **C**: rats received as vehicle 0.9% NaCl (w/v) and served as negative controls.
- **[Alloxan treated group]**, group **D**: rats received a subcutaneous dose of alloxan (120 mg/kg of body weight) and included in study as diabetic rats.
- **[Alloxan and astaxanthin treated group]**, group **D-As**: diabetic rats received astaxanthin (20 mg kg/ body weight) dissolved in olive oil with daily gavage. The rats received single-dose per day in the morning.

- **[Olive oil treated group]** group **D-OO**: diabetic rats received olive oil.

All treatments were made by gavage during 21 days. During the experimental period, the rats had free access to tap water and commercial standard pellet diet (Industrial Company of Rodent Diet, Sfax, Tunisia). At the end of experimental period, rats were sacrificed by decapitation to avoid stress.

2.7. Samples

Blood samples were collected into clean dry beakers for serum preparation. They were centrifuged at 5000 g for 20 min and plasma samples were drawn and kept at -20°C until analysis. Livers were quickly removed, cleaned and washed with saline solution and cut in small parts. They were homogenized in 10% (w/v) phosphate buffer (pH 7.4) using an ultraturax (JANKE & KUNKEL IKA, type T25) and centrifuged at 10000 xg for 15 min at 4°C. For histological examination, some portions of livers were immediately fixed in 10% formalin solution.

2.8. Biochemical assays

Determination of plasma glucose and insulin levels

Plasma glucose level was assayed by enzymatic methods, using commercial reagent kits purchased from Biomaghreb (Ariana, Tunisia). Plasma insulin level was determined using rat insulin enzyme linked immunosorbent assay kit Ref. RIT-461 No. AKRIN-010T (Shibayagi, Japan).

Protein content

Protein content in tissue was determined according to the method of Lowry, et al. [16] using bovine serum albumin (BSA) as standard.

Analysis of lipid parameters in plasma

Plasma lipid parameters such as total cholesterol (TC), triacylglycerol (TG) and high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) levels were determined by enzymatic methods, using commercial kits from Biomaghreb (Ariana, Tunisia). The low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) fraction and atherogenic index (AI) were determined according to the Friedewald equations:

$$\text{LDL-C} = \text{TC} - (\text{Triglycerides}/5 + \text{HDL-C})$$

$$\text{AI} = (\text{TC} - \text{HDL-C}) / \text{HDL-C}$$

Determination of malondialdehyde (MDA) level

MDA level, index of lipid peroxidation, was estimated spectrophotometrically by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) which were expressed in terms of malondialdehyde content according to the method of Draper and Hadley [17]. Briefly,

aliquots of 0.5 ml of liver homogenates were mixed with 1ml of trichloroacetic acid solution (TCA) and centrifuged at 4000 xg for 10 min. Then 1ml of thiobarbituric acid reagent (TBA, 0.67%) was added to 0.5 ml of supernatant and incubated at 95°C for 15 min. The absorbance was measured at 532 nm. The MDA values were calculated and expressed as nmoles of MDA /g of tissue.

2.9. Determination of antioxidant parameters

Superoxide dismutase (SOD)

SOD activity was estimated according to the method of Beauchamp and Fridovich [18]. The reaction mixture contained 50 mM of tissue homogenates in potassium phosphate buffer (pH 7,4), 0.1 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), 13 mM L-methionine, 2 mM riboflavin and 75 mM Nitroblue Tetrazolium (NBT). The developed blue color in the reaction was measured at 560 nm. One unit of SOD activity was defined as the amount of enzyme required to inhibit the reduction of NBT by 50% and activity was expressed as units/mg protein.

Catalase (CAT)

CAT activity was determined as described by the method of Aebi [19]. Enzymatic reaction was initiated by adding an aliquot of 20 µl of the homogenized tissue and the substrate (hydrogen peroxide, H₂O₂) to a concentration of 0.5 M in a medium containing 100 mM phosphate buffer, pH 7.4. Change in absorbance was recorded at 240 nm. The enzyme activity was expressed as µmoles H₂O₂ consumed/ minute/ mg protein.

Glutathione peroxidase (GPx)

GPx activity was determined as described by the method of Flohe and Gunzler [20]. GPx catalyzes the oxidation of GSH by cumene hydroperoxide. In the presence of GSH reductase and NADPH, the oxidized GSH is immediately converted to the reduced form with a concomitant oxidation of NADPH–NADP⁺. The enzyme activity was expressed as nanomoles GSH oxidized/minute/mg of protein.

Glutathione reductase (GR)

GR activity was assayed by the modified method of by Mohandas et al. [21]. The enzyme activity was quantified by measuring the disappearance of NADPH at 340nm and was calculated as nmol NADPH oxidized/minute/mg of protein.

Reduced glutathione level (GSH)

Hepatic GSH was estimated according to the method of Jollow et al. [22]. The method based on the development of yellow color when DTNB (5,5-dithio-bis2-nitrobenzoic acid) was added to samples containing sulphhydryl groups. Total GSH content was expressed as µg GSH/g of tissue.

2.10. Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and phosphatase alkaline (PAL) activities

AST, ALT and PAL activities in plasma, used as biochemical markers for hepatic damage, were determined by enzymatic methods using commercial reagent kits from Biomaghreb (Ariana, Tunisia).

2.11. Histopathological studies

The tissues fixed in formalin solution were washed with distilled water and processed through a series of alcohol baths, embedded in paraffin and sectioned at 5-6 μm thickness. They were stained with hematoxylin-eosin and examined by light microscopy.

2.12. Statistical analysis

The data were analyzed using the statistical package program Stat view 5 Software for Windows (SAS Institute, Berkley, CA). Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test as a post hoc test for comparison between groups [(D-D, D-As) vs. (C)] and [(D-As) vs. (D-D)]. All values were expressed as mean \pm SD. Differences were considered significant if $p \leq 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1. Astaxanthin extraction

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β,β -carotene-4,4'-dione) is a ketocarotenoid derived from β -carotene oxidation. Its structure contains both ketonic and hydroxylic functional groups, which are responsible for its exceptional antioxidant properties in free radicals scavenging and in quenching singlet oxygen [7].

The raw material used for the present study was shrimp shell wastes of deep-water pink shrimp (*P. longirostris*). To ensure maximum yield of carotenoid pigments this deep sea species was selected. The astaxanthin was quantified in the shrimp shell extract of *P. longirostris* in the present study at 470 nm in hexane. The Purity of astaxanthin extracted from shrimp shell waste was verified by a high-pressure liquid chromatography (HPLC). Astaxanthin was eluted in the fraction between 10.0% and 35.0% acetonitrile as a single peak (474 nm) and identified on the basis of retention time in comparison with that of standard astaxanthin.

3.2. Plasma glucose and insulin levels

As demonstrated in our previous data, the present study confirms that alloxan provokes an increase of glycemia and a decrease in insulin levels in the diabetic rats compared to the control group [3]. Glycemia of group D-OO (Figure 1A, B) still elevated compared to the control one that means that olive oil does not affect glycemia in diabetic rats. The

administration of astaxanthin to diabetic rats induced a significant decrease in the glycemia and an increase in insulin levels compared to the diabetic group. Astaxanthin play a crucial role in combating hyperglycemia.

3.3. Plasma lipid profile

Figure 2 shows the levels of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), LDL-cholesterol and HDL-cholesterol. Diabetic rats developed an increase in TC, TG and LDL-c levels and a decrease in HDL-c levels, after 30 days of treatment, compared to control rats.

Previous studies of Merzouk and Khan [23] and Makni et al. [3], have demonstrated that diabetes induced alterations in lipid metabolism objectified by an increase plasma TG and TC levels. The administration of astaxanthin to diabetic rats ameliorate significantly plasma lipid profile as confirmed by the decrease of TC, TG, LDL-c levels and the increase of HDL-c level compared to the diabetic group. The capacity of astaxanthin to restore theses lipid parameters near to normal values can be attributed to the potential therapeutic agent in cardiovascular disease as demonstrated by Fassett and Coombes [24].

3.4. Oxidative stress and antioxidant parameters

A various experimental studies have suggested the participation of ROS in the onset of diabetes mellitus and development of diabetic complications [3] demonstrated by induction of lipid peroxidation and depression of antioxidant defense systems.

Hepatic MDA levels are shown in Table 1. A significant increase in MDA levels was observed in diabetic rats when compared to those of control group. This suggested that alloxan induce free radicals formation such as hydrogen peroxides and hydroxyl radical, leading to cellular damage and oxidative stress. There is a wide agreement that the excessive production of ROS induced oxidative stress and played an important role in the pathogenesis of diabetic complications [25]. Administration of astaxanthin decreased significantly the levels of lipid peroxidation in D+As rats compared to the diabetic group.

Astaxanthin can scavenge the free radicals and/or inhibited their formations. As astaxanthin belong to the carotenoid family found in aquatic animals and many popular types of seafood, it is very good at protecting membrane phospholipids and other lipids against peroxidation. Astaxanthin is closely related to other well-known carotenoids, such as β -carotene, zeaxanthin and lutein, thus it shares many of the metabolic and physiological functions attributed to carotenoids. Epidemiologic studies have shown an inverse relationship between the presence of various cardiovascular diseases and high intake of carotenoid containing food, such as fruits and vegetables [26]. A part from their provitamin A activity, carotenoids exhibit antioxidant properties and can affect cell growth regulation, and modulate

gene expression and immune response, all of which are possible mechanisms of relevance [27].

Study of Kurihara et al. [28] confirmed that astaxanthin has up to several-fold stronger free radical antioxidant activity than vit E and β -carotene. This scavenging ability is believed to have a key role in several other diseases.

Genesis of diabetes mellitus not only enhances reactive oxygen species generation, but also depletes the capacity of antioxidative defense. Enzymatic and nonenzymatic antioxidants play important roles during the process by scavenging ROS or preventing their formation [2]. Our data showed a significant decrease of SOD, CAT, GPx, GR activities and GSH level in liver of diabetic rats compared to controls (Table 1). The inhibition of enzymes involved in free radical removal led to the accumulation of H_2O_2 , which promoted lipid peroxidation and modulation of DNA, altered gene expression and cell death [29]. Our previous studies reported that diabetes mellitus reduced the activities of these enzymes [3].

Our results corroborated with previous studies of Badary et al. [30] who suggested that the reduction in the activity of the antioxidative enzyme activities indicated the inefficient role of these enzymes to scavenge ROS. In fact, superoxide and hydrogen peroxide radicals might be implicated in oxidative inactivation of enzymes.

The supplementation of astaxanthin to diabetic animals improved the antioxidant status as compared to those of diabetic rats and restored their activities near to normal values, thus emphasizing its effects as an antioxidant product.

The chemical composition of astaxanthin promotes its antioxidant properties because oxygenated groups contained in each additional ring structure of the molecule reduce the effect of peroxy and superoxide radicals and singlet oxygen [13]. In this study, it was observed the positive effect of astaxanthin in the hepatic tissue of diabetic rats. Astaxanthin normalizes the activity of the antioxidant enzymes from supplemented diabetic rats. Astaxanthin presented mild effects on the liver with stimulation of glutathione system.

GSH level reduced significantly in the diabetic rats (Table 1). According to Yao et al. [31], glutathione is considered as the major nonprotein thiol in mammalian cells and tissues. Its role in the detoxification of ROS is important [32]. The decrease level of GSH might be due to the generation of ROS caused by hyperglycemia in diabetes mellitus. Similar results are observed in the study of Obrosova et al., [33] in diabetic patients and in experimental models.

3.5. Plasma transaminase

The transaminases are the most sensitive biomarkers directly implicated in the extent of cellular damage and considered as bioindicators of hepatic injury [34]. AST, ALT and PAL

activities are represented in Figure 3. Our results demonstrated a significant increase in plasma AST, ALT and PAL activities of diabetic rats compared to those of controls. Elevation in ALT and AST indicates the utilization of amino acids for the oxidation or for gluconeogenesis and is used to determine liver damage [35]. The administration of astaxanthin to diabetic rats reduced the activities of these transaminases near to control values.

3.6. Histology study

Biochemical modifications were confirmed by histological study. Histopathological evaluation revealed that alloxan caused extensive damage in hepatocyte cells of diabetic rats, such as lipid vacuolization, membrane cell degradation, leucocytes infiltration and cell necrosis and death (Figure 4). In fact, the cytotoxic action of this diabetogenic agent is mediated by the formation of reactive oxygen species [36]. Light microscopic findings showed that the administration of astaxanthin prevented alloxan-induced diabetic hepatic dysfunction by the inhibition of the generation of free radicals in the hepatic tissue, and these agents appear to play a cytoprotective role in the liver insulted by alloxan-induced diabetes.

We conclude that treatment with astaxanthin significantly improved the structure of hepatic cells. We therefore suggest that astaxanthin is effective in reversing hepatotoxicity caused by diabetes status.

4. Conclusion

The present observations reflect that diabetes could be a driving force for the disease process in terms of oxidative stress and inflammation. With the addition of astaxanthin, it is possible to prevent an early liver injury as the result of diabetic complication. Astaxanthin is of interest to many recent researchers because of the anti-inflammatory and anti-atherogenic effects, which stem from its antioxidant role. Besides antioxidant function, other effects specifically receptor activation or interaction with endogenous bioactive factors by astaxanthin must also be considered in future. Astaxanthin can be one of the ingredients in a number of healthy products.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was funded by the “Ministry of Higher Education, Scientific Research and Technology, Tunisia”.

References

- [1] Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, Delattre J. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab* 2000;26:163–176.

- [2] Veerappan RM, Senthil S, Rao MR, Ravikumar R, Pugalendi KV. Redox status and lipid peroxidation in alcoholic hypertensive patients and alcoholic hypertensive patients with diabetes. *Clinica Chimica Acta* 2004;340:207–212.
- [3] Makni M, Fetoui H, Gargouri NK, Garoui EM, Zeghal N. Antidiabetic effect of flax and pumpkin seed mixture powder: effect on hyperlipidemia and antioxidant status in alloxan diabetic rats. *J Diabetes Complicat* 2011;25:339–345.
- [4] Hozawa A, Jacobs DRJr, Steffes MW, Gross MD, Steffen LM, Lee DH. Association of serum carotenoid concentrations with the development of diabetes and with insulin concentration: interaction with smoking to Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Am J Epidemiol* 2006;163:929-937.
- [5] Shahidi F, Metusalach B, Brown JA. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. *CRC Critical Reviews. Food Sci Nutr* 1998;38:167-171.
- [6] Wathene E, Bjerken B, Storeabakken T, Vassvik V, Odaland AB. Pigmentation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed astaxanthin in all meals or in alternating meals. *Aquaculture* 1998;159:217-31.
- [7] Ribeiro HS, Rico LG, Badolato GG, Schubert, H. Production of O/W emulsions containing astaxanthin by repeated premix membrane emulsification. *J Food Sci* 2005;70:117-123.
- [8] Naguib YM. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J Agr Food Chem* 2000;48:1150-1154.
- [9] Liu X, Osawa T. Astaxanthin protects neuronal cells against oxidative damage and is a potent candidate for brain food. *Forum Nutr* 2009;61:129-135.
- [10] Curek GD, Cort A, Yucel G, Demir N, Ozturk S, Elpek GO, Savas B, Aslan M. Effect of astaxanthin on hepatocellular injury following ischemia/reperfusion. *J Toxicol.* 2010;267:147-153.
- [11] Lu YP, Liu SY, Sun H, Wu XM, Li JJ, Zhu L. Neuroprotective effect of astaxanthin on h(2)o(2)-induced neurotoxicity in-vitro and on focal cerebral ischemia in-vivo. *Brain Res* 2010;9:21-22.
- [12] Uchiyama A, Okada Y. Clinical efficacy of astaxanthin-containing *Haematococcus pluvialis* extract for the volunteers at risk of metabolic syndrome. *J Clin Biochem Nutr* 2008;43:390-393.
- [13] Sila A, Ayed-Ajmi A, Sayari N, Nasri M, Bougatef A. Antioxidant and anti-proliferative activity of astaxanthin extracted from the shell waste of deep-water pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) Special Issue: Development of Bioprocesses for Potential Functional Ingredients from Marine products. *Nat Prod J* 2013;3:82-89.

- [14] Kelley CE, Harmon AW. Method of determining carotenoid contents of Alaska pink shrimp and representative values for several shrimp products. *Fish Bull* 1972;70:11-17.
- [15] Council of European Communities. Instructions du Conseil sur la protection des animaux utilisés à couvrir recherches scientifiques. *Journal officiel des Communautés européennes* (JO 86/609/CEE) 1986;L358:1-18.
- [16] Lowry OH, Roenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–275.
- [17] Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth Enzymol* 1990;86:421–431.
- [18] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gel. *Anal Biochem* 1971;44:276–287.
- [19] Aebi H. Catalase *in vitro*. *Meth Enzymol* 1984;105:121–126.
- [20] Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Meth Enzymol* 1984;105:114-121.
- [21] Mohandas J, Marshall JJ, Duggin GG, Horvath JS, Tiller D. Differential distribution of glutathione and glutathione related enzymes in rabbit kidneys. Possible implication in analgesic neuropathy. *Cancer Res* 1984;44:5086–5091.
- [22] Jollow DJ, Mitchell JR, Zampaglione N, Gillete JR. Bromobenzene induced liver necrosis: protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzeneoxide as the hepatotoxic intermediate. *Pharmacology* 1974;11:151–169.
- [23] Merzouk H, Khan NA. Implication of lipids in macrosomia of diabetic pregnancy: can n-3 polyunsaturated fatty acids exert beneficial effects. *Clin Sci* 2003;105:519–529.
- [24] Fassett RG, Coombes JS, Drugs M. Astaxanthin: a potential therapeutic agent in cardiovascular disease. 2011;21:447-465.
- [25] Ceriello A. Hyperglycaemia: the bridge between non-enzymatic glycation and oxidative stress in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Nutr Metab* 1999;12:42–46.
- [26] Fraser PD, Bramley PM. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* 2004;43:228-265.
- [27] Stahl W, Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med* 2003;24:345-51.
- [28] Kurihara H, Koda H, Asami S, Kiso Y, Tanaka T. Contribution of the antioxidative property of astaxanthin to its protective effect on the promotion of cancer metastasis in mice treated with restraint stress. *Life Sci* 2002;70:2509-2520.
- [29] Calviello G, Piccioni E, Boninsegna A, Tedesco B, Maggiano N, Serini S. DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;211:87–96.

- [30] Badary OA, Abdel-Maksoud S, Ahmed WA, Owieda GH. Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats. *Life Sci* 2004;76:2125–2135.
- [31] Yao P, Li K, Jin Y, Song F, Zhou S, Sun X, Nussler KA, Liu L. Oxidative damage after chronic ethanol intake in rat tissues: prophylaxis of Ginkgo biloba extract. *Food Chem* 2006;99:305–314.
- [32] Mallikarjuna K, Nishanth K, Hou CW, Kuo CH, Sathyavelu Reddy K. Effect of exercise training on ethanol induced oxidative damage in aged rats. *Alcohol* 2009;43:59–64.
- [33] Obrosova I, Fathallah L, Liu E, Nourooz-Zadeh J. Early oxidative stress in diabetic kidney: effect of DL-alpha lipoic acid. *Free. Radic Biol Med* 2003;34:186-195.
- [34] Yagmurca M, Fadillioglu E, Erdogan H, Ucar M, Sogut S, Irmak MK. Erdosteine prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Pharmacol Res* 2003;48:377–382.
- [35] Philip GH, Reddy PM, Sridevi G. Cypermethrin induced in vivo alterations in the carbohydrate of 34 freshwater fish *Labeo rohita*. *Ecotoxicol Env Saf* 1995;31:173–178.
- [36] Heikkila RE, Winston B, Cohen G, Barden H. Alloxan induced diabetes, evidence for hydroxyl radicals as a cytotoxic intermediate. *Biochem Pharmacol* 1976;25:1085-1092.

Table 1. Liver malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxydase (GPx) activities and reduced glutathione (GSH) levels. Values are means \pm SD for six rats in each group.

Group	MDA	SOD	CAT	GPx	GSH
C	7.28 \pm 0.37	13.43 \pm 3.8	6.08 \pm 0.15	9.9 \pm 1.74	7.28 \pm 0.28
D	14.97 \pm 0.24 ^{**}	7.17 \pm 2.09 [*]	2.12 \pm 0.33 ^{***}	4.24 \pm 1.9 ^{**}	3.96 \pm 0.13 ^{***}
D+As	7.18 \pm 0.17 ^{YYY}	10.07 \pm 1.21 ^{YY}	5.88 \pm 0.26 ^{*YYY}	7.58 \pm 1.7 ^{*YYY}	6.03 \pm 0.23 ^{*YY}
D+OO	14.61 \pm 0.51 ^{***}	7.27 \pm 1.8 [*]	2.7 \pm 0.3 ^{***}	5.29 \pm 1.03 ^{**}	4.16 \pm 0.22 ^{***}

Treated group (D; D+As; D+OO) vs control group (C): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Treated group (D+As) vs diabetic group (D): ^Y $p < 0.05$; ^{YY} $p < 0.01$; ^{YYY} $p < 0.001$.

MDA: nmoles/g of liver

SOD: U/ mg protein

CAT: μ molesH₂O₂ /mg protein

GPx: nmol GSH/min/mg protein

GSH: μ g/g of liver

Figure 1. Plasma glucose (mg/dl) (A) and insulin (B) levels in control rats (C), diabetic rats (D-D), astaxanthin (D-As) and olive oil (D-OO). Each value represents the mean \pm SE of six rats per group. Treated group (D; D+As; D+OO) vs control group (C): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Treated group (D+As) vs diabetic group (D): $^{\text{¥}}$ $p < 0.05$; $^{\text{¥¥}}$ $p < 0.01$; $^{\text{¥¥¥}}$ $p < 0.001$.

Figure 2. Plasma total cholesterol(A), Triglyceride (B), HDL-cholesterol (C) and LDL-cholesterol (D) levels in control rats (C), diabetic rats (D-D), astaxanthin (D-As) and olive oil (D-OO). Each value represents the mean \pm SE of six rats per group. Treated group (D; D+As; D+OO) vs control group (C): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Treated group (D+As) vs diabetic group (D): $^{\text{¥}}$ $p < 0.05$; $^{\text{¥¥}}$ $p < 0.01$; $^{\text{¥¥¥}}$ $p < 0.001$.

Figure 3. Plasma AST, ALT and ALP activities in control rats (C), diabetic rats (D-D), astaxanthin (D-As) and olive oil (D-OO). (A): Aspartate transaminase (AST). (B): Alanine transaminase (ALT). (C): Alkaline phosphatase (ALP). Each value represents the mean \pm SE of six rats per group. Treated group (D; D+As; D+OO) vs control group (C): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Treated group (D+As) vs diabetic group (D): $^{\text{¥}}$ $p < 0.05$; $^{\text{¥¥}}$ $p < 0.01$; $^{\text{¥¥¥}}$ $p < 0.001$.





Figure 4. Effect of astaxanthin on histological changes in the liver of diabetic rats ($\times 400$). A: Control group; B: diabetic group; C: D+As group; and D: D+OO group.  : Cell necrosis;  : Lipid vacuolization;  : Leucocytes infiltration;  : Membrane cell degradation.

Fig. 1.

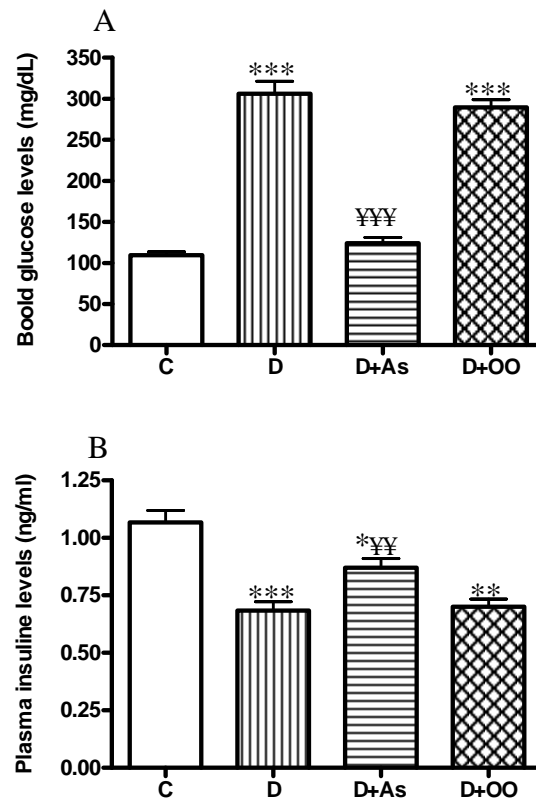


Fig. 2.

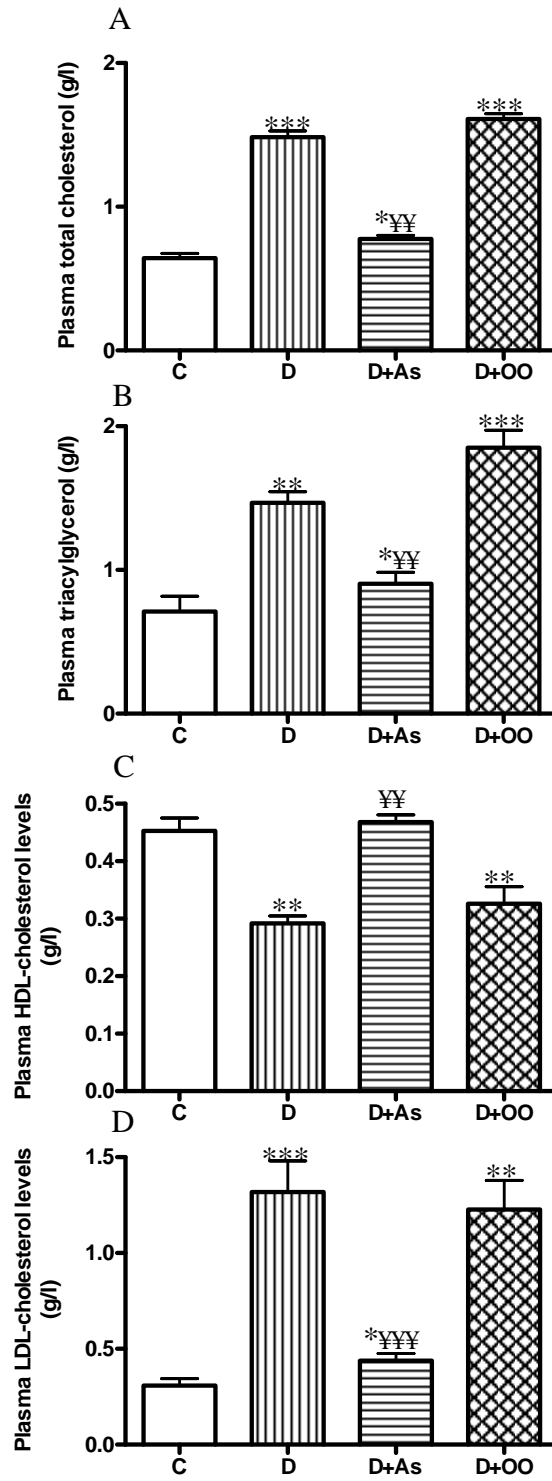


Fig. 3.

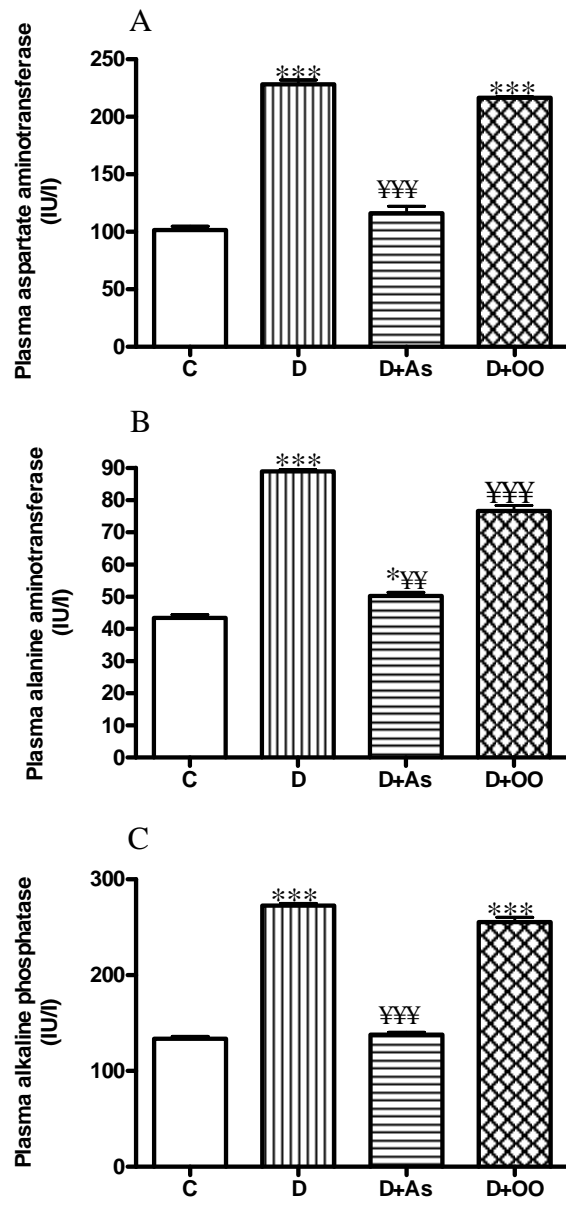
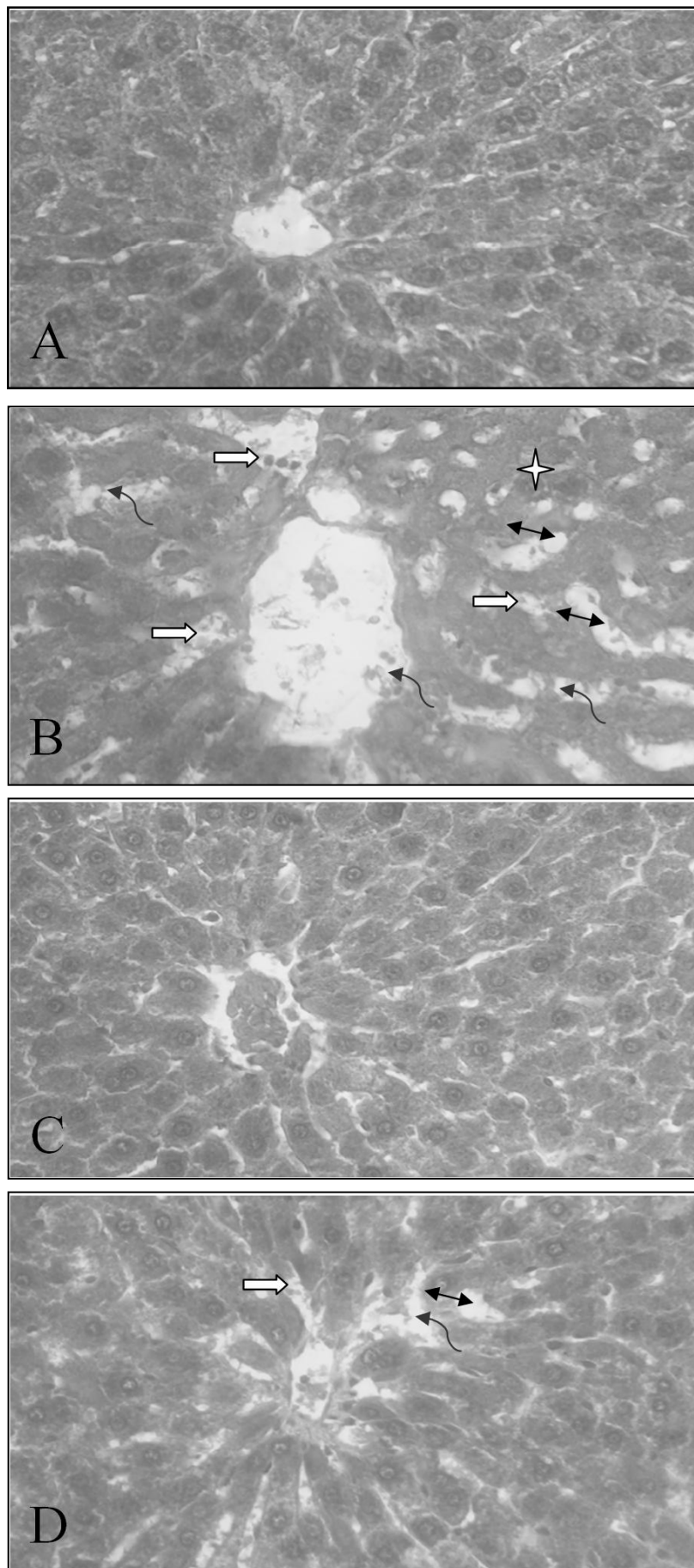


Fig. 4.



Chapitre II :

Les peptides bioactifs d'origine aquatique doués d'activités antibactérienne et anti-DDP-IV

L'hydrolyse enzymatique est une technique faisant intervenir des enzymes, ou protéases. Les enzymes sont présentes chez tous les êtres vivants : animaux, plantes et microorganismes. Chaque enzyme possède une spécificité d'attaque plus ou moins élargie, lui permettant de briser une ou plusieurs liaisons peptidiques. Les protéines peuvent donc être décomposées en peptides plus ou moins caractéristiques en exploitant les activités spécifiques d'une ou de plusieurs enzymes. Ainsi, chaque enzyme présente des caractéristiques d'activité qui lui sont propres. Ces caractéristiques influencent fortement la composition peptidique des hydrolysats formés. Il est donc important de maîtriser les paramètres intrinsèques d'une enzyme afin d'optimiser son utilisation, à savoir : sa température optimale d'utilisation, son pH optimal, le rapport enzyme/substrat (E/S) et son temps d'action : ce dernier étant fortement influencé par les trois premiers et relatif au degré d'hydrolyse souhaité.

Les peptides bioactifs sont des séquences déjà présentes dans les protéines, qui nécessitent d'être libérées pour être activées (Korhonen and Pihlanto, 2006). Les peptides présentent des compositions en acides aminés, des propriétés physicochimiques, des séquences et/ou des structures particulières. La composition en acides aminés et la digestibilité et les activités biologiques de certains hydrolysats ou de fractions peptidiques vont conférer d'excellentes propriétés nutritionnelles avec des applications dans les secteurs de l'alimentation, de la santé et de la nutraceutique. Dans ce contexte les peptides bioactifs représentent un axe majeur de la recherche dans le monde des aliments fonctionnels et des nutraceutiques. En effet, de nombreuses bioactivités ont déjà été identifiées (peptides antihypertenseurs, antioxydants, antimicrobiens, antidiabétiques, etc.), à partir de multiples matrices alimentaires, parmi lesquelles les protéines des produits de la pêche qui s'avèrent être une source importante de peptides bioactifs (Korhonen and Pihlanto, 2006).

Les peptides antibactériens sont de petits peptides présents dans le règne animal et végétal, capable de défendre l'hôte face aux agressions bactériennes. La majorité des peptides antibactériens sont des peptides cationiques (\pm 80%) (Boman, 1995). Les peptides antibactériens font tous partie d'une des catégories suivantes : les peptides cationiques linéaires à hélice- α ; les peptides cationiques enrichis en certains acides aminés ; les peptides contenant des résidus cystéine formant des ponts disulfures ; les peptides à structure «Random coil» et enfin les peptides anioniques (Brogden, 2005). Six caractéristiques intrinsèques au peptide vont affecter son caractère antimicrobien : sa taille, sa séquence, sa charge, sa configuration spatiale, son hydrophobicité et son caractère amphiphile. Selon le mode d'action on peut distinguer deux classes de peptides antibactériens : Les peptides formant des pores membranaires qui agissent en trois étapes: l'attraction, l'attachement et l'insertion peptidique entraînant la perméabilité membranaire. La classe des peptides interférant avec le

métabolisme cellulaire de la bactérie. De nombreuses techniques sont utilisées afin de comprendre le mécanisme responsable de l'activité antimicrobienne des peptides, parmi lesquelles la microscopie, l'utilisation de membranes modèles, la formation de canaux ioniques, le dichroïsme circulaire, etc. (Brogden, 2005).

La pathophysiologie classique du diabète type 2 est caractérisée par l'association d'une insulino-résistance et d'une baisse de la fonction des cellules bêta. L'axe incrétin y joue un rôle majeur, car les patients atteints du diabète type 2 présentent une mauvaise régulation de l'effet incrétin sur la stimulation de l'insuline, associée à une forte sécrétion de glucagon. Parmi les stratégies thérapeutiques novatrices envisagées contre le diabète type 2, on trouve celles fondées sur le glucagon-like peptide-1 (GLP-1) et le glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) (Gautier et al., 2008). L'effet « incrétin » paraît donc particulièrement prometteur. L'effet « incrétin » correspond à la stimulation de la sécrétion d'insuline par des hormones intestinales : le GIP et le GLP-1 (Gautier et al., 2008). Ces deux hormones sont stimulées par la prise alimentaire et sécrétées au niveau de l'estomac et de l'intestin proximal. Elles ont plusieurs actions : stimulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose ; inhibition de la sécrétion de glucagon ; ralentissement de la vidange gastrique et diminution de la prise alimentaire (Virally et al., 2008). Deux types de médicaments ont été développés pour utiliser l'effet « incrétin » en thérapeutique : Les incrétinomimétiques ou agonistes des GLP-1 et des le GIP et les inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase-4 (enzyme qui inactive le GLP-1 et le GIP). Au cours de ces 10 dernières années, de nombreux peptides inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase-IV (DPP-IV) ont été purifiés et identifiés à partir de protéines alimentaires de sources variées telles que la caséine du lait (Nongonierma et al., 2013), le lactosérum (Silveira et al., 2013), le jambon (Gallego et al., 2014), la gélatine porcine (Hsu et al., 2013), le riz (Hatanaka et al., 2012) et le thon (Huang et al., 2012).

Au cours de ce chapitre, le muscle de barbeau (*Barbus callensis*) a été utilisé comme source de protéines pour la préparation d'hydrolysats protéiques douées d'activités antibactérienne et anti-dipeptidyl peptidase-IV et pour l'isolement et l'identification de peptides responsable de ces activités.

Article 5:

Assaâd Sila, Naima Nedjar-Arroume, Karima Hedhili, Gabrielle Chataigné, Rafik Balti, Moncef Nasri, Pascal Dhulster, Ali Bougatef (2014).

Antibacterial peptides from barbel muscle protein hydrolysates: Activity against some pathogenic bacteria. **LWT - Food Science and Technology**. 55, 183-188. (IF : 2.468)

Préparation de peptides antibactériens par l'hydrolyse enzymatique de protéines de muscle de barbeau : Activité contre quelques bactéries pathogènes

Assaâd Sila, Naima Nedjar-Arroume, Karima Hedhili, Gabrielle Chataigné, Rafik Balti, Moncef Nasri, Pascal Dhulster, Ali Bougatef

La croissance microbienne sur les surfaces alimentaires est une cause majeure de la détérioration des aliments et la contamination bactérienne de produits alimentaires. Plusieurs facteurs peuvent être défavorables à la croissance de la flore pathogène dans ces produits. Par exemple, les basses températures, les emballages sous atmosphères modifiées ou les additifs alimentaires sont tous des moyens utilisés afin d'inhiber la multiplication des microorganismes. Par contre, les additifs possèdent plusieurs désavantages lors de leur utilisation puisqu'ils peuvent causer des réactions allergiques et des défauts de saveur. En outre, le sel peut augmenter les risques de maladies cardiovasculaires puisqu'il élève la tension artérielle. Par conséquent, certains des agents antimicrobiens traditionnels présentent des risques pour la santé des consommateurs et leur utilisation est de plus en plus limitée et controversée. Afin de répondre à la préoccupation du consommateur par rapport à sa santé en matière d'aliment sain et fonctionnel, les industriels optent à remplacer le maximum de produit chimique utilisé lors du procédé et de la conservation par des substances naturelles d'origine animales, végétales ou microbienne assurant ainsi une meilleure salubrité de leur produits. Plusieurs études ont démontré que certains peptides issus de la digestion enzymatique des protéines de produits d'origine aquatique, possédaient des propriétés antimicrobiennes (Sattar et al., 2006 ; Doyen et al., 2012 ; Jiang et al., 2014 ; Beaulieu et al., 2014 ; Tang et al., 2015). Il s'avère donc intéressant d'utiliser les peptides antibactériens isolés des hydrolysats enzymatiques des protéines alimentaires dans la conservation des aliments.

L'obtention de peptides bioactifs a été réalisé par hydrolyse enzymatique contrôlée des protéines de muscle de barbeau moyennant une préparation enzymatique commerciale : l'Alcalase[®]. La cinétique d'hydrolyse enzymatique des protéines est caractérisée par une phase initiale rapide, durant laquelle un grand nombre de liaisons peptidiques est hydrolysé,

après cette phase le degré d'hydrolyse (DH) tend à se stabiliser. Sept hydrolysats ont été préparés nommés H₁, H₂, H₃, H₄, H₅, H₆ et H₇, en variant le temps d'hydrolyse.

L'étude de la cinétique d'apparition et de disparition de l'activité antibactérienne au cours de la protéolyse enzymatique a été réalisée. Cette étude a permis d'optimiser le temps d'hydrolyse nécessaire et le degré d'hydrolyse adéquat permettant l'obtention d'hydrolysats fortement enrichis en biopeptides antibactériens. L'activité antibactérienne des hydrolysats préparés a été évaluée, par la méthode de diffusion, vis-à-vis de dix souches bactériennes : 5 souches à Gram-positif : *Listeria monocytogenes* (ATCC 43251), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Micrococcus luteus* (ATCC 4698) et *Bacillus subtilis*, et 5 souches à Gram-négatif : *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* (ATCC 43972), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) et *Enterobacter sp.* La tétracycline a été utilisée comme antibiotique de contrôle.

A une concentration de 1 mg/ml, seuls les hydrolysats (H₁-H₅) ont exercé une activité antibactérienne. Cependant, aucune activité n'a été détectée avec les protéines non hydrolysées et les hydrolysats H₆ et H₇. Selon les résultats obtenus, un rapport E/S égale à 1 U/mg de protéines, un temps d'hydrolyse de 15 minutes et un degré d'hydrolyse égale à 6,6% ont permis d'obtenir l'hydrolysats le plus actif. L'hydrolysats protéique H₃ (DH = 6,6%) a été lyophilisé puis fractionné sur une colonne de gel filtration Sephadex G-25.

Le chromatogramme de cet hydrolysats protéique (H₃) a montré l'existence de six pics majoritaires (F_I, F_{II}, F_{III}, F_{IV}, F_V et F_{VI}). Uniquement les fractions F_I, F_{II} et F_{III} sont douées d'activité antibactérienne contre les souches testées. La fraction F_{II} a manifesté l'activité antibactérienne la plus importante avec des zones d'inhibitions contre *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter sp* et *Micrococcus luteus* de l'ordre de $2 \pm 0,3$, $2,1 \pm 0,2$, $2 \pm 0,1$ et $2,3 \pm 0,1$ cm, respectivement. La fraction F_{II}, la plus active, a été soumise à un nouveau fractionnement par RP-HPLC. Le profil a montré la présence de plusieurs sous-fractions majoritaires. 4 sous-fractions douées d'activité antibactérienne ont été retenues. Ces sous-fractions, nommées F_{II-1}, F_{II-2}, F_{II-3} et F_{II-4} ont été analysées par spectrométrie de masse.

Onze peptides antibactériens ont été identifiés. Les masses moléculaires ainsi que les séquences de ces peptides bioactifs purifiés ont été déterminées par spectrométrie de masse (ESI/MS) et par spectrométrie de masse en tandem (ESI/MS/MS). Les séquences peptidiques identifiées au cours de ce travail sont : Gly-Val-His (275 Da) ; Trp-His-Arg (433 Da); Trp-His-Phe (452 Da); Leu-Thr-Met (327 Da); Ile-Thr-His (333Da)^o; Pro-Pro-Ser-Ser

(350 Da); Ala-Ala-Ala-Leu (308 Da) ; Ala-Ala-Gly-Gly-Val (337 Da) ; Ala-Ala-Val-Lys-Met (482 Da) et Ala-Ser-Ser-Ser (314). Ces peptides ne présentent pas d'activité hémolytique.

Antibacterial peptides from barbel muscle protein hydrolysates: Activity against some pathogenic bacteria

Assaâd Sila^{1,2,*}, Naima Nedjar-Arroume², Karima Hedhili², Gabrielle Chataigné², Rafik Balti³, Moncef Nasri⁴, Pascal Dhulster² and Ali Bougatif⁵

¹ *Unité Enzymes et Bioconversion. Ecole nationale d'Ingénieurs, PB 1173, Sfax 3038, Tunisie.*

² *Laboratoire de Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien, IUT A Lille I, BP 179, 59653 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.*

³ *Institut Supérieur de Biologie Appliquée, Médenine 4119, Tunisie.*

⁴ *Laboratoire de Génie enzymatique et de Microbiologie, Ecole nationale d'Ingénieurs, PB 1173, Sfax 3038, Tunisie.*

⁵ *Institut Supérieur de Biotechnologie de Sfax, BP 1175, 3038, Sfax Tunisie.*

*Corresponding author: Assaâd SILA Tel.: + 216 97 013 118; Fax: +216 74 275 595.

E-mail adresse: assaadsila@gmail.com

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.

Keywords: *Barbus callensis*; protein hydrolysates; purification; identification; antibacterial peptides.

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 (Jenssen, Hamill, & Hancock, 2006; Brogden, 2005; 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' (Boulangier, 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, & Vilcinskas, 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 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 (Référence???)

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.

Materials and methods

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 MΩ. All other chemicals and reagents used were of analytical grade.

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 µg of tyrosine per minute under the experimental conditions used.

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.

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 5000g 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.

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.

$$DH (\%) = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 = \frac{B \times Nb}{MP} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100$$

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 $\alpha = \frac{10^{\text{pH}-\text{pK}}}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}}}$

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).

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 × 56 cm) pre-equilibrated and eluted with distilled water. Fractions (4 ml) were collected at a 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 Qwater, filtered through 0.22 μ m filters, and then separated by Reverse-phase high-pressure liquid chromatography (RP-

HPLC) on a Waters C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm) (XBrideg™, Ireland). 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 analyze chromatographic data.

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).

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 eighteen hours 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 10000 rpm during 5 min. The cells of 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 hours 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 hours 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.

Hemolytic activity

The hemolytic activity of the active peptide fractions was determined by methods of Strub et al. (1996) and Dathe et al. (1996), slightly modified. Five milliliters 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 μ l of supernatant was diluted in 500 μ L 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.

A large number of all experiments were carried out to verify their reproducibility.

Results and discussion

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). 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 (Vercruyssen, Van Camp, & Smagghie, 2005; Lahl & Braun, 1994). 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 & Rasco, 2000). Kinetics studies of hydrolysis of barbel muscle using Alcalase[®] were followed at different degrees of hydrolysis (H₁-H₇) (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).

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 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/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 toward eight strains. Therefore, this hydrolysate was selected for further study.

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. As shown in Table 2a, antibacterial activity at 1 mg/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 actives fractions, fraction F_{II} was the most active against tested bacterial species.

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 2b and Fig. 3, only, four peptide sub-fractions showing antibacterial activity 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} 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 2b. For the 10 strains, the bacteria manifesting the most sensitivity to the fractions were *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. Pneumonia*, *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.

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 3).

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, Mikhlin, 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 3 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-Thr-Met, Ile-Thr-His, Pro-Pro-Ser-Ser and Gly-Val-His, Ala-Ser-Ser-Ser.

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.

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.

Acknowledgement

This work was funded by the Ministry of Higher Education and Scientific Research, Tunisia and also by CMCU project (12G0915).

References

- Adler-Nissen, J. (1986). Enzymic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Publishers. Barking. UK.
- Alasalvar, C., Shahidi, F., Miyashita, K., & Wanasundara, U. (2010) Handbook of seafood quality, safety and health applications. Chapter 42, pp 518.
- Altincicek, B., Linder, M., Linder, D., Preissner, K. T., & Vilcinskas, 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.
- 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.
- Boulanger, 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., Matsuzaki, K., Murase, O., & Bienert M. (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.
- 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 and Biophysica Acta*, 1401, 289-303.
- Jenssen, 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., Hide, I., Nakata, Y., Mori, K., Kawano, M., Fuchino, H., Sekita, S., & Neto, J. R. (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 potentversusselective cytotoxicity for antimicrobial dermaseptin 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 Technololgy*, 48, 68-71.
- Parish, C. A., Jiang, H., Tokiwa, Y., Berova, N., Nakanishi, K., Mc Cabe, D., Zuckerman, W., Xia, M. M., & Gabay, J. E. (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., Dettling, C., Thomas, U., & Hunziker, P. (2001). Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovin beta-lactoglobulin. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1526, 131-140.
- Pellegrini, A. (2003). Antimicrobial peptides from food protein. *Curr Pharm Des* , 9, 1225-1238.
- 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, 246-298.
- Strub, J. M., Goumon, Y., Lugardon, K., Capon, C., Lopez, M., Moniatte, M., Van Dorsselaer, A., Aunis, D., Metz-Boutigue, M. H. (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., & Smagghie, 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.

Figure 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.

Figure 2.

a. Gel filtration chromatography of hydrolysate H₃ obtained by traitement with Alcalase[®] on a Sephadex G-25.

b. Elution profile of fraction F_{II} separated by reversed-phase high performance liquid chromatography.

Figure 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*.

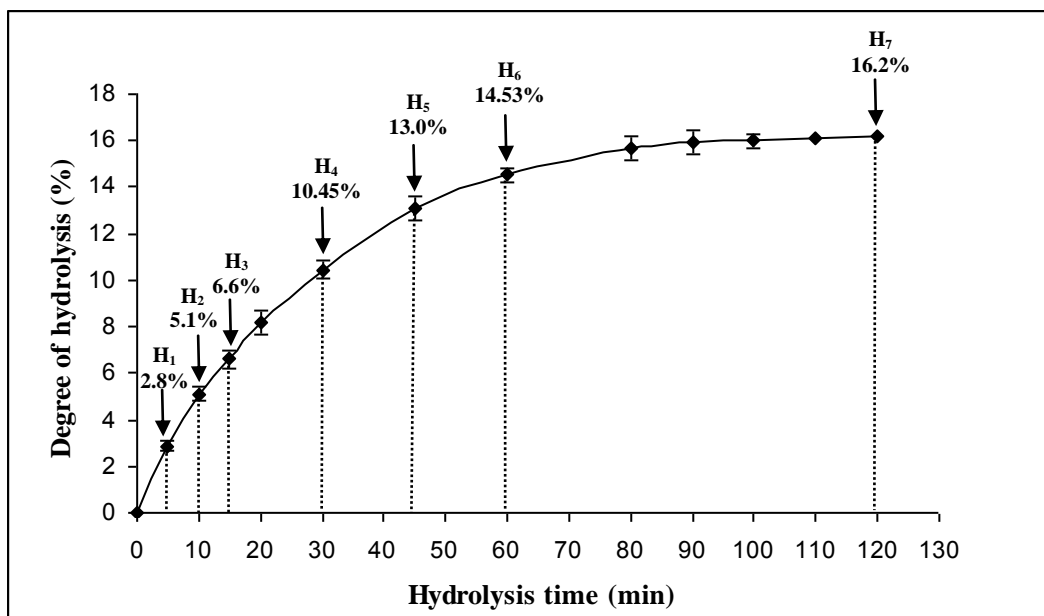
Fig. 1.

Fig. 2 a.

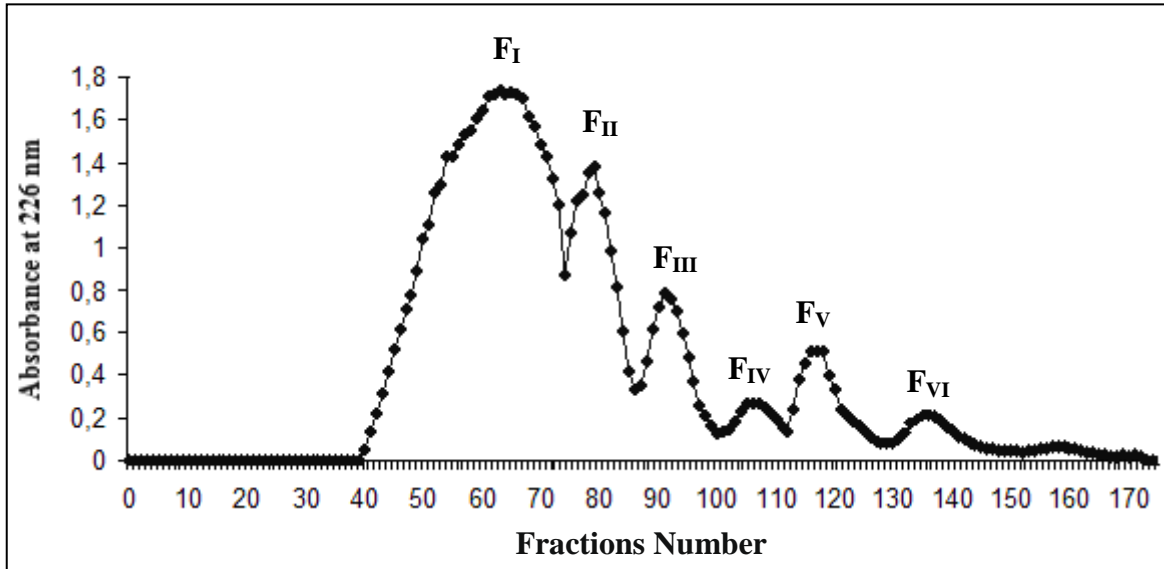


Fig. 2 b.

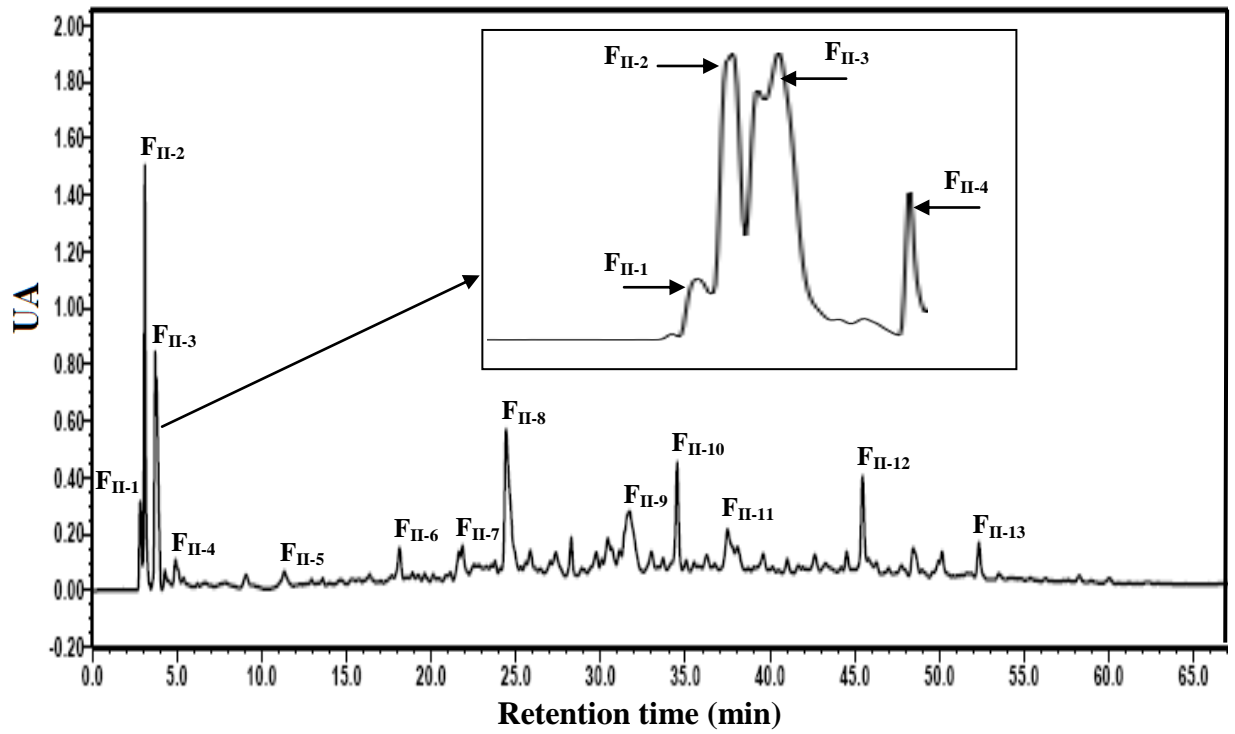
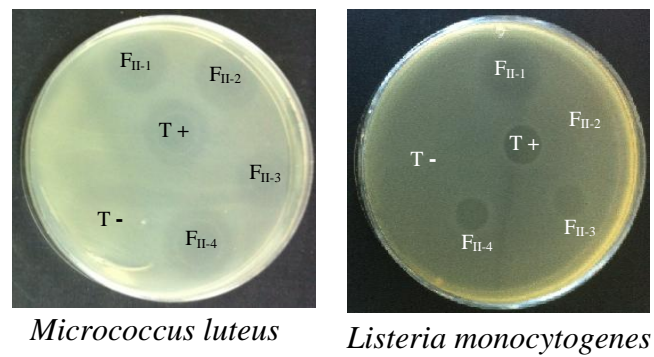
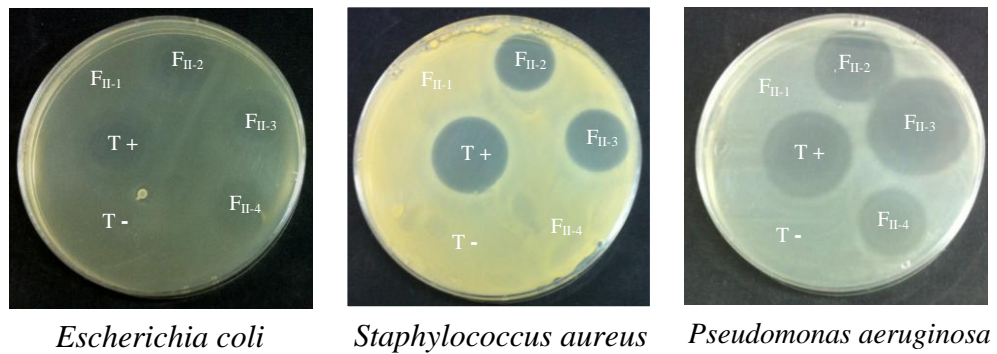


Figure 3.



T+: positive control; T-: negative control

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

Table 2. Antibacterial activity of (a) fractions of hydrolysate H₃ and (b) sub-fractions F_{II-1}, F_{II-2}, F_{II-3} and F_{II-4}.

a

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

b

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

Table 3. 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.

Article 6:

Assaâd Sila, Karima Hedhili, Rémi Przybylski, Semia Ellouz-Chaabouni, Pascal Dhulster, Ali Bougatef and Naima Nedjar-Arroume (2014).

Antibacterial activity of new peptides from barbel protein hydrolysates and mode of action via a membrane damage mechanism against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Functional Foods**. 11, 322-329. (IF : 4.48)

**Activité antibactérienne de nouveaux peptides identifiés à partir
d'hydrolysats protéiques de muscle de barbeau : Etude de mode
d'action par le mécanisme de la perméabilisation de la membrane
contre *Listeria monocytogenes***

Assaad Sila, Karima Hedhili, Rémi Przybylski, Semia Ellouz-Chaabouni,
Pascal Dhulster, Ali Bougatef, Naima Nedjar-Arroume

L'innocuité alimentaire représente un enjeu majeur dans le domaine alimentaire et celui de la santé publique puisque de 200 à 250 maladies sont transmises par l'intermédiaire des aliments (OMS, 2013). La contamination des produits alimentaires par des bactéries pathogènes entraîne d'importantes répercussions économiques chez les producteurs, les commerçants et les institutions. Les agents pathogènes les plus souvent signalés sont *Escherichia coli*, *Campylobacter* et *Listeria monocytogenes*. Cette dernière est une bactérie Gram + ubiquitaire qui peut être trouvée dans le sol, les réseaux hydriques, sur les végétaux ainsi que dans l'environnement industriel des ateliers de production et de transformation des aliments. Cette bactérie peut également être présente dans le tractus intestinal des animaux et de l'homme sous forme de portage asymptomatique. *L. monocytogenes* est un pathogène d'importance majeure en santé publique parce qu'il génère un très haut taux de mortalité chez les populations susceptibles telles que les personnes âgées, les gens immuno-supprimés ainsi que les nouveau-nés et les femmes enceintes. Elle est l'agent étiologique de la listériose, une infection grave d'origine alimentaire causée par la consommation de produits alimentaires contaminés, particulièrement les plats cuisinés carnés et les fromages de lait cru.

Les bactéries ont depuis quelques années, développé des mécanismes de défense contre l'action des antibiotiques utilisés dans la pharmacopée. Il s'est alors avéré essentiel de trouver et d'identifier de nouvelles molécules antimicrobiennes possédant un mécanisme d'action différent de celui des antibiotiques classiques. Les peptides antimicrobiens possèdent un mécanisme d'action assez complexe. Celui-ci dépend de la structure du peptide et du type de la bactérie cible. Le caractère amphiphile de ces peptides permet leur intégration dans la membrane bactérienne. Le mécanisme d'action des peptides

antibactériens se fait en plusieurs étapes (Bowman et al., 1994; Oren and Shai, 1998; Cudi and Otvos, 2002) : la fixation initiale des peptides sur la membrane bactérienne, l'interaction des charges positives des peptides avec les charge négatives des phospholipides des membranes bactériennes et finalement l'intégration des peptides dans la membrane qui aboutisse à la mort cellulaire.

Dans ce contexte, le présent travail se focalise sur l'étude de l'activité antibactérienne de peptides déjà purifiés et identifiés à partir de l'hydrolysate enzymatique de muscle de barbeau. Le mécanisme d'action des peptides les plus actifs, contre *L. monocytogenes*, a été également étudié.

Les peptides utilisés au cours de ce travail ont été purifiés et identifiés au cours d'un travail précédent. Leurs séquences peptidiques sont : Ala-Ala-Ala-Leu; Ala-Ala-Gly-Gly-Val; Ala-Ala-Val-Lys-Met; Trp-His-Arg, Trp-His-Phe; Pro-Pro-Ser-Ser, Gly-Val-His, et Ala-Ser-Ser-Ser. Afin de bien étudier leurs activités antibactériennes et leurs modes d'action, ces peptides ont été synthétisés chimiquement. Un modèle mathématique (<http://pbil.ibcp.fr>) a été utilisé pour étudier la nature de ces peptides et leurs caractéristiques structurales : le nombre d'acides aminés, le pourcentage de résidus hydrophobes, la charge globale, et la structure secondaire. Tous les peptides actifs étudiés présentent les caractéristiques des peptides antibactériens. Ils contiennent un petit nombre de résidus d'acides aminés, ayant une partie importante de résidus hydrophobes et une structure linéaire.

L'activité antibactérienne des peptides a été évaluée, par la méthode de diffusion, vis-à-vis de six souches bactériennes : *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* (ATCC 43251), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Micrococcus luteus* (ATCC 4698), *Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Enterobacter sp.* La tétracycline a été utilisée comme antibiotique de contrôle. Pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI), l'activité antibactérienne 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 24 h à 37°C.

Les peptides synthétisés ont manifesté une activité antibactérienne contre les souches 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 après 24 heures d'incubation. Les valeurs de CMI obtenues pour les différents peptides synthétiques sont en accord avec ceux obtenus pour les mêmes peptides dérivés de l'hydrolyse enzymatique des protéines de barbeau. Parmi les peptides testés, trois sont les plus actifs à savoir : Ala-Ala-Gly-Gly-Val; Ala-Ala-Val-Lys-Met et Ala-Ala-Ala-Leu. Le peptide Ala-Ala-Gly-Gly-Val semble être le plus actif contre *S. aureus*, *E. coli* et *L. monocytogenes* (CMI de l'ordre de 0,37, 1,48 et 0,37 μM , respectivement). Les résultats obtenus avec les tests contre *B. cereus* et *M. luteus* étaient moins frappants. L'activité des peptides les plus actifs a été confirmée par le test de l'activité antibactérienne par culture en milieu liquide. Les résultats ont montré également que ces peptides ne possèdent pas d'activité hémolytique.

L'ion potassium (K^+) est un élément indispensable pour les fonctions biologiques des micro-organismes procaryotes et de toutes les cellules vivantes (Richey et al., 1987). Son transport du milieu intracellulaire au milieu extracellulaire est énergie dépendant et se fait via des pompes potassium qui se trouve 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 (Yeaman and Yount, 2003).

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 issus de l'hydrolyse enzymatique de muscle de barbeau. La bactérie utilisée pour ces fins est la *L. monocytogenes*. Ajoutés à une solution concentrée de la *L. monocytogenes* les peptides antibactériens 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 et le mode d'action du peptide ainsi que le nombre d'acides aminés.

L'évolution de la concentration du potassium extracellulaire dans une suspension bactérienne de *L. monocytogenes* incubée à 30°C, avec et sans glucose (5g/l), a été étudié afin de déterminer le rôle du glucose dans le transport inter-membranaire de cet ion. Les résultats ont montré 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 a passé ainsi de 72,2 à 30,5 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. Pour étudier l'effet des peptides antibactériens sur le transport inter-membranaire du potassium chez *L. monocytogenes*, les peptides antibactériens ont été injectés à 20 min dans la suspension bactérienne de *L. monocytogenes* incubée à 30 °C avec glucose (5g/l). La cinétique des mouvements de K^+ à travers la membrane cellulaire de *L. monocytogenes* a été suivi pendant 90 min. Ceci a permis de mettre en évidence le pouvoir perméabilisant ou non des peptides testés. Les résultats ont montré que l'addition des peptides engendre une sortie massive, immédiate et rapide des ions potassium intracellulaires pour les peptides Ala-Ala-Gly-Gly-Val et Ala-Ala-Val-Lys-Met alors que l'effet du peptide Ala-Ala-Ala-Leu est lent. Ceci a prouvé que les deux premiers peptides agissent aux niveaux membranaires par des phénomènes osmotiques rapides alors que le troisième peptide agit par l'inhibition de mécanismes intra-cytoplasmiques. Le peptide Ala-Ala-Gly-Gly-Val semble être le peptide qui perméabilise le plus la membrane cellulaire de *L. monocytogenes*.

**Antibacterial activity of new peptides from barbel protein hydrolysates
and mode of action via a membrane damage mechanism against
*Listeria monocytogenes***

**Assaâd Sila^{1,2,*}, Karima Hedhili², Rémi Przybylski², Semia Ellouz-Chaabouni¹,
Pascal Dhulster², Ali Bougatef¹ and Naima Nedjar-Arroume²**

¹ *Unité Enzymes et Bioconversion. Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, Université de Sfax, PB 1173, Sfax 3038, Tunisia.*

² *Institut Charles Viollette, équipe ProBioGEM, Polytech 'Lille, Boulevard Paul Langevin, 59655 VILLENEUVE D'ASCQ, France.*

* Corresponding author: Tel.: + 216 97 013 118; Fax: +216 74 275 595.

E-mail adresse: assaadsila@gmail.com

Abstract

There is great interest in the development of antimicrobial peptides as a potentially novel class of antimicrobial agents. In this study we evaluated the mode of action of new peptides (Gly-Val-His, Trp-His-Arg, Trp-His-Phe, Pro-Pro-Ser-Ser, Ala-Ala-Ala-Leu, Ala-Ala-Gly-Gly-Val, Ala-Ala-Val-Lys-Met, Ala-Ser-Ser-Ser), previously characterized, from barbel protein hydrolysates against *Listeria monocytogenes* via a membrane damage mechanism. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of these peptides towards six strains and their haemolytic activity towards bovine erythrocytes were determined.

Prediction of peptide secondary structure indicated that these peptides should have random coil structures and high content of hydrophobic amino acids. In addition, results of the determination of extracellular potassium, which is considered a good marker of membrane permeability, revealed that treatment with pure barbel peptides could cause morphological changes of *L. monocytogenes* and destruction of the cell integrity via irreversible membrane damage. The results could provide information for investigating the antibacterial model of antibacterial peptides derived from fish protein hydrolysates.

Keywords: Peptides; antibacterial activity; mode of action; membrane permeability; *Listeria monocytogenes*.

1. Introduction

The control of microbial pathogens in foods is a significant concern, and a broad spectrum of methods have been employed to prevent the growth of pathogenic bacteria in food including the use of synthetic and natural antimicrobial agents. Compounds including lactoferrin, lysozyme, bacteriocins, monolaurin, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and lactic acid have been evaluated resulting in varying degree of success in controlling bacteria in food (Panitee & Vanee, 2007).

Because of the extensive use of antibiotics, the frequent emergence of resistant bacteria has resulted in a significant threat to human health. Bacterial resistance is mainly caused by the mutation of one or more genes that are associated with detoxification of one or more toxins. Consequently, the mutated bacteria become resistant to conventional chemotherapeutic agents, and their survival is physically or genetically enhanced. Therefore, novel antimicrobial agents are urgently needed. Antimicrobial peptides (AMPs) constitute the first line of defense against the invading microorganism. To date, more than 1,600 cationic antimicrobial peptides have been purified from a wide range of organisms or chemically synthesized based on the sequence of purified peptides (Wang & Wang, 2004). Antimicrobial peptides are relatively small molecules that are less than 100 amino acids in length and have a broad spectrum of antimicrobial activity. They serve as an ancient defense mechanism against pathogenic microorganisms that easily come in contact with the host through the environment (Sugiarto & Yu, 2004). AMPs are now considered a fundamental component of the innate immune system (Radek & Gallo, 2007). Antimicrobial peptides have caught researchers' attention for their broad spectrum of applications, including their therapeutic potential. The AMPs are produced throughout the prokaryotic and eukaryotic kingdoms, from bacteria, fungi, plants, insects, invertebrates and mammals. Some are products of innate and adaptive immunity designed to protect the host from infection (Bulet, Hetru, Dimarcq, & Hoffmann, 1999; Ganz & Lehrer, 1998; Garcia-Olmedo, Molina, Alamillo, & Rodriguez-Palenzuela, 1998; Van't Hof, Veerman, Helmerhorst, & Amerongen, 2001).

Antimicrobial resistance currently represents one of the biggest challenges facing human health and the medical community. The misuse of antibiotics over the past decades has resulted in the emergence of several multi-drug resistant strains of microorganisms (Heymann, 2006). This problem has created an urgent need to develop novel classes of

antimicrobial agents with different modes of action than the conventionally, used antibiotics to control this problem (Paphitou, 2013; Rice, 2009).

Peptides are increasingly making their way into clinical applications. Natural therapeutic peptides are also known in present days for reduced health concerns (Sato, Viswanathan, Kent, & Wood, 2006). Unique intrinsic properties of bioactive peptides make them attractive therapeutic agents, as they show high biological activities associated with low toxicity and high specificity. Dietary proteins/peptides also possess specific biological properties, which make them potential ingredients in functional or health-promoting foods. Some of these antimicrobial peptides are not obtained by synthesis but by the proteolytic degradation of some proteins present within the organism.

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 haemoglobin (Yaba Adje, Balti, Kouach, Dhulster, Guillochon, & Nedjar-Arroume, 2011; Catiau, Traisnel, Delval-Dubois, Chihib, Guillochon, & Nedjar-Arroume, 2011; Daoud et al., 2005; Nedjar-Arroume et al., 2008). Antibacterial peptides derived from marine organisms by enzymatic treatment have been described (Beaulieua, Thibodeaua, Bonnet, Bryl, & Carbonneauc, 2013; Doyen, Saucier, Beaulieua, Pouliot, & Bazinet, 2012).

The purpose of the present study was to investigate the antibacterial activity and mode of action of eight peptide sequences from barbel muscle protein hydrolysates, previously characterized as antibacterial peptides. 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. Barbel protein hydrolysate, was obtained by using added enzyme (Alcalase[®]) under controlled digestion. The amino acid sequences of these antibacterial peptides were identified as Gly-Val-His, Trp-His-Arg, Trp-His-Phe, Pro-Pro-Ser-Ser, Ala-Ala-Ala-Leu, Ala-Ala-Gly-Gly-Val, Ala-Ala-Val-Lys-Met, Ala-Ser-Ser-Ser (Sila et al. 2014).

2. Materials and methods

2.1. Materials

Common chemicals and solvents of analytical grade were obtained from different commercial sources. Acetonitrile was of HPLC grade. Water was obtained from a Millipore MilliQ system; the resistance was about 18 MΩ. All aqueous HPLC eluents were bubbled with Waters In Line Degasser.

2.2. Peptide preparation by Fmoc/tert-butyl solid phase peptide synthesis

Each peptide was synthesized on a Fmoc-Arg(Pbf)-WangTentagel[®] S resin (0.25 mmol/g from Iris Biotech, 50 μ mol scale) using an Intavis peptide synthesizer (Proteigene) and standard Fmoc/tert-butyl solid phase peptide synthesis procedures (Fields & Noble, 1990). Activation of the amino acids (10 eq) was performed separately prior to the coupling step using a mixture of TBTU/HOBt/DIEA: 10 eq/10 eq/30 eq in DMF. A capping step was performed after each coupling with a mixture of acetic anhydride/N-methylmorpholine/dimethylformamide (Ac₂O/NMM/DMF): (5:10:75, v/v/v). At the end of the synthesis, the Fmoc protecting group was removed using 20% piperidine in DMF. The resin was washed with DMF (4 \times 2 min) and CH₂Cl₂ (4 \times 2 min) and dried in vacuo. Deprotection and cleavage of the peptide from the resin was performed with a mixture of TFA/TIS/H₂O: at room temperature for 1 h. The mixture was precipitated in cold diethyl ether. The peptide was collected by centrifugation, dissolved in deionized water and lyophilized. The peptides were purified by RP-HPLC.

2.3. Bacteria and antibacterial assays

The antibacterial activity was determined by the method of Parish et al. (2001). Six 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), *Micrococcus luteus* (ATCC 4698), *Escherichia coli* (ATCC 25922) 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 eighteen hours 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 26800 g 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 10⁷ 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 10⁷ 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 μ l) to wells punched in the agarose layer allowed to diffuse in the layer and incubated in a

humidified close container during 3 hours 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 hours at 30 °C.

The antibacterial activity was measured as the diameter of the clear zone of growth inhibition compared with a positive control, tetracycline, and a negative control, sodium phosphate buffer in Petri plates.

2.4. Minimum Inhibitory Concentration

The minimum inhibitory concentration (MIC) of the peptide was determinate by liquid growth inhibition assay in a microtiter plate assay system (Froidevaux et al., 2001). MIC is the lowest concentration of the peptide that completely inhibited the strain growth after 24 h of incubation. Cell suspension (100 µl) was distributed in a microtiter plate well and

100 µl of the peptide were added. Cells were enumerated on Nutrient Agar medium before and after 24 h of incubation at 37 °C.

2.5. Preparation of late exponential-phase cell suspensions

The preculture of *Listeria monocytogenes* was prepared by inoculating 10 ml of medium brain heart broth (BHB) with 100 µl of a suspension of 10⁶ CFU / ml. After 24 hours of incubation at 37 °C the cells concentration was around 10⁹ CFU / ml. Isolation was done in parallel to ensure the purity of the strain. Cultures were prepared by inoculating 500 ml of preculture in 500 ml of sterile BHB. Then, the cultures were incubated at 30 °C for 24 hours. After incubation, the culture was centrifuged for 15 min at 26800 g at 4 °C (Beckman J2-21M centrifuge) in order is to concentrate bacterial cells. The pellets were resuspended in 100 ml of 30 mM PIPES buffer [Piperazine Sodium-N-N'-bis (ethane sulfonate)] at pH 6.5. After a second identical centrifugation, the pellet was resuspended in 50 ml of 30 mM PIPES buffer, pH 6.5. 1 ml of a KCl concentration 5g/l prepared in PIPES buffer pH 6.5 was added to the cell suspension solution. The cell suspension was divided into two equal volumes in two bottles butyl stoppers. A control flask was used with no added glucose. In the second flask, 1 ml of a solution of glucose concentration 5g/l (PIPES buffer pH 6.5) was added after five minutes of incubation at 30 °C to increase the ATP available. Then after 20 min incubation at the same temperature, 1.5 ml of the peptide preparation were tested (at t = 20 min). The addition of glucose or peptide to the cell suspension was carried out by injection through the central butyl

stoppers. To monitor the concentration of ions (K^+) in the solution, the time samples were taken from each flask after 0; 2.5; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 45; 55 and 65 minutes. The samples were filtered at 0.45 microns. Each 500 μ l sample was added to 4.5 ml of sulfuric acid with 1M/CICs 1.1 g/l.

2.6. Potassium concentration determination

Potassium concentration in late exponential-phase cell suspensions was determined by flame atomic absorption spectroscopy according to Schonheit and Perski (1983).

The determination of concentrations of potassium ion was performed by atomic absorption spectrophotometer, Nova AA300 (Analytical Jena, Germany). The absorbance of samples was measured at a wavelength $\lambda = 766.5$ nm. The analysis is based on the absorption of photons by atoms in the ground state, and liquid solution is used generally for this purpose. Then, the solution was sprayed in a flame resulting from the combustion of a mixture of air (40 ml/min) and acetylene (C_2H_2) (20 ml/min). Its temperature was about 2300 °C where it was converted into atomic vapor. The vapors are sent on a characteristic of the radiation dose to which carbon is produced by the source in a hollow cathode lamp containing the element to be assayed. Atoms not excited by the path of the light absorb radiation.

Starting from the equation of the line obtained after plotting the calibration curve, we can determine the concentration of potassium containing the test solution, this technique is simple, quantitative, highly selective and relative, and a curve calibration must be used.

2.7. Antibacterial activity in liquid medium

The antibacterial activity was determined as described by Hammami et al. (2009). Antibacterial activities of pure peptides in liquid medium were tested against *L. monocytogenes*. The strain was inoculated in Mueller–Hinton broth medium. The preculture was performed on a rotary shaker for 24 h (200 rpm) at 37 °C, in 250 ml Erlenmeyer flasks with a working volume of 25 ml. After incubation the cells concentration was around 10^6 CFU / ml. Cultures were prepared by inoculating 1 ml of preculture in 25 ml of sterile Mueller–Hinton broth. Then 1 ml of pure peptides were added and incubated at 4 °C for 1 hour. A control flask was used without peptides. After incubation at 4 °C the Erlenmeyer flasks were then incubated at 37 °C (200 rpm) for 10 h. The CFU were counted every 60 min.

2.8. Haemolytic activity

The hemolytic activity of the active peptide was determined by methods of Dathe et al. (1996), slightly modified. Five milliliters of bovine blood was centrifuged at 3290 g 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 μ l) along with varying amounts of sub-fractions stock solution and the buffer were pipetted into Eppendorf tubes to give a final volume of 50 μ l. The Eppendorf tubes with 2.5×10^8 cells/ml were then incubated at 37 °C during 40 min. After centrifugation (6720 g, 5 min), 30 μ l of supernatant was diluted in 500 μ L 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. The test was carried out in triplicate.

2.9. 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. Antibacterial activity

We recently isolated ten new antibacterial peptides from the barbel muscle proteins and their molecular masses and amino acids sequences were determined using ESI-MS and ESI-MS/MS, respectively (Sila et al., 2014). However, the mode of action of these peptides has not yet been investigated.

The antibacterial activity of each pure peptide was tested towards six strains: two Gram-negative (*E. coli*, *E. sp*) and four Gram-positive (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *M. luteus* and *B. cereus*). The antibacterial activity of each peptide was carried out according to the double-layer technique. After 24 h incubation of the bacterial strains with the peptide, the antimicrobial activity of the peptide was detected by the appearance of a zone of growth inhibition around the well containing the strain and the peptide. The validation of the test was carried out in triplicate and by the use of blanks: an antibiotic, tetracycline at a concentration of 0.1 mg/ml. Seven peptides showed an antibacterial activity against these bacterial species (Table 1). However, no antibacterial activity was detected with **Gly-**

Val-His peptide. Among these active peptides, three are the most active (**Ala-Ala-Gly-Gly-Val**; **Ala-Ala-Val-Lys-Met** and **Ala-Ala-Ala-Leu**).

Searching for these sequences in the Antimicrobial Peptide Database (APD, <http://aps.unmc.edu/AP/main.html>) revealed that they were a novel AMP. The structural characteristics of these peptides were studied (Table 2) using the Network protein sequence analysis software, in order to find out the link between the activity of the peptide, its mechanism of action and its structural properties. All of these peptides are small and have a substantial portion of hydrophobic residues. Also all peptides present a random coil structure. This was deduced by a mathematical model of the Network Protein Sequence analysis Internet server of the Pole Bio-informatique Lyonnais (<http://pbil.ibcp.fr>).

Surprisingly, these results show that peptides which are shorter than other antibacterial peptides are active. These peptides do not have the classical characteristics of antibacterial peptides.

Based on their side-chain arrangement and structural motif features, AMPs display potent antimicrobial activity and specificity to the microbial target. AMPs can be further categorized based on their amino acid content and proportion, e.g., some have a high content of one or two amino acids such as proline (Otvos 2002), arginine (Chan et al. 2006; Dong et al. 2012) and/or glycine (Ilic' et al. 2013).

Barbel peptides are different from the classical antibacterial peptides. They are small (3 and 5 AA), with different portion of hydrophobic residues, and a random coil structure. These active peptides probably have a mechanism of action different from that generally described for antibacterial peptides: the hydrophobic part insertion generally structured in the membrane which involves pore formation.

Song, Wei, Luo, and Wang (2012) reported the isolation and identification from the pepsin hydrolysate of half-Fin anchovy (*Setipinna taty*) of five cationic peptides (MLTTPPHAKYVLQW, SHAATKAPPKNGNY, PTAGVANALQHA, QLGTHSAQPVPF and VNVDERWRKL) and three anionic peptides (LATVSVGAVELCY, NPEFLASGDHLDNLQ and PEVVYECLHW). In the same contest Tang, Zhang, Wang, Qian, and Qi (2015) reported the purification of antimicrobial peptide (GLSRLFTALK) from anchovy cooking wastewater. These peptides are shorter than those described in this study.

Generally, antibacterial peptides with a random coil structure and which are positively charged can be structured in aqueous solution when they are in contact with biological membrane (Powers & Hancock, 2003).

In this study, we demonstrated that berbel peptides possessed antimicrobial activities against spoilage and pathogenic microorganisms pertinent to food. The new peptides with efficient and safe features could be a good possible candidate for food preservation.

3.2. MIC determination of antibacterial peptides

The MIC is the lowest concentration of the peptide that completely inhibited the strain growth after 24 h of incubation (Table 3). At a concentration corresponding to the MIC, all peptides, (except: **Gly-Val-His**), decreased cell population after 24 h of incubation, regardless of bacterial species. The MIC for each peptide was determined on *E. coli*, *E. sp*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *M. luteus* and *B. cereus*. According to the MIC value, the identified peptides inhibit the growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria in micromolar concentrations. The eight new antimicrobials peptides (except: **Gly-Val-His**), show a significant antimicrobial activity with a low MIC. Among the seven antimicrobials peptides, peptide **Ala-Ala-Gly-Gly-Val** was the most antibacterial active against *S. aureus*, *E. coli* and *L. monocytogenes*. The minimum inhibitory concentrations of this peptide against these bacterial species were 0.37, 1.48 and 0.37 μM , respectively.

Based on the evaluation the diameter of the clear zone of growth inhibition (Table 1) and the determination of minimum inhibitory concentrations values (Table 3), the most active peptides were: **Ala-Ala-Gly-Gly-Val**; **Ala-Ala-Val-Lys-Met**; **Ala-Ser-Ser-Ser**; and **Ala-Ala-Ala-Leu**.

3.3. Membrane depolarization involving K^+ release: Effect of antimicrobials peptides on *Listeria monocytogenes* permeability

The classic action mechanism of AMPs involves their ability to cause cell membrane damage. AMPs can interact with microorganisms by electrostatic forces between their positive amino acid residues and negative charges exposed on cell surfaces. It has been suggested that the composition of cell surface drives the specificity of AMPs. In this sense, the sensitivity of prokaryotic and eukaryotic cells is directly related to the different physico-chemical properties of the lipids found on both cell membranes (Dathe & Wieprecht, 1999; Matsuzaki, 1999).

Listeriosis is a foodborne illness caused by *Listeria monocytogenes*. Listeriosis is a sporadic disease but has the highest fatality rate of 20 - 30% and hospitalization

requirements of approximately 90% of foodborne illnesses (Murphy & Meullenet, 2006; Lou & Yousef, 1999). This bacterium causes two types of illness manifestations. One is non-invasive, which is commonly called listerial gastroenteritis, where symptoms range from nothing to fever, vomiting, and diarrhea in healthy adults (Lou & Yousef, 1999). Invasive listeriosis, the second and most serious form of the disease, affects infants, pregnant women including their fetuses, immunocompromised individuals, such as AIDS and cancer patients, children, and the elderly (Murphy & Meullenet, 2006; Lou & Yousef, 1999).

To investigate the ability of most active barbel peptides (**Ala-Ala-Ala-Leu**, **Ala-Ala-Gly-Gly-Val** and **Ala-Ala-Val-Lys-Met**) to change the membrane potential of intact *L. monocytogenes*, a membrane depolarization experiment was conducted. Monitoring the concentration of potassium ions in the supernatant of a concentrated cell suspension of *L. monocytogenes* in the presence or absence of glucose (5 g/l) at 30 °C was made. Figure 1 showed that the potassium concentration without sugar remained constant at around 72.2 ppm. The addition of glucose at 5 min to cell suspension induced depletion of the environment of K^+ . In the culture medium, the concentration of this ion decreased from 72.2 to 30.5 ppm. However, in the absence of glucose, the bacteria were unable to pump the extracellular K^+ (Figure 1). Glucose consumption allows cells' synthesis of ATP which causes the activation of the transport systems of K^+ . This showed that the potassium transport was energy dependent as shown for other bacteria like *Petinatus frisingensis* (Chihib, Crepin, Delattre, & Tholozan, 1999).

Antibacterial peptides tested in this study were added at 20 min of the kinetic monitoring of movements of K^+ across the cell membrane of *L. monocytogenes*. This helped to highlight the membrane permeabilizing power of tested peptides. Figure 2 showed that the addition of peptides resulted in a rapid and massive release of potassium ions through cellular membrane for all tested peptides except of **Ala-Ala-Ala-Leu**, which had a later action. The peptide

Ala-Ala-Gly-Gly-Val seemed to be the most permeabilizing peptide of the cell membrane of *L. monocytogenes*. The extracellular K^+ ion concentration increased by 33 ppm (when this peptide was added).

Measurement of the amount of extracellular K^+ confirmed that barbel peptides caused an imbalance of K^+ movement, leading to significant K^+ release through cellular membrane. The sustained release of K^+ triggers membrane depolarization. Therefore, these

results confirm that barbel peptides exert antibacterial activity via membrane active mechanisms. Peptides (**Ala-Ala-Ala-Leu**, **Ala-Ala-Gly-Gly-Val** and **Ala-Ala-Val-Lys-Met**) presented the strongest inhibitor activity towards *L. monocytogenes* with complete inhibition of bacterial growth.

The results showed also the release of a quantity of potassium with a relatively low speed and a trend of decrease over time for the peptide **Ala-Ala-Ala-Leu**. We can suppose that the peptide had not a fatal and permanent effect on the bacteria but only a temporary one. Perhaps the peptide did not penetrate into the membrane, therefore there was no pore formation, but it adhered to the surface causing a stress effect that disrupted the biological functions of bacteria including membrane transfers.

The antibacterial activity was confirmed in liquid medium by adding peptides to *L. monocytogenes* culture medium. As shown in Figure 3, pure peptide affects in a higher extent the antibacterial activity on *L. monocytogenes*, showing significant differences with respect to the control (without peptides). The inhibitory effect, against *L. monocytogenes*, displayed by peptide **Ala-Ala-Gly-Gly-Val** was significantly ($P < 0.05$) higher than those exhibited by the peptide **Ala-Ala-Val-Lys-Met** and by the peptide **Ala-Ala-Ala-Leu**.

We then analyzed the killing activities of the peptides after 10 h of incubation with *L. monocytogenes* in liquid medium culture. **Ala-Ala-Gly-Gly-Val** and **Ala-Ala-Val-Lys-Met** induced a reduction in the number of viable cells at peptide concentrations of 10 µg/ml. In contrast, **Ala-Ala-Ala-Leu** exhibited a weak antibacterial activity in comparison with the control and both peptides.

These results confirm that **Ala-Ala-Gly-Gly-Val** and **Ala-Ala-Val-Lys-Met** are able to display antibacterial activity at liquid culture medium. One explanation for the reduced efficacy of **Ala-Ala-Ala-Leu** compared with **Ala-Ala-Gly-Gly-Val** and **Ala-Ala-Val-Lys-Met** is that it is due to their amino acid content and proportion. Alternatively, liquid medium components can bind to the surfaces of *Listeria* cells and make it more difficult for the peptide to reach and permeate the target microbial membrane. Interestingly, both peptides (**Ala-Ala-Gly-Gly-Val** and **Ala-Ala-Val-Lys-Met**) gave rise to a significant reduction in the number of living bacteria.

3.4. Haemolytic activity of antibacterial peptides

Haemolysis of erythrocytes was measured to assess the cytotoxicity of peptides against normal mammalian cells. Barbel peptides did not cause haemolysis. The

haemolytic activity of most active peptides was tested on bovine erythrocytes. Several concentrations for each peptide were tested (Ala-Ala-Ala-Leu (1.6-16 μ M); Ala-Ala-Gly-Gly-Val (0.37-10 μ M); Ala-Ala-Val-Lys-Met (0.25-14 μ M)). For each peptide, the highest concentration tested corresponded to five times the highest MIC values obtained for these peptides (Table 3). For all peptides, no haemolysis was observed up to a peptide concentration corresponding to five times the MIC. 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 peptides from barbel protein hydrolysates (Gly-Val-His, Trp-His-Arg, Trp-His-Phe, Pro-Pro-Ser-Ser, Ala-Ala-Ala-Leu, Ala-Ala-Gly-Gly-Val, Ala-Ala-Val-Lys-Met, Ala-Ser-Ser-Ser) showed antibacterial activity against some bacterial species. The most active peptides showed promising antibacterial activity against the Gram-positive *Listeria monocytogenes* via a membrane damage mechanism. According to the results obtained, peptides substantially altered the integrity of membrane cells by causing K^+ ion release, which increase membrane permeability. In the context of food safety and food protection by the way of natural products, using antibacterial peptides from agricultural proteins could be of interest as a preservative for storage and distribution of food products.

Acknowledgement

This work was funded by the Ministry of Higher Education and Scientific Research, Tunisia and also by CMCU project (12G0915).

References

- Beaulieua, L., Thibodeaua, J., Bonnet, C., Bryl, P., & Carbonneauc, M. E. (2013). Detection of antibacterial activity in an enzymatic hydrolysate fraction obtained from processing of Atlantic rock crab (*Cancer irroratus*) by-products. *PharmaNutrition*, 1, 149–157.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L., & Hoffmann, D. (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology*, 23, 329–344.
- Catiau, L., Traisnel, J., Delval-Dubois, V., Chihib, N. E, Guillochon, D., & Nedjar-Arroume N. (2011). Minimal antimicrobial peptidic sequence from hemoglobin alpha-chain: KYR. *Peptides*, 32, 633–8.

- Chihib, N. E., Crepin T., Delattre G., & Tholozan, J. L. (1999). Involvement of cell envelope in nisin resistance of *Pectinatus frisingensis*, a Gram-negative, strictly anaerobic beer-spoilage bacterium naturally sensitive to nisin. *FEMS Microbiology Letters*, 177, 167-175.
- Daoud, R., Dubois, V., Bors-Dodita, L., Nedjar-Arroume, N., Krier, F., Chihib, N. E., Mary, P., Kouach, M., Briand, G., & Guillochon, D. (2005). New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin. *Peptides*, 26, 713–719.
- Dathe, M., Schumann, M., Wieprecht, T., Winkler, A., Beyermann, M., Krause, E., Matsuzaki, K., Murase, O., & Bienert M. (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.
- Dathe, M., & Wieprecht, T. (1999). Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462, 71–87.
- Dong, N., Ma, Q., Shan, A., Lv, Y., Hu, W., Gu, Y., & Li, Y. (2012). Strand length-dependent antimicrobial activity and membraneactive mechanism of arginine- and valine-rich β -hairpin-like antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56, 2994–3003.
- Doyen, A., Saucier, L., Beaulieu, L., Pouliot, Y., & Bazinet, L. (2012). Electro separation of an antibacterial peptide fraction from snow crab by-products hydrolysate by electro dialysis with ultrafiltration membranes. *Food Chemistry*, 132, 1177-1184.
- Fields, G. B., & Noble R. L. (1990). Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *International Journal of Peptide Research*, 35, 161-214.
- Froidevaux, R., Krier, F., Nedjar-Arroume, N., Vercaigne-Marko, D., Kosciarz, E., Ruckebusch, C., Dhulster, P., & Guillochon, D. (2001). *FEBS Letters*, 491, 159–163.
- Ganz, T., & Lehrer, R. I. (1998). Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol* 10(1):41–44.
- Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J. M., & Rodriguez-Palenzuela, P. (1998). Plant defense peptides. *Biopolymers*, 47, 479–491.
- Hammami, R., Zouhir, A., Hamida, J. B., Neffati, M., Vergoten, G., Naghmouchi, K., & Fliss, I. (2009). Antimicrobial properties of aqueous extracts from three medicinal

- plants growing wild in arid regions of Tunisia. *Pharmaceutical Biology*, 47, 452–457.
- Heymann, D.L. (2006). Resistance to anti-infective drugs and the threat to public health. *Cell*, 124, 671–675.
- Ilic', N., Novkovic', M., Guida, F., Xhindoli, D., Benincasa, M., Tossi, A., & Juretic', D. (2013). Selective antimicrobial activity and mode of action of adeptantins, glycine-rich peptide antibiotics based on anuran antimicrobial peptide sequences. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828, 1004–1012.
- Lou, Y., & Yousef A. H. (1999). Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors, p. 131–224. In E. T. Ryser and E. H. Marth (ed.), *Listeria, listeriosis, and food safety*, 2nd ed. Marcel Dekker Inc., New York.
- Matsuzaki, K. (1999). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462, 1–10.
- Murphy, R. Y., & Meullenet, J. F. (2006). Effect of steam pasteurization/vacuum packaging on physical properties, sensory attributes, chemical composition, and *Listeria monocytogenes* lethality of double-packed frankfurters. *Food Protection Trends*, 26, 481–490.
- Nedjar-Arroume, N., Dubois-Delval, V., Adje, E. Y., Krier, F., Mary, P., Kouach, M., Briand, G., & Guillochon, D. (2008). Bovine hemoglobin; an attractive source of antibacterial peptides. *Peptides*, 29, 969–77.
- Otvos, L. (2000). Antibacterial peptides isolated from insects. *Journal of Peptide Science*, 6, 497–511.
- Otvos, L. (2002). The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 1138–1150.
- Panitee, T., & Vanee, C. (2007). Antibacterial activities of thymol, eugenol and nisin against some food spoilage bacteria. *Natural Sciences*, 41, 319–323.
- Paphitou, N.I. (2013). Antimicrobial resistance: action to combat the rising microbial challenges. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42, S25–S28.
- Parish, C. A., Jiang, H., Tokiwa, Y., Berova, N., Nakanishi, K., Mc Cabe, D., Zuckerman, W., Xia, M. M., & Gabay, J. E. (2001). Broad-spectrum antimicrobial activity of hemoglobin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 9, 377–82.

- Pellegrini, A. (2003). Antimicrobial peptides from food protein. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1225-1238.
- Powers, J. P. S., & Hancock, R. E. W. (2003) The relationship between peptide structure and bacterial activity. *Peptides*, 24, 1681–91.
- Radek, K., & Gallo, R. (2007) Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system. *Seminars in Immunopathology*, 29, 27–43.
- Rice, L.B. (2009). The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 12, 476–481.
- Sato, A. K., Viswanathan, M., Kent, R. B., & Wood, C. R. (2006). Therapeutic peptides: Technological advances driving peptides into development. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 638–642.
- Schonheit, P., & Perski, H. J. (1983). ATP synthesis driven by a potassium diffusion potential in *Methanobacterium thermoautotrophicum* is stimulated by sodium. *FEMS Microbiology Letters*, 15, 69-74.
- Sila, A., Nedjar-Arroume, N., Hedhili, K., Chataigné, G., Balti, R., Nasri, M., Dhulster, P., & Bougatef, A. (2014). Antibacterial peptides from barbel muscle protein hydrolysates: Activity against some pathogenic bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 55, 183-188.
- Sugiarto, H., & Yu, P. L. (2004). Avian antimicrobial peptides: the defense role of beta-defensins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 323, 721–727.
- Tang, W., Zhang, H., Wang, L., Qian, H., & Qi, X. (2015). Targeted separation of antibacterial peptide from protein hydrolysate of anchovy cooking wastewater by equilibrium dialysis. *Food Chemistry*, 168, 15–123.
- Song, R., Wei, R.B., Luo, H.Y., & Wang, D.F. (2012). Isolation and characterization of an antibacterial peptide fraction from the pepsin hydrolysate of half-Fin anchovy (*Setipinna taty*). *Molecules*, 17, 2980-2991.
- Van't Hof, W., Veerman, E. C., Helmerhorst, E. J., & Amerongen, A. V. (2001). Antimicrobial peptides: properties and application. *Biological Chemistry*, 382, 597–619.
- Wang, Z., & Wang, G. (2004). APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Research*, 32, D590–D592.

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.

Table 1. Antibacterial activity of synthetic peptides (1mg/ml).

Inhibition zones: +++: > 1.5 cm; ++: 0.5-1.5 cm, + : <0.5 cm, and -: no activity

Peptides	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterobacter sp</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
Gly-Val-His	-	-	-	-	-	-
Trp-His-Arg	+++	-	-	-	-	++
Trp-His-Phe	++	-	-	-	+	+++
Pro-Pro-Ser-Ser	-	+	+	++	-	++
Ala-Ala-Ala-Leu	++	-	+	-	+	++
Ala-Ala-Gly-Gly-Val	+++	+++	++	++	+++	+++
Ala-Ala-Val-Lys-Met	++	++	+	+	+++	+++
Ala-Ser-Ser-Ser	+	-	++	+	+	++

Table 2. Structural characteristics of the pure antibacterial peptides.

Peptides	Masse (Da)	Percentage of hydrophobic amino acids (%) ^a	Prediction of secondary structure
Gly-Val-His	275	33	100% Random Coil
Trp-His-Arg	433	33	100% Random Coil
Trp-His-Phe	452	66	100% Random Coil
Pro-Pro-Ser-Ser	350	0	100% Random Coil
Ala-Ala-Ala-Leu	308	100	100% Random Coil
Ala-Ala-Gly-Gly-Val	337	100	100% Random Coil
Ala-Ala-Val-Lys-Met	482	80	100% Random Coil
Ala-Ser-Ser-Ser	314	25	100% Random Coil

The structural characteristics were obtained from the network protein sequence analysis internet server of the Pôle BioInformatique Lyonnais (<http://pbil.ibcp.fr>).

^aCalculated on the percentage of hydrophobic residues (Ile, Val, Leu, Phe, Cys, Met, Ala, Trp) in the peptide sequence.

Table 3. Minimum inhibitory concentration values (μM) of the synthetic antibacterial peptides.

Peptides	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterobacter sp</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
Gly-Val-His	-	-	-	-	-	-
Trp-His-Arg	0,57	-	-	-	-	0,57
Trp-His-Phe	1,0	-	-	-	2,0	0,27
Pro-Pro-Ser-Ser	-	2,8	2,8	1,49	-	2,8
Ala-Ala-Ala-Leu	1,6	-	3,2	-	3,2	1,6
Ala-Ala-Gly-Gly-Val	0,74	0,37	1,48	1,48	0,37	1,86
Ala-Ala-Val-Lys-Met	1,37	0,51	1,37	2,74	0,51	0,25
Ala-Ser-Ser-Ser	3,18	-	1,59	3,18	3,18	0,79

Fig. 1. Effect of glucose addition on intracellular potassium of cell suspensions of *L. monocytogenes*.

Fig. 2. Effect of barbel peptides addition on intracellular potassium of cell suspensions of *L. monocytogenes*.

Fig. 3. Determination of the antibacterial activity of barbel peptides. Activity against *L. monocytogenes* in liquid culture medium.

Fig. 1.

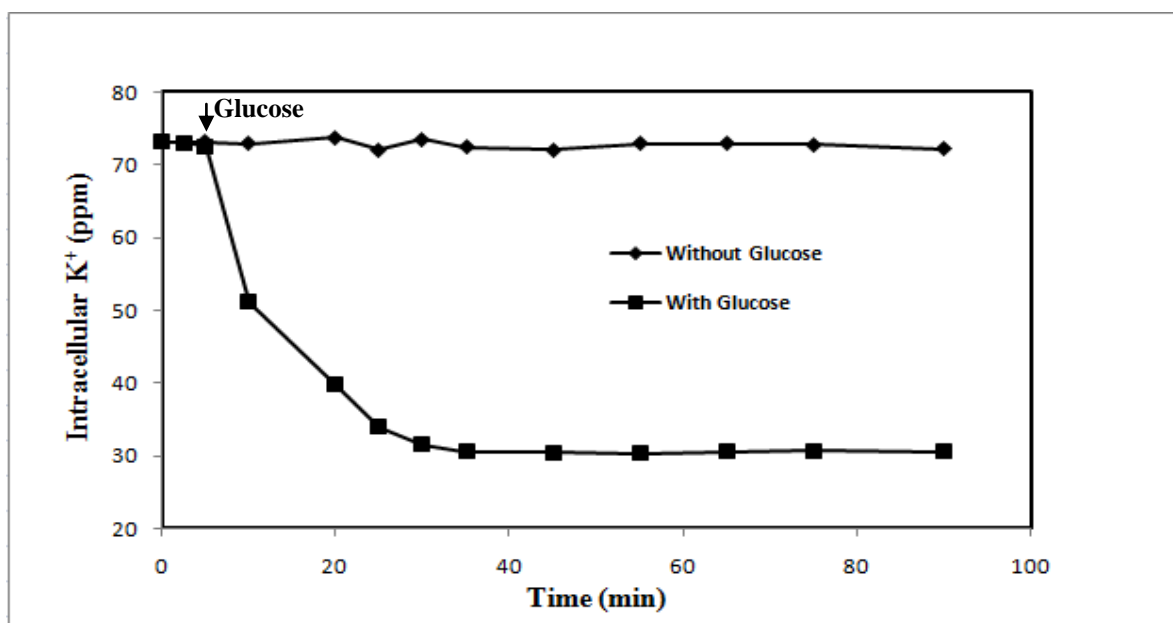


Fig. 2.

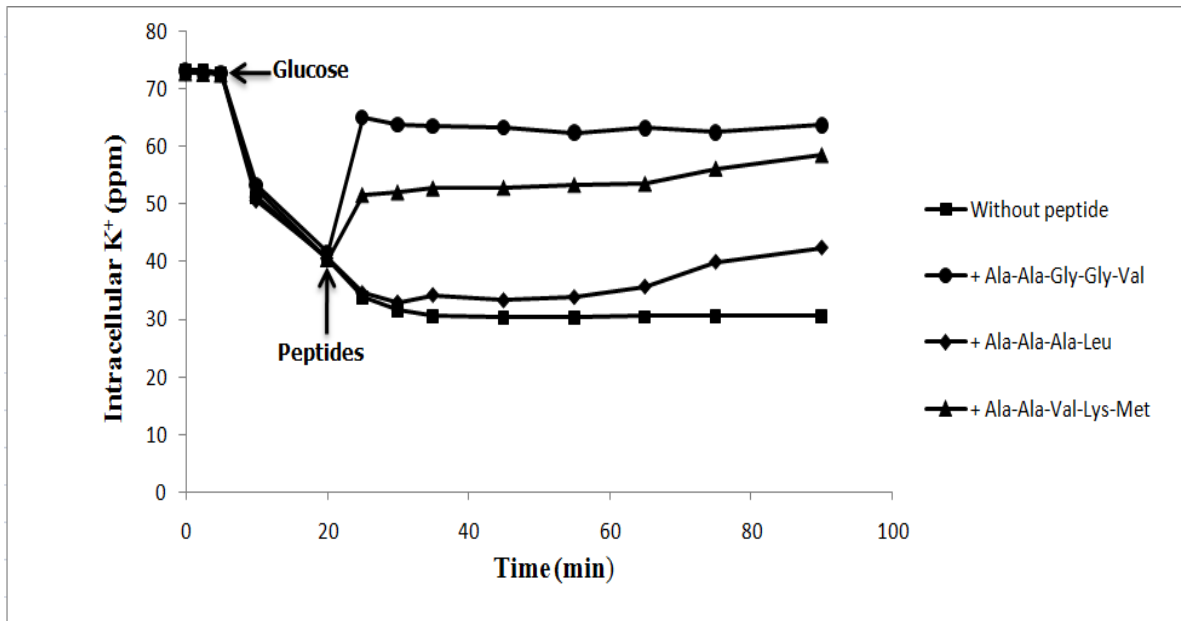
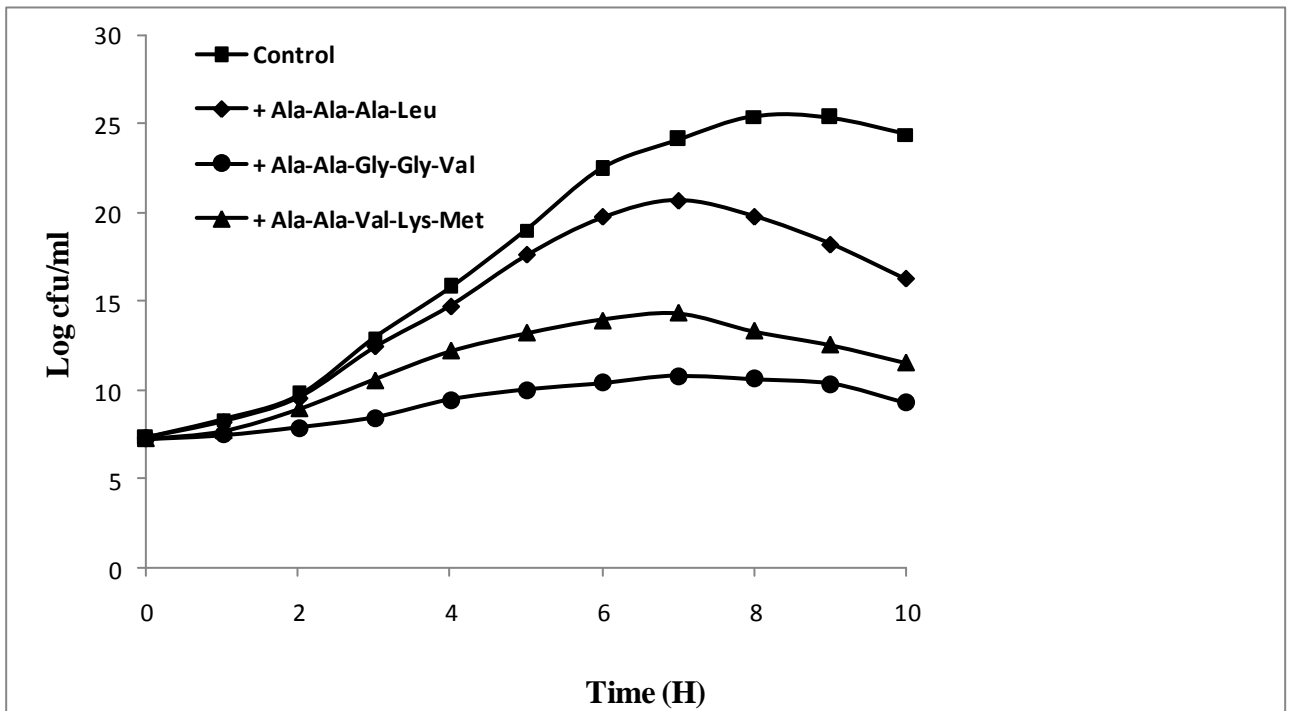


Fig. 3.



Article 7:

Assaâd Sila, Oscar Martinez-Alvarez, Anissa Haddar, Fakher Frikha, Pascal Dhulster, Naima Nedjar-Arroume, Ali Bougatef (2015).

Purification, identification and structural modelling of DPP-IV inhibiting peptides from Barbel proteins hydrolysate. **Journal of Functional Foods**. (Soumis). (IF : 4.48)

Purification, identification et étude de la relation structure-fonction des peptides anti-DPP-IV issus de l'hydrolyse enzymatique des protéines de muscle de barbeau

Assaâd Sila, Oscar Martinez Alvarez, Anissa Haddar, Fakher Frikha, Pascal Dhulster, Naima Nedjar-Arroume, Ali Bougatef

Le diabète est une maladie qui touche de plus en plus de personnes. La prévalence de cette maladie sur la population mondiale atteint actuellement 7% et pourrait facilement atteindre 10% dans les 10 prochaines années. Le diabète apparaît lorsque le pancréas produit trop peu ou pas du tout d'insuline ou bien lorsque le pancréas fournit de l'insuline mais que l'organisme y est devenu résistant. Depuis quelques années une nouvelle classe d'antidiabétiques est disponible reposant sur l'effet "incrétine" qui correspond à la stimulation de la sécrétion d'insuline par des hormones intestinales, hormones dont la sécrétion est stimulée par la prise alimentaire. Cette nouvelle voie thérapeutique semblerait une alternative avant le passage à l'injection de l'insuline. Le métabolisme des incrétines pourrait être augmenté dans le diabète de type 2. En effet, il a été prouvé que l'hyperglycémie augmentait l'activité de la dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) des cellules endothéliales *in vitro*. Les inhibiteurs de la DPP-IV ont pour rôle de bloquer l'action de la DPP-IV afin d'augmenter la concentration des incrétines (GLP-1 et GIP) à des niveaux restant physiologiques (Zambrowicz et al., 2013). Une nouvelle possibilité de traitement thérapeutique du diabète type 2 peut être donc utilisée, c'est l'inhibition de la DPP-IV afin d'augmenter la durée d'action des incrétines naturelles. Au cours des ces dernières années, plusieurs peptides possédants des activités anti-dipeptidyl-peptidase-IV (anti-DPP-IV) ont été mis en évidence, *in vitro*, dans des hydrolysats de protéines. Vu que les produits et les sous-produits de la pêche sont caractérisés par une teneur importante en protéines, ils peuvent donc être considérés comme étant une source potentielle, après hydrolyse enzymatique, de peptides bioactifs à usage nutraceutique et pharmaceutique. Dans ce contexte, le muscle de barbeau (*Barbus callensis*) a été utilisé comme source de protéines pour la préparation d'hydrolysat protéique douée d'activité anti-DPP-IV, et pour l'isolement et l'identification de peptides responsable de cette activité.

Au cours de ce travail, un hydrolysats protéique de muscle de barbeau enrichi en biopeptides a été préparé, par l'action de l'Alcalase[®]. La cinétique d'hydrolyse montre que le degré d'hydrolyse (DH) augmente en fonction du temps. D'autre part, il en ressort que cette cinétique est caractérisée par une phase initiale rapide durant les 60 premières minutes, durant laquelle un grand nombre de liaisons peptidiques est hydrolysé, après le DH tend à se stabiliser (DH=16,4). Cet hydrolysats présente une teneur en protéines élevée (81,43 %). L'étude de l'activité anti-DPP-IV, de l'hydrolysats enzymatique de muscle du barbeau, montre que cette activité est dose dépendante. La CI_{50} de l'hydrolysats brute est de l'ordre de 1,94 mg/ml.

L'hydrolysats protéique (DH = 16,4 %) a été fractionné sur une colonne de gel filtration Superdex peptide 3.2/30. Cinq pics majoritaires (F_I - F_V) ont été collectés et leurs activités anti-DPP-IV ont été déterminées *in vitro*. Toutes les fractions sont capables d'inhiber l'activité de la DPP-IV. La fraction F_V est la moins active avec une CI_{50} de l'ordre de 7,32 mg/ml alors que la fraction F_{III} a présenté le pouvoir d'inhibition le plus important avec une CI_{50} de l'ordre de 1,23 mg/ml. Cette fraction (F_{III}) a été retenue en vue d'isoler les peptides actifs. F_{III} a été soumise à un nouveau fractionnement par une chromatographie liquide haute performance sur colonne TRACER-Excel 1200 DS-A en phase inverse. Deux sous-fractions actives exerçant une activité anti-DPP-IV nommées (SF_3 et SF_4) ont été retenues pour l'identification. La sous-fraction SF_4 a présenté la meilleure activité inhibitrice de la DPP-IV ($CI_{50} = 0,21$ mg/ml). Cette sous-fraction a été soumise à un nouveau fractionnement par chromatographie liquide haute performance sur une colonne HALO Peptide. Le profil HPLC a montré la présence d'un seul pic majoritaire avec une CI_{50} de l'ordre de 96 μ g/ml. Ce pic a été retenu pour l'identification des peptides anti-DPP-IV.

Les masses moléculaires ainsi que les séquences des peptides purifiés ont été déterminées par spectrométrie de masse et par spectrométrie de masse en tandem. Deux peptides inhibiteurs de la DPP-IV ont été identifiés. Les séquences en acides aminés de ces nouveaux peptides sont : Trp-Ser-Gly (330 Da) et Phe-Ser-Asp (349 Da). Ces deux peptides n'ont pas manifesté d'activité hémolytique.

Les peptides, malgré qu'ils soient des molécules d'avenir pour le développement des biotechnologies sont à ce jour le parent pauvre au niveau des méthodes de modélisation disponibles. Pourtant, de plus en plus de sociétés pharmaceutiques tentent de contrecarrer

la pénurie relative en nouvelles molécules médicamenteuses en utilisant des peptides comme agents thérapeutiques, voire comme outils de conception de nouvelles petites molécules. Il s'agit donc d'un domaine qui mérite l'attention des chercheurs et en particulier des «modélisateurs». Si la fonctionnalité des peptides dépend évidemment de leur séquence et donc des fonctions chimiques qu'ils portent, elle est également grandement modulée par leur structure et donc par la manière dont ces fonctions sont orientées dans l'espace. A ce jour, pas mal de méthodes expérimentales de détermination de structures peptidiques existent.

Dans ce contexte, la suite du travail a porté sur la prédiction *in silico* de la structure des peptides anti-DPP-IV. On le sait, la fonction des peptides, comme celle des protéines, est intimement liée à leur structure. Plusieurs programmes de modélisation *in silico*, principalement des méthodes de docking pour la conception de petites molécules. Le programme utilisé au cours de cette étude est le "Molgrow virtual docker". Grâce aux résultats obtenus, nous avons pu mettre l'hypothèse que l'activité anti-DPP-IV est due essentiellement au peptide Trp-Ser-Gly qui présente plus d'affinité envers la DPP-IV que le peptide Phe-Ser-Asp.

Purification, identification and structural modelling of DPP-IV inhibiting peptides from Barbel proteins hydrolysate

**Assaad Sila^{a,b}, Oscar Martinez Alvarez^c, Anissa Haddar^a, Fakher Frikha^d,
Pascal Dhulster^b, Naima Nedjar-Arroume^b and Ali Bougatef^{a*}**

^a *Unité Enzyme et Bioconversion, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, B.P "1173" 3038 Sfax, Tunisia.*

^b *Institut Charles Viollette, équipe ProBioGEM, Polytech'Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.*

^c *Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Madrid, Spain.*

^d *Faculty of Science of Sfax, Route Soukra km 3.5, Sfax, Tunisia.*

*Corresponding author: Tel.: 216 74-274-088; fax: 216 74-275-595.

E-mail addresses: ali.bougatef79@gmail.com

Abstract

DPP-IV inhibitory peptides are gaining increasing attention particularly because the promising opportunities they offer for the enhancement of glycemic control in diabetic patients by preventing the rapid breakdown and, hence, prolonging the physiological action of incretin hormones. The present study aimed to investigate the DPP-IV-inhibitory activity of Barbel muscle protein hydrolysate (BMPH) that was enzymatically treated with Alcalase[®]. This hydrolysate was noted to exhibit excellent DPP-IV inhibitory activity, with an IC₅₀ value of 1.94 mg/ml. It was fractionated into five major fractions (F_I–F_V) by size exclusion chromatography using a Superdex peptide. The F_{III} fraction was noted to display the highest inhibitory activity, with an IC₅₀ value of 1.23 mg/ml, and was, therefore, further fractionated by RP-HPLC. Four major peptide sub-fractions (SF₁, SF₂, SF₃, SF₄ and SF₅) were selected. The results revealed that the SF₄ sub-fraction showed the highest DPP-IV inhibitory activity, with an IC₅₀ value of 0.21 mg/ml. This sub-fraction was submitted to RP-HPLC, ESI-MS, and ESI-MS/MS analyses. The findings indicated that SF₄ consisted of two peptides, namely PP1 and PP2, whose structures were identified as Trp-Ser-Gly (330 Da) and Phe-Ser-Asp (349 Da), respectively. This is the first report of these sequences from barbel proteins.

The two peptides were rationalized through docking simulations using Molgrow virtual docker. The modeling results with DPP-IV showed that the Trp-Ser-Gly peptide bound to DPP-IV with high affinity. Both peptides show no hemolytic activity towards bovine erythrocytes. Overall, the results suggested that BMPH can be considered as a promising natural source of DPP-IV inhibitory peptides.

Keywords: Barbel; Protein hydrolysates; degree of hydrolysis; anti-DPP-IV peptides; molecular docking.

1. Introduction

Diabetes mellitus is a serious metabolic disorder and a major health problem worldwide. Its prevalence is increasing in virtually all populations and age groups, and recent estimates indicate that the number of diabetic patients will rise to 333 million by 2025, with type 2 diabetes representing about 90-95% of the currently diagnosed cases (Pratley and Salsali 2007).

Recent reports indicate that about 50-60% of the total insulin secreted after a meal results from incretin response, mainly mediated by the combined effects of glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) (Creutzfeldt and Nauck 1992). These incretin molecules are secreted in response to the presence of nutrients in the intestinal lumen and act by stimulating glucose-dependent insulin secretion in the pancreatic β -cells (Mentlein 2005). Over 95% of GIP and GLP-1 are cleaved and, thereby, inactivated by the action of a specific serine protease, namely Dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV). In fact, DPP-IV is a pluripotent molecule that plays a several physiological function, such as a regulatory protease and as a binding protein. This molecule is widely distributed in various tissues in the human body where it plays multiple critical functions. It can, for instance, act as an adhesive molecule by binding non-substrate polypeptides, such as collagen (Loster et al. 1995) and fibronectin (Cheng et al. 1998). It can also serve as a receptor for another enzyme, such as adenosine deaminase-ADA (Torimoto et al. 1991), and act as a costimulatory molecule in transducing the signal via CD3 on T lymphocytes (Fleischer et al. 1994).

Due to its incretin hormone regulatory effects, DPP-IV has increasingly become a major target for the treatment of diabetes (McIntosh et al. 2005). Several DPP-IV inhibitors have recently emerged as a new class of oral agents for the treatment of type 2 diabetes. Animal experiments have demonstrated that specific DPP-IV inhibition increases the half-life of total circulating GLP-1, decreases plasma glucose, and improves impaired glucose tolerance (Mitani et al. 2002).

Furthermore, several studies have demonstrated that, in addition to their nutritional protein value, bioactive peptides play a wide range of biological activities, including opioid (Matinez-Alvarez 2013), antioxidant (Sila et al. 2014), antihypertensive (Bougatef et al. 2008) activities and may, therefore, serve as promising therapeutic agents in various body systems. Based on their of amino acid sequences, which are in the range of 2-20 amino acids (Meisel and FitzGerald 2003), these bioactive peptides can exhibit diverse activities

in the digestive, immune (such as antimicrobial and immunomodulatory), cardiovascular (such as antithrombotic and antihypertensive), and / or nervous (such as a sedative and analgesic effect) systems by inhibiting key risk factors (including enzyme, coenzyme, and substrates). Many of the known bioactive peptides are multifunctional and can exert several activities (Najafian, Leila., & Babji, 2014; Wang et al. 2014; Lee et al. 2014; Hong et al. 2014; Voa et al. 2013). In fact, and due to their health-enhancing potential and safety profiles, several bioactive peptides have been introduced as components in functional foods and nutraceuticals. Bioactive peptides with dipeptidyl-peptidase IV Inhibitory activity have, for instance, been reported for certain food proteins, such as whey (Nongonierma and FitzGerald 2003; Tulipano et al. 2011), sodium caseinate, skim milk powder, and milk protein concentrate hydrolysates (Lacroix and Li-Chan 2012a).

Although DPP-IV inhibitory peptides have been produced from enzymatic hydrolysates of various sources, little data is currently available on the isolation and identification of DPP-IV inhibitory peptides from marine organisms by enzymatic treatment. The few studies currently available on such peptides include those from salmon skin gelatin (Li-Chan et al. 2012) and tuna cooking juice (Huang et al. 2012) hydrolysates.

We have earlier reported the antioxidant (Sila et al. 2013), angiotensin I-converting enzyme inhibitory (Sila et al. 2013) and antibacterial (Sila et al. 2014b; 2014c) activities of hydrolysates from barbel muscle protein hydrolysates. Accordingly, the present study was undertaken to investigate the feasibility of producing DPP-IV inhibitory peptides from Barbel protein muscle hydrolysate (BMPH) following enzymatic treatment by Alcalase[®]. The DPP-IV-inhibitory activity of BMPH was evaluated, and the DPP-IV-inhibitory peptides were identified by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). The objective of this study was to purify and identify the peptides associated with the observed DPP-IV inhibitory activity. We assess also the effect structural of these peptides and provide new data on their functional effect.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents

Chemicals and solvents of analytical grade were obtained from different commercial sources. DPP-IV from porcine kidney (0.75 Unit) and its chromogenic substrate (H-Gly-Pro-AMC•HBr) were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Acetonitrile was of HPLC grade. Alcalase 2.4 L serine-protease from *Bacillus licheniformis* was supplied

by Novozymes (Bagsvaerd, Denmark). All other chemicals and reagents used were of analytical grade.

2.2. Materials

The barbel (*Barbus 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. Muscle was separated, rinsed three times with distilled water to remove salts and other contaminants, and then stored in sealed plastic bags at -20 °C until they were used for protein hydrolysates production.

2.3. Proteolytic enzymes

Alcalase[®] (Novozymes) was used for the production of hydrolysates. Protease activity was determined according to the method of Kembhavi et al. (1993) using casein as a substrate. One unit of protease activity was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 µg of tyrosine per minute under the experimental conditions used.

2.4. Preparation of barbel muscle protein hydrolysates (BMPHs)

Five hundred grams of Barbel muscle were firstly grinded in 500 ml distilled water by using a grinder (Moulinex[®] Charlotte HV3, France), and further cooked at 90 °C for 5 min to inactivate endogenous enzymes. The cooked sample was then homogenised for about 2 min using a Moulinex R62 homogenizer (Organotechnie, Courneuve, France). 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 for 4 h. During the reaction, the pH of the mixture was maintained at the desired value by continuous addition of NaOH (4 N). After the required digestion time, the reaction was stopped by heating the solutions for 15 min at 80 °C to inactivate enzyme. Protein hydrolysate were then centrifuged at 5000 g for 20 min, using a refrigerated centrifuge (Hettich Zentrifugen, ROTINA 380R, Germany), to separate soluble and insoluble fractions. Finally, the soluble fractions, referred to as protein hydrolysate, were freeze-dried at -50 °C and 121 mbar (CHRIST, ALPHA 1-2 LD plus, Germany) 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.

$$DH (\%) = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 = \frac{B \times Nb}{MP} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100$$

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:

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH-pK}}}{1+10^{\text{pH-pK}}}$$

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. Assessment of the DPP-IV inhibitory activity

The DPP-IV-inhibiting activity of the hydrolysates was measured according to a modified version of the method described by Tulipano et al. (2011). In brief, the assays were performed in 96-well plates where in 10 μ L of DPP-IV (0.014 mg/ml; 10.64 mUnits), which were previously diluted in 100 mM Tris HCl buffer, pH 8, were incubated in the absence or presence of different sample concentrations (final volume 300 μ L per well) at 37 °C for 15 min. Previously, the samples were lyophilized and further dissolved in 0.2 M Tris HCl buffer at pH 8.

The reaction was started by the addition of 100 μ L of assay buffer containing the fluorogenic substrate (H-Gly-Pro-AMC•HBr) at a final concentration of 25 μ M. The change in fluorescence at 355 nm/460 nm was monitored at 2-min intervals for 30 min using an Appliskan Multimode Microplate Reader (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). The recorded data were plotted versus time, and the inhibitory activity of the hydrolysates was quantified from the initial (maximal) slopes obtained in the absence or presence of the test sample at different concentrations. The IC₅₀ value, or concentration of samples needed to inhibit 50% of DPP-IV activity, was calculated using logarithmic regression.

2.7. Chemical Composition

The moisture and ash content were determined according to the AOAC standard methods as 930.15 and 942.05, respectively. Total nitrogen content was determined by

using the Dumas method, following AOAC992.15 in a LECO model FP-2000 protein/nitrogen analyser calibrated with EDTA. Crude fat was determined gravimetrically after Soxhlet extraction of dried samples with hexane. All measurements were performed in triplicate.

2.8. Amino Acid Analysis

Barbel muscle protein hydrolysates was dissolved (1 mg/ml) in ultrapure water and hydrolysed in vacuum-sealed glass tubes at 110 °C for 24 h, in presence of continuously boiling 6N HCl containing 0.1% phenol and norleucine (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) as internal standard. After hydrolysis, the sample was again vacuum-dried, dissolved in 0.2 M sodium citrate loading buffer (pH 2.2), and injected onto a Biochrom 20 amino acid analyser (Pharmacia, Barcelona, Spain).

2.9. Purification of DPP-IV inhibitory peptides

The freeze-dried hydrolysate (0.25 g) was suspended in 10 ml of distilled water and then loaded onto a gel filtration column, Superdex peptide 10/30, pre-equilibrated with ammonium acetate buffer (pH 5.0). Fractions (4.5 ml) were collected at a flow rate of 2.5 ml/min, and absorbance was measured at 215 nm to determine the elution profile of the sample.

The fractions that showed anti-DPP-IV activity were pooled and freeze-dried. The most active fraction was dissolved in distilled water, filtered through 0.22 µm filters, and then separated by RP-HPLC (Shimadzu LC-10ADVP, Japan) on a TRACER-Excel 1200 DS-A 5µm (25 x 0.78) column (Teknokroma, Barcelona, Spain). A linear gradient of acetonitrile in water (0–60% v/v, in 54 min) containing 0.01% TFA at a flow rate of 1.5 ml/min was maintained, and elution peaks were collected at 215 nm.

The fraction showing the highest DPP-IV inhibiting activity from the second chromatographic separation was analysed by using a HALO Peptide ES-C18 column (2.1 x 150 mm, 2.7 µm, Advanced Materials Technology, USA). A linear gradient of acetonitrile in water (0–60% v/v, in 55 min) containing 0.01% TFA at a flow rate of 0.4 ml/min was maintained, and elution peaks were collected at 215 nm.

2.10. Mass spectrometry analysis

The molecular mass and peptide sequencing were done on positive ion mode using electrospray ionisation-mass spectrometry (ESI-MS) and the tandem mass spectrometry (MS/MS). 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) continuously, 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, USA). The polypropylene glycol (PPG) was used for the calibration and the optimization of the machine. The peptide sequence was determined from the CID spectrum of the protonated analyse $[M+H]^+$ by MS/MS experiments. Peptide sequences were determined using the BioAnalyst software (Applied Biosystems, USA).

2.11. Hemolytic activity

The hemolytic activity of the active peptide fractions was determined according to Dathe et al. (1996) with slight modifications. Five milliliters of bovine blood (obtained from a slaughterhouse) were centrifuged at 3500 rpm for 10 min to isolate erythrocytes, which were then washed three times with 10mM 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 (250 µg/ml-1 mg/ml) 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 (6720 g, 5 min), 30 µl of supernatant were 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.

2.12. Software

The Molecular Operating Environment 2009.10 (MOE) software was used for modelling and structures visualization. The Visualization was performed with PyMol version 0.99beta06 (28). The figures were generated by PyMol program. The Molegro Virtual Docker v.6.0.0 software was used for docking substrates.

2.13. Docking

The 3-D coordinates of the porcine dipeptidyl peptidase IV in complex with the tripeptidetert-butyl-Gly-L-Pro-L-Ile (DPP-IV) (PDB code: 2AJBA) was extracted from the Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>). The 0QG (3-methyl-L-valyl-L-prolyl-L-isoleucine) and the BPR ((2R)-N-[(2R)-2-(Dihydroxyboryl)-1-L-Prolylpyrrolidin-2-YL]-N-[(5R)-5-(Dihydroxyboryl)-1-L-Prolylpyrrolidin-2-YL]-L-Prolinamide) ligand in complex with the DPP-IV (2AJB and 2AJD, respectively) were extracted from the Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>). The tripeptide Trp-Ser-Gly (PP1) and the tripeptide Phe-Ser-Asp (PP2) were modeled by using the Molecular Operating Environment 2009.10 program. The Molegro Virtual Docker v.6.0.0 software was used for docking substrates, PP1, PP2, 0QG or BPR to the DPP-IV protein. The potential binding sites (also referred to as cavities or active sites) were being identified using the built-in cavity detection algorithm, expanded Van der Waal with 0.3 Å grid resolutions and 1.2 Å Probe size. After preparation of the protein and the ligand, the docking was performed using MolDock Score function, MolDock SE search algorithm, 100 runs, energy minimization and optimize H-Bonds after docking, 15000 iterations and 7500 steps Simplex Evolution to generate the best 50 poses scores which were visually analyzed. Only the poses correctly bound to the active site with a high score was used. The protein-substrate complex was then subjected to molecular mechanics optimization using CHARMM27 force field until the gradient of 0.05 kcal/(Å.mol) was reached. The Score of the final protein-substrate complex was evaluated using the total interaction energy between the active site and the substrate.

2.14. Statistical analysis

Analytical values were determined by using three independent determinations. The values of the different parameters were expressed as the mean ($n = 3$).

All data were submitted to Analysis of Variance (ANOVA) and differences between means were evaluated by Duncan's Multiple Range Test. The data were analyzed 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. Preparation and characterization of barbel muscle protein hydrolysate (BMPH)

In the present work Alcalase[®] was used for the hydrolysis of barbel muscle proteins in order to obtain peptides with different amino acid sequences and peptide lengths. The specificity of the enzyme used for proteolysis, conditions of hydrolysis (time and

temperature), and enzyme/substrate ratio were noted to have significant effects on the molecular weight and amino acid composition of the protein hydrolysates and, hence, their biological activities (Van-der-Ven et al. 2002).

The extent of protein degradation by proteolytic enzymes was estimated by assessing the degree of hydrolysis (DH). The hydrolysis curve of barbel protein with Alcalase[®] after 4 h of incubation is shown in Fig. 1. The profiles illustrated in Fig. 1 show that the DH was 16.4%. The shape of hydrolysis curves was similar to those previously reported for other hydrolysates from shrimp byproducts (Sila et al. 2014a), Sardinelle (Bougatef et al. 2008), Atlantic salmon (Kristinsson and Rasco 2000), Silver carp (Dong et al. 2008), and barbel (Sila et al. 2013; 2014b).

The proximate composition of BMPH (Table 1) showed that it had high protein content ($81.43 \pm 0.73\%$), which could presumably be attributed to the solubilisation of protein during hydrolysis, removal of insoluble undigested non-protein substances, and partial removal of lipid after hydrolysis (Benjakul and Morrissey 1997). The lipid and moisture contents of the hydrolysate were $10.53 \pm 0.11\%$ and $2.21 \pm 0.09\%$, respectively.

The amino acid composition of BMPH is shown in Table 1. The findings revealed that BMPH contained glutamic acid/glutamine and alanine as the major amino acids, followed by aspartic acid/asparagines glycine, lysine, leucine, arginine and proline. The results obtained in terms of total amino acids and essential amino acids strongly suggest that BMPH could serve as a promising source for highly valued nutrients.

3.2. DPP-IV inhibiting activity of BMPH

The control of DPP-IV activity is an insulin regulatory strategy for the treatment of type II diabetes. To date, a number of peptidic components similar in structure (amino acids composition, length, charge,...) to the incretin hormones, GIP and GLP-1, have shown promising results as DPP-IV inhibitory components. Some of these components are food-protein-derived peptides (Boots 2006; Van-Amerongen and Beelen-Thomissen 2009; Tulipano et al. 2011; Uchida et al. 2011; Li-Chan et al. 2012; Nongonierma and FitzGerald 2013b; Uenishi et al. 2013). However, so far and to the authors' knowledge, little data is currently available in the literature on the inhibition of DPP-IV by fish-protein-derived hydrolysates. In this respect, the present study is the first to report on the isolation of DPP-IV inhibitory peptides from barbell fish byproducts.

The DPP-IV inhibitory activity of barbel muscle protein hydrolysate at different concentrations was studied (data not shown). The DPP-IV inhibitory activity of the barbel

protein hydrolysate increased with the increase in concentration. This hydrolysate was found to exhibit DPP-IV inhibitory activity with an IC_{50} value of 1.94 mg/ml. Lacroix and Li-Chan (2012b) reported an IC_{50} value of 0.075 mg/ml for a whey protein hydrolysate with pepsin for 60 min. In the same context Silvana et al. (2013) reported an IC_{50} value of 1.51 mg/ml for peptides generated by tryptic hydrolysis of a whey protein.

3.3. Isolation and purification of anti-DPP-IV peptides

To purify anti-DPP-IV peptides, the barbel protein hydrolysate treated with Alcalase[®] was fractionated by size exclusion chromatography on a Superdex peptide 10/30 column. As illustrated in Fig. 2A, five separate peaks, designated as F_I-F_V, were obtained. The fractions associated with each peak were collected separately and freeze-dried. Chromatographic separations were repeatedly performed to obtain a sufficient amount of purified peptide.

The results presented in in Fig. 2B indicate that all the fractions (at 1 mg/ml) displayed DPP-IV inhibitory activity. Among the five fractions collected, fraction F_{III} was noted to exhibit the highest inhibitory activity with an IC_{50} value of 1.23 mg/ml. The DPP-IV IC_{50} value obtained for barbel protein hydrolysate fraction in this study was similar (1.23 ± 0.08 mg/ml) to those values reported previously for *Palmaria palmata* (1.65 ± 0.12 mg/ml, Harnedy & FitzGerald, 2013a), lysozyme (0.4–1.5 mg/ml, Van Amerongen et al., 2009), casein (0.88–1.11 mg/ml, Nongonierma & FitzGerald, 2013a), whey (1.00–1.43 mg/ml, Nongonierma & FitzGerald, 2013a, 2013b) and lactoferrin (1.09 ± 0.11 mg/ml, Nongonierma & FitzGerald, 2013a) hydrolysates.

The peptides recorded by size exclusion chromatography for fraction F_{III}, were further separated by reverse phase-HPLC, TRACER-Excel 1200 DS-A 5 μ m column using a linear gradient of acetonitrile. The RP-HPLC profile revealed a large number of peaks, evidencing for the abundance of the peptides generated (Fig. 3A). Five major peptide sub-fractions (SF₁, SF₂, SF₃, SF₄ and SF₅) were selected. Those sub-fractions were collected separately through repeated chromatographic fractionation using an RP-HPLC column and freeze-dried. Their DPP-IV inhibitory activities were determined. Among the five sub-fractions, SF₄ was noted to show the highest DPP-IV inhibitory activity, with an IC_{50} value of 0.21 mg/ml, which was about 5 folds more powerful than SF₃ whose IC_{50} value was 1.09 mg/ml (Table 2). Accordingly, the SF₄ sub-fraction was submitted to further analysis by HPLC on a HALO Peptide ES-C18 column. The results presented in Fig. 3.B showed that one major peak (22 min) was identified. Fractions containing the main peak were

submitted to ESI-MS analysis. The lyophilized peak showed DPP-IV inhibitory activity, with an IC₅₀ value of 96 µg/ml.

3.4. Identification of anti-DPP-IV peptides

The peptides were analyzed by ESI-MS for molecular mass determination and ESI-MS/MS for the characterization of peptides. Two purified peptides were identified in sub-fraction SF₄, namely PP1 and PP2 whose structures were identified as Trp-Ser-Gly (330 Da) and Phe-Ser-Asp (349 Da), respectively (Fig.4). To our knowledge these sequences have not previously been mentioned in the literature. PP1 and PP2 are new peptides.

The results indicated that both peptides contained Ser as the second N-terminal residue and that the Ser residue was flanked by Trp; Gly and Phe; Asp. The peptides were also noted to consist mainly of hydrophobic amino acid residues, such as Trp, Gly, and Phe, and one peptide composed of a charged amino acid, Asp, as the C-terminal residue. In fact, most of the DPP-IV inhibitory peptides so far described in the literature contain between two to eight amino acid residues (Lacroix and Li-Chan 2012a).

Compared to the dipeptide, Trp-Val, Trp showed no DPP-IV inhibition when positioned at the C-terminus (Val-Trp, Ile-Trp, Arg-Trp, and Lys-Trp). In fact, another peptide with a Trp residue at the N terminus, Trp-Pro, was previously reported as a DPP-IV inhibitor (Lacroix and Li-Chan 2012a; Hatanaka et al. 2012). The inhibition of DPP-IV could correlate with the Trp positioned at the N-terminus of dipeptides.

Numerous peptide sequences having DPP-IV inhibitory properties have been reported in the literature. However, it is still not clear which structural/compositional parameters correlate with potent DPP-IV inhibitory properties. Peptide length does not appear to govern DPP-IV inhibition as large peptides have been shown to be DPP-IV inhibitors (Velarde-Salcedo et al., 2013). Amino acid composition is also not the primary component which would appear to govern DPP-IV inhibitory properties as demonstrated by the differences in activity between reverse and forward dipeptides (Hatanaka et al., 2012; Nongonierma & FitzGerald, 2013a). The DPP-IV inhibitory activity associated with Met-Ala-Gly-Val-Asp-His-Ile could potentially be due to the presence of an Ala residue, at the penultimate N-terminal position. This is one of the structural features which appear to influence DPP-IV inhibitory activity. Furthermore, the presence of hydrophobic amino acids, in this case Met, at the N-terminal position is believed to enhance DPP-IV substrate specificity (Power et al., 2014). Originally, DPP-IV was considered to have narrow substrate specificity and cleave specifically after a Pro or an Ala residue at the penultimate

(P1) position. However, studies have shown that DPP-IV also cleaves peptides with Hyp, Ser, Gly, Val, Thr, or Leu in this position (Lacroix & Li-Chan, 2012b; Power et al., 2014). Again further studies are required to determine the mode by which these peptides inhibit DPP-IV.

3.5. Molecular docking

While the structure–activity relationship of DPP-IV inhibitory peptides has not yet been fully elucidated, studies have shown that several structural features appear to influence their DPP-IV inhibitory activity (Boots, 2006; Lacroix & Li-Chan, 2012b; Nongonierma & FitzGerald, 2013c).

The analysis of the structures of the DPP-IV in complex with an analog substrate can help enhance the current understanding of the interaction modes of the substrate once embedded in the catalytic pocket. The data currently available on the relationship between the primary structure and DPP-IV inhibitor potency of food-protein-derived peptides is very limited. A more profound investigation of the peptide inhibitor binding mode to DPP-IV could, therefore, open new promising opportunities to fill part of this gap in knowledge. Accordingly, the PP1 (Trp-Ser-Gly), PP2 (Phe-Ser-Asp), 0QG (3-methyl-L-valyl-L-prolyl-L-isoleucine) and BPR ((2R)-N-[(2R)-2-(Dihydroxyboryl)-1-L-Prolylpyrrolidin-2-YL]-N-[(5R)-5-(Dihydroxyboryl)-1-L-Prolylpyrrolidin-2-YL]-L-Prolinamide) substrates were docked into the active site of the DPP-IV protein. The docking analysis was performed using the Molegro Virtual Docker v.6.0.0 software (Fig. 5). The results obtained for the protein-substrate complexes revealed 27 poses of PP1, 14 poses of PP2, 4 poses of 0QG, and 3 poses of BPR near the catalytic triad (Ser630, Glu708, and His740) of the DPP-IV active site, respectively.

Structure analysis of the protein-substrate complexes share that 6/27 poses (09,20,27,28,33 and 43) (PP1), 3/14 poses (08, 16 and 39) (PP2), 3/4 poses (06,07 and 47) (0QG) and 3/3 poses (07,17 and 47) (BPR) for PP1, PP2, 0QG and BPR respectively, where the ligand is correctly bind to the active site of DPP-IV. Higher the protein-ligand interaction energy, less stable the ligand in the protein structure. Based in the protein-ligand interaction energy, one pose has selected for each ligand (pose 28 for PP1, pose 08 for PP2) (the higher absolute protein-ligand interaction energy value). The total interaction energy (Table 3) between the protein and the target molecule (substrate) is -139.88 and -133.79 kJ/mol for PP1 and PP2, respectively.

The surface vdw area and the volume of the selected ligand were (341.273 Å², 286,987 Å³) and (344.559 Å², 302.416 Å³) for PP1 and PP2, respectively. In the case of the PP1, 16 amino acids (Lys122, Trp124, Arg125, Trp201, Glu205, Tyr547, Trp629, Ser630, Tyr631, Tyr662, Tyr666, Asp709, Asn710, Asp739, His740, Gly741) of the DPP-IV were close to the PP1. These 16 amino acids involve 11 HBonds with the ligand. In the case of the PP2, 13 amino acids (Arg125, Glu205, Glu206, Ser209, Phe357, Arg358, Tyr547, Trp629, Ser630, Tyr631, Tyr662, Tyr666, His740) of the DPP-IV were close to the PP2. These 13 amino acids involve 08 HBonds with the ligand.

According to table 4, the steric and the hydrogen bonds energy of PP1 in absolute value are greater than PP2. All these results are in line with the fact that the affinity of PP1 is higher than PP2 to DPP-IV.

3.6. Hemolytic activity of antibacterial peptides

To determine whether purified peptides might result in increased toxicity, the hemolytic activity of peptides was tested against bovine erythrocytes. No hemolytic activity was observed in the range of concentrations tested. Barbel peptides did not cause hemolysis. These results show that these peptides would be non-toxic even if used at high concentrations.

4. Conclusion

The present study reported on novel active peptides that were isolated from fish protein hydrolysate and noted to display DPP-IV inhibiting activity. The results from consecutive chromatographic analyses revealed that the structure of the active peptides, namely PP1 and PP2, were Trp-Ser-Gly (330 Da) and Phe-Ser-Asp (349 Da), respectively. The DPP-IV inhibition activity of PP1 may correlate with the Trp positioned at the N-terminus of the dipeptide. Both peptides did not show hemolytic activity towards bovine erythrocytes. Overall, the results suggest that barbel protein hydrolysates can be considered as a promising source of DPP-IV inhibitory peptides for use as natural food ingredients against type 2 diabetes. Further studies, some of which are currently underway in our laboratory, are, therefore, needed to further confirm *in vivo* the results obtained *in vitro* in this work and investigate the optimum conditions for the production of such promising marine-derived DPP-IV inhibitory peptides.

Acknowledgements

This work was funded by the “Ministry of Higher Education, Scientific Research and Information and Communication Technologies Tunisia”. The authors would like to express

their sincere gratitude to Mr. Anouar Smaoui and Mrs. Hanen Ben Salem from the English Language Unit at the Sfax Faculty of Science for their constructive proofreading and language polishing services.

References

- Adler-Nissen, J. (1986). A review of food hydrolysis specific area. In *Enzymatic hydrolysis of food proteins* (pp. 57-109). Copenhagen, Denmark: Elsevier Applied Science Publishers;
- Benjakul, S., & Morrissey, M. T. (1997). Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3423-3430.
- Boots, J. W. P. (2006). Protein hydrolysates enriched in peptides inhibiting DPP-IV and their use. *PCT Patent Application WO/2006/068480*.
- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Ravallec-Plé, R., Leroy, Y., Guillochon, D., Barkia, A., & Nasri, M. (2008). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases. *Food Chemistry*, 111, 350-356.
- Cheng, H. C., Abdel-Ghany, M., Elble, R. C., & Pauli, B. U. (1998). Lung endothelial dipeptidyl peptidase IV promotes adhesion and metastasis of rat breast cancer cells via tumour cell surface-associated fibronectin. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 24207-24215.
- Creutzfeldt, W., & Nauck, M. (1992). Gut hormones and diabetes mellitus, *Diabetes/Metabolism Reviews*, 8, 565-573.
- Dathe, M., Schumann, M., Wieprecht, T., Winkler, A., Beyermann, M., Krause, E., Matsuzaki, K., Murase, O., & Bienert, M. (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.
- Fleischer, B. (1994). CD26: A surface protease involved in T-cell activation. *Immunology Today*, 15, 180-184.
- Harnedy, P. A., & FitzGerald, R. J. (2013a). In vitro assessment of the cardioprotective, anti-diabetic and antioxidant potential of *Palmaria palmata* protein hydrolysates. *Journal of Applied Phycology*, 25, 1793–1803.

- Hatanaka, T., Inoue, Y., Arima, J., Kumagai, Y., Usuki, H., Kawakami, K., Kimura, M., & Mukaihara, T. (2012). Production of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from defatted rice bran. *Food Chemistry*, *34*, 797-802.
- Huang, S. L., Jao, C. L., Ho, K. P., & Hsu, K.C. (2012). Dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity of peptides derived from tuna cooking juice hydrolysates. *Peptides*, *35*, 114-121.
- Hong, J., Chen, T.T., Hu, P., Yang, J., & Wang S.Y. (2014). Purification and characterization of an antioxidant peptide (GSQ) from Chinese leek (*Allium tuberosum* Rottler) seeds. *Journal of Functional Foods*, *10*, 144–153.
- 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.
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmosalar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Process Biochemistry*, *36*, 131-139.
- Lacroix, I. M. E., & Li-Chan, E. C. Y. (2012a) Evaluation of the potential of dietary proteins as precursors of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitors by an in silico approach. *Journal of Functional Food*, *4*, 403-422.
- Lacroix, I. M. E., & Li-Chan, E. C. Y. (2012b). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dairy protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, *25*, 97-102.
- Li-Chan, E. C., Hunag, S. L., Jao, C. L., Ho, K. P., & Hsu, K. C. (2012). Peptides derived from atlantic salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 973-978.
- Lee, J.K., Jeon, J.K., & Byun, H.G. (2014). Antihypertensive effect of novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) skin in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Functional Foods*, *7*, 381 – 389.
- Loster, K., Zeilinger, K., Schuppan, D., & Reutter, W. (1995). The cysteine-rich region of dipeptidyl peptidase IV (CD26) is the collagen-binding site. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *217*, 341-348.
- Martinez-Alvarez, O. (2013). Hormone-like Peptides Obtained by Marine-protein Hydrolysis and Their Bioactivities. (pp. 351-367). In Editor John Wiley & Sons, Ltd. *Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications*.

- McIntosh, C., Demuth, H., Pospisilik, J. A., & Pederson, R. (2005). Dipeptidyl peptidase IV inhibitors: How do they work as new antidiabetic agents. *Regulatory peptide*, *128*, 159-165.
- Meisel, H., & FitzGerald, R. J. (2003). Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design*, *9*, 1289-95.
- Mentlein, R. (2005). Therapeutic assessment of glucagon-like peptide-1 agonists compared with dipeptidyl peptidase IV inhibitors as potential antidiabetic drugs. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *14*, 57-64.
- Mitani, H., Takimoto, M., E.Hughes, T., & Kimura, M. (2002). Dipeptidyl peptidase IV inhibition improves impaired glucose tolerance in high-fat diet-fed rats: study using a Fischer 344 rat substrain deficient in its enzyme activity. *The Japanese Journal of Pharmacology*, *88*, 442-450.
- Najafian, L., & Babji A.S. (2014). Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) sarcoplasmic protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, *9*, 280–289.
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2013a). Dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidative properties of milk protein-derived dipeptides and hydrolysates. *Peptides*, *39*, 57-163.
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2013b). Dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties of a whey protein hydrolysate: Influence of fractionation, stability to simulated gastrointestinal digestion and food-drug interaction. *International Dairy Journal*, *32*, 33-39.
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2013c). Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) by proline containing casein-derived peptides. *Journal of Functional Foods*, *5*, 1909-1917.
- Pratley, R. E., & Salsali, A. (2007). Inhibition of DPP-4: a new therapeutic approach for the treatment of type 2 diabetes. *Current Medical Research and Opinion*, *23*, 919-931.
- Power, O., Nongonierma, A. B., Jakeman, P., & FitzGerald, R. J. (2014). Food protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides for the management of type 2 diabetes. *Proceedings of the Nutrition Society*, *73*, 34–46.

- Sila, A., Haddar, A., Martinez-Alvarez, O., & Bougatef, A. (2013). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysate from muscle of barbel (*Barbus callensis*). *Journal of Chemistry*, Article No:545303.
- Sila, A., Sayari, N., Balti, R., Martinez-Alvarez, O., Nedjar-Arroume, N., Nasri, M., & Bougatef, A. (2014a). Biochemical and antioxidant properties of peptidic fraction of carotenoproteins generated from shrimp by-products by enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry*, *148*, 445-452.
- Sila, A., Nedjar-Arroume, N., Hedhili, K., Chataigné, G., Balti, R., Nasri, M., Dhulster, P., & Bougatef, A. (2014b). Antibacterial peptides from barbel muscle protein hydrolysates: Activity against some pathogenic bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, *55*, 183-188.
- Sila, A., Hedhili, K., Przybylski, R., Ellouz-Chaabouni, S., Dhulster, P., Bougatef A., & Nedjar-Arroume N. (2014c). Antibacterial activity of new peptides from barbel protein hydrolysates and mode of action via a membrane damage mechanism against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Functional Foods*. *11*, 322-329.
- Silveira, S.T., Martínez-Maqueda, D., Recio, I., & Hernández-Ledesma B. (2013). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides generated by tryptic hydrolysis of a whey protein concentrate rich in β -lactoglobulin. *Food Chemistry*, *141*, 1072-1077.
- Torimoto, Y., Dang, N. H., Vivier, E., Tanaka, T., Schlossman, S. F., & Morimoto, C. (1991). Coassociation of CD26 (Dipeptidyl peptidase IV) with CD45 on the surface of human T lymphocytes. *The Journal of Immunology*, *147*, 2514-2517.
- Tulipano, G., Sibilia, V., Caroli, A. M., & Cocchi, D. (2011). Whey proteins as source of dipeptidyl dipeptidase IV (dipeptidyl peptidase-4) inhibitors. *Peptides*, *32*, 835-838.
- Uchida, M., Ohshiba, Y., & Mogam, O. (2011). Novel dipeptidyl peptidase-4-inhibiting peptide derived from β -lactoglobulin. *Journal of Pharmacological Sciences*, *117*, 63-66
- Uenishi, H., Kabuki, T., Seto, Y., Serizawa, A., & Nakajima, H. (2012). Isolation and identification of casein-derived dipeptidyl-peptidase 4 (DPP-4)-inhibitory peptide LPQNIPPL from gouda-type cheese and its effect on plasma glucose in rats. *International Dairy Journal*, *22*, 24-30.

- Van-Amerongen, A., Beelen-Thomissen, M. J. C., Van-Zeeland-Wolbers, L. A. M., Van-Gilst, W. H., Buikema, J.H., & Nelissen, J. W. P. M. (2009). Egg protein hydrolysates. *PCT Patent Application* WO/2009/128713.
- Van-der-Ven, C., Gruppen, H., de Bont, D. B. A., & Voragen, A. G. J. (2002). Optimization of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology. *International Dairy Journal*, 12, 813-820.
- Velarde-Salcedo, A. J., Barrera-Pacheco, A., Lara-González, S., Montero-Morán, G. M., Díaz-Gois, A., González de Mejia, E., et al. (2013). In vitro inhibition of dipeptidyl npeptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) proteins. *Food Chemistry*, 136, 758–764.
- Voa, T.S., Ryub, B., & Kim, S.K. (2013). Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysate of the edible microalgal *Spirulina maxima*. *Journal of Functional Foods*, 5, 1336 – 1346.
- Wang, B., Gong, Y.D., Li, Z.R., Yu, D., Chi, C.F., & Ma, J.Y. (2014). Isolation and characterisation of five novel antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of spotless smooth hound (*Mustelus griseus*) muscle. *Journal of Functional Foods*, 6, 176 – 185.

Table 1. Chemical constituents of BMPH

Composition (%)	BMPH
Protein	81.43 ± 0.73
Fat	2.21 ± 0.09
Moisture	10.22 ± 0.27
Ash	10.53 ± 0.11
Aminoacids composition (Number of residues/1000)	
Asx ^a	101
Thr	47
Ser	57
Glx ^a	155
Gly	99
Ala	106
Cys	4
Val	40
Met	27
Ile	31
Leu	75
Tyr	19
Phe	30
OHlys	4
His	24
Lys	81
Arg	44
Pro	44
OHPPro	12

^a The aspartic and glutamic acid contents include, asparagine and glutamine, respectively.

Table 2. IC₅₀ values HPLC sub-fractions against DPP-IV activity

HPLC Sub-fractions	IC ₅₀ DPP-IV inhibition (mg/ml)
SF ₁	No activity
SF ₂	No activity
SF ₃	1.09
SF ₄	0.21
SF ₅	No activity

Table 3. Docking analysis for ligand lisinopril and pentapeptide using an automated docking software Molgro Virtual Dockerv.6.0.0.

Inhibitors	Interaction energy	Docking score
Trp-Ser-Gly	-139.88	-124.76
Phe-Ser-Asp	-133.79	-104.92
BPR	-59.87	-53.48
0QG	-105.73	-85.37

0QG: (3-methyl-L-valyl-L-prolyl-L-isoleucine)

BPR: ((2R)-N-[(2R)-2-(Dihydroxyboryl)-1-L-Prolylpyrrolidin-2-YL]-N-[(5R)-5-(Dihydroxyboryl)-1-L-Prolylpyrrolidin-2-YL]-L-Prolinamide)

Table 4. Calculated energy of the Protein-Ligand interactions, number of amino acids close to the ligand, number of hydrogen bonds involved, the surface and the volume of the ligand.

Descriptors	Trp-Ser-Gly	Phe-Ser-Asp	BPR	0QG
Docking Score	-124.76	-104.92	-53.48	-85.37
Protein-Ligand interactions	-139.887	-133.501	-59.87	-105.73
Steric (by PLP)	-124.005	-99.057	-51.138	-91.532
Hydrogen bonds	-17.017	-12.194	-8.739	-14.940
Electrostatic (short range)	2.789	-22.861	0	0
Electrostatic (long range)	-1.654	0.611	0	0.742
Number of amino acids	16	13	08	05
Number of Hydrogen bonds	11	08	08	06
Surface VDW area	341.273 Å ²	344.559 Å ²	237.877 Å ²	365.12 Å ²
Volume	286,987 Å ³	302.416 Å ³	186.778 Å ³	317.312 Å ³

Figure legends

Fig. 1. Hydrolysis curves of barbel muscle proteins treated with Alcalase[®].

Fig. 2. (A) Elution profile of BMPH separated by size exclusion chromatography on Superdex peptide 3.2/30 (upper panel) and IC₅₀(mg/ml) values of the separated fractions **(B)** (lower panel). Superdex peptide 10/30 column was pre-equilibrated with ammonium acetate buffer (pH 5.0). Fractions (4.5 ml) were collected at a flow rate of 2.5 ml/min, and the absorbance was measured at 215 nm to determine the elution profile of the sample.

Figure 1.

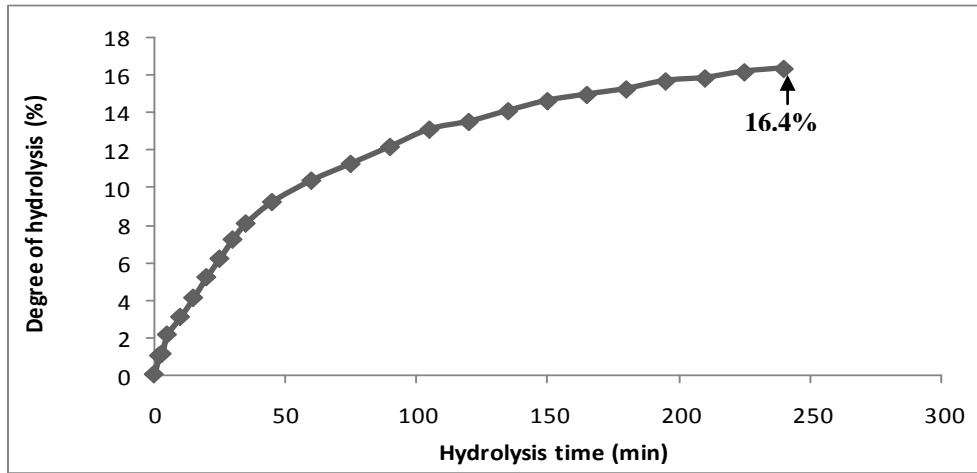
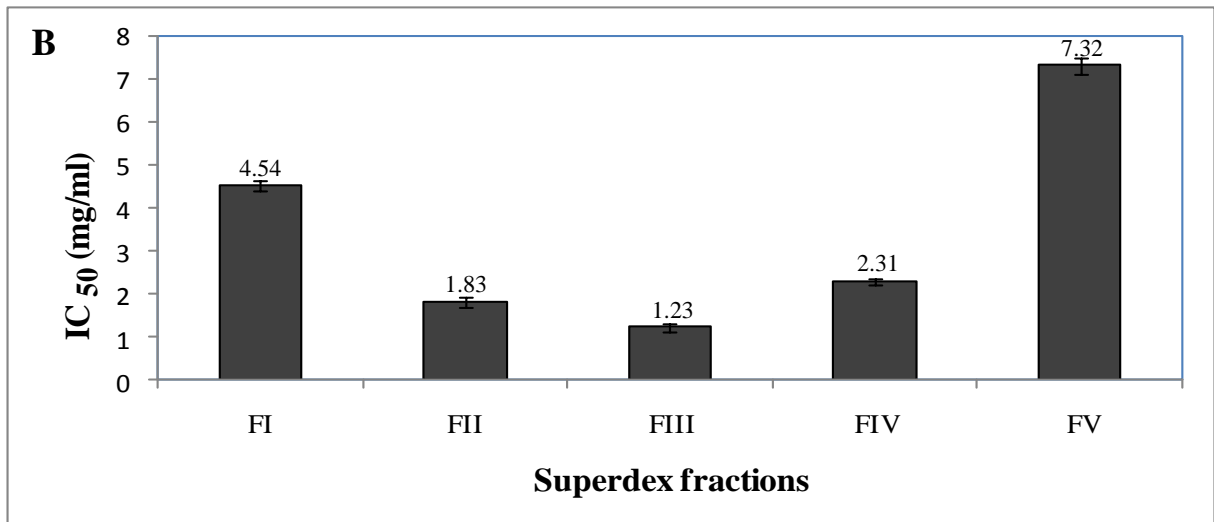
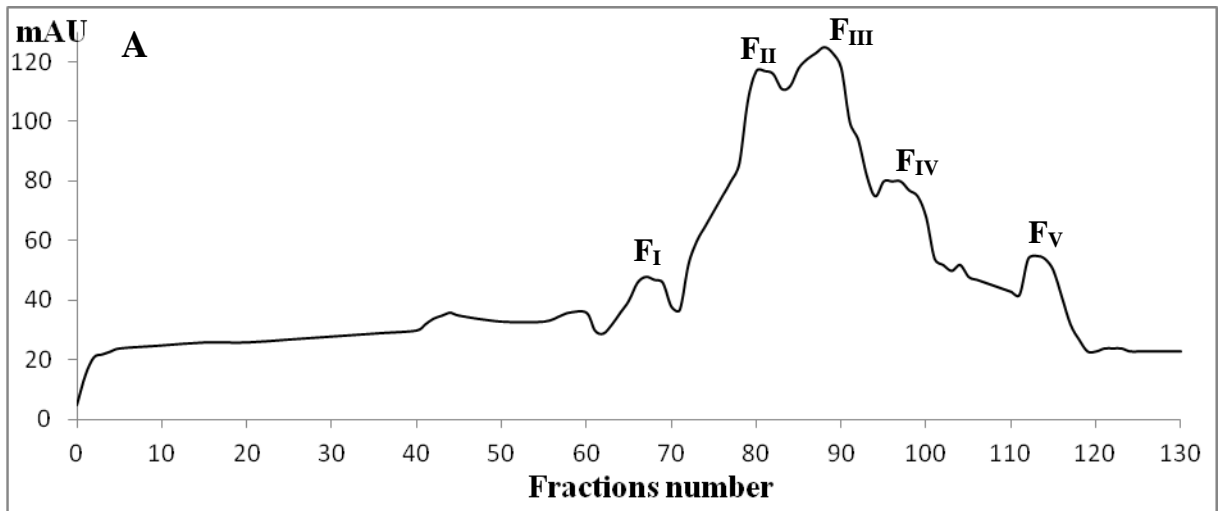


Figure 2



Conclusion & Perspectives

Les industries de la pêche et de l'aquaculture génèrent une quantité considérable de sous-produits au cours des opérations de transformation. Les coûts économiques et environnementaux qui en résultent sont élevés. Il convient de trouver de nouvelles utilisations pour ces biomasses. Notre étude s'inscrit dans le cadre générale de la valorisation biotechnologique des produits et sous-produits de la pêches on vu d'obtenir des composés à hautes valeurs ajoutées.

Dans la première partie, on s'est intéressé à la valorisation des sous-produits issus des industries de transformation des crevettes. L'extraction des caroténoïdes, par voie enzymatique, à partir des sous-produits de la crevette rose du large (*P. longirostris*) a été réalisée. Le meilleur rendement d'extraction a été obtenu en utilisant un niveau d'activité trypsique de l'ordre de 1 U/g pendant 1 h à 25 °C. La caractérisation physicochimique a montré que les caroténoïdes présentent une teneur en protéines élevée et des faibles taux en cendres et en chitine. Par la suite, l'astaxanthine a été récupéré à partir du complexe caroténoïdique suite à une hydrolyse enzymatique. L'analyse par HPLC a montré que l'hydrolysate obtenu par l'action de mélange de trypsine bovine et la trypsine de barbeau, présente la teneur en astaxanthine la plus importante (67 µg/g). Les analyses des teneurs en xanthophylles et en protéines solubles ont confirmé les résultats obtenus lors de l'analyse par HPLC. En effet, l'hydrolysate obtenu par le traitement avec le mélange des deux enzymes a présenté les meilleures teneurs en xanthophylles (93,21 µg/g) et en protéines (7,42 mg/g).

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'extraction de l'astaxanthine, à partir des sous-produits de crevettes, moyennent les solvants organiques à savoir l'acétone et l'éther de pétrole. L'analyse de ce caroténoïde par chromatographie sur couche mince a montré la présence de trois bandes distinctes. Ceci suggère la présence de trois types de caroténoïdes. Les valeurs des rapports frontales R_f de ces trois bandes sont 0,33, 0,61 et 0,80 qui correspondent probablement à l'astaxanthine, l'astaxanthine monoester et astaxanthine diester, respectivement. La suite a porté sur l'étude des activités biologiques de ce caroténoïde. L'astaxanthine a manifesté un pouvoir antiradicalaire puissant, ce pouvoir est dose dépendant. Les résultats ont montré également que l'astaxanthine à une concentration de 150 µg/ml possède un pouvoir réducteur puissant qui est de l'ordre de 1,8. Quelques soit la concentration testée, les valeurs obtenues étaient supérieures à celles du BHA. L'analyse des résultats du test de blanchiment de la β -carotène a prouvé qu'il s'agit d'un puissant piègeur de radicaux libres. La capacité de

L'astaxanthine à inhiber la dégradation de l'ADN plasmidique a été également évaluée. L'astaxanthine présente également une activité antiproliférative importante contre les cellules cancéreuses du larynx (cellules Hep-2), avec des CI_{50} de l'ordre de 320 $\mu\text{g/ml}$ (test MTT) et 300 $\mu\text{g/ml}$ (test RN).

A fin d'étudier l'activité antidiabétique de l'astaxanthine, une étude, *in vivo*, sur des rats a été réalisée. Les résultats ont montré que l'administration de l'astaxanthine à des rats diabétiques a conduit à une diminution significative ($p < 0,001$) de la glycémie et une augmentation des valeurs de l'insulinémie. Au niveau plasmatique, nous avons enregistré une augmentation des activités des enzymes antioxydantes (la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx)) et du taux du glutathion (GSH). Toutefois, les taux de l'urée, la créatinine, l'acide urique, le malondialdéhyde et des bio-marqueurs (l'aspartame aminotransférase, l'alanine aminotransférase et la phosphatase alcaline) ont baissé par rapport a ceux enregistrés chez les rat diabétiques non traités. L'analyse des paramètres lipidiques, à savoir le cholestérol total (TC), les triglycérides (TG), les lipoprotéines de faible densité (LDL-C) et les lipoprotéines de haute densité (HDL-C) a montré que le traitement avec l'astaxanthine permet, également, de baisser les taux du TC, des TG et des LDL-C, et d'augmenter le taux des lipoprotéines de haute densité par rapport au rats diabétiques. Au niveau tissulaire, rénal et hépatique, l'administration de l'astaxanthine chez les rats diabétiques a induit l'augmentation des activités des enzymes antioxydantes et du taux du glutathion par rapport aux rats diabétiques non traités. A fin de confirmer ces résultats biochimiques, une étude histologique a été réalisée aux niveaux rénal et hépatique. Les analyses des coupes histologiques sont en corrélation avec les analyses biochimiques. L'architecture tissulaire chez les rats diabétiques était sévèrement altérée alors que pour les rats diabétiques traités avec l'astaxanthine, l'histologie a présenté une structure presque normale avec absence de nécrose et d'inflammation.

Dans la deuxième partie, consacrée à la génération, la purification et l'identification de biopeptides, nous avons élaboré différents hydrolysats protéiques enrichis en peptides antibactériens et anti-dipeptidyl-peptidase-IV à partir de muscle de barbeau (*B. callensis*) moyennant l'Alcalase[®].

L'étude a porté tout d'abord sur la génération de peptides antibactériens. Pour cela Sept hydrolysats ont été préparés. Les cinétiques des hydrolyses enzymatiques des protéines de muscle de barbeau sont caractérisées par une phase initiale rapide, après cette

phase le degré d'hydrolyse tend à se stabiliser. L'activité antibactérienne des hydrolysats préparés a été évaluée, par la méthode de diffusion, vis-à-vis de cinq souches bactériennes à Gram-positif et cinq souches à Gram-négatif. Selon les résultats obtenus, un rapport E/S égale à 1 U/mg de protéines, un temps d'hydrolyse de 15 minutes et un degré d'hydrolyse égale à 6,6% ont permis d'obtenir l'hydrolysat le plus actif (H₃). Ce dernier a été fractionné sur une colonne de gel filtration Sephadex G-25 et le chromatogramme a montré l'existence de six pics majoritaires. La fraction F_{II} possède l'activité antibactérienne la plus importante avec des zones d'inhibitions contre *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter sp* et *Micrococcus luteus* de l'ordre de $2 \pm 0,3$, $2,1 \pm 0,2$, $2 \pm 0,1$ et $2,3 \pm 0,1$ cm, respectivement. La fraction F_{II}, a été soumise à un nouveau fractionnement par RP-HPLC et le profil a montré la présence de quatre sous-fractions actives douées d'activité antibactérienne. Ces sous-fractions ont été identifiées par spectrométrie de masse. Les séquences peptidiques identifiées au cours de ce travail sont : Gly-Val-His ; Trp-His-Arg ; Trp-His-Phe ; Leu-Thr-Met ; Ile-Thr-His °; Pro-Pro-Ser-Ser ; Ala-Ala-Ala-Leu ; Ala-Ala-Gly-Gly-Val ; Ala-Ala-Val-Lys-Met et Ala-Ser-Ser-Ser. Ces peptides ne présentent pas d'activité hémolytique.

La suite du travail a porté sur l'étude du mécanisme d'action des peptides déjà identifiés. Ces peptides ont été synthétisés chimiquement. Les caractéristiques structurales de ces peptides antibactériens ont été déterminées moyennant un model mathématique. Le nombre d'acides aminés, le pourcentage de résidus hydrophobes, la charge globale, et la structure secondaire ont été déterminés. L'activité antibactérienne de ces peptides a été évaluée, par la méthode de diffusion, vis-à-vis de six souches bactériennes. Les peptides synthétisés ont manifestés une activité antibactérienne contre les souches bactériennes testées. Pour chaque peptide testé la concentration minimale inhibitrice a été déterminée. Parmi ces peptides, trois sont les plus actifs à savoir : Ala-Ala-Gly-Gly-Val ; Ala-Ala-Val-Lys-Met et Ala-Ala-Ala-Leu. Le peptide Ala-Ala-Gly-Gly-Val semble être le plus actif contre *S. aureus*, *E. coli* et *L. monocytogenes* (CMI de l'ordre de 0,37, 1,48 et 0,37 μ M, respectivement). Les résultats ont montré également que ces peptides ne possèdent pas d'activité hémolytique. A fin d'étudier le mode d'actions des trois peptides antibactériens les plus actifs, l'ion potassium a été utilisé comme marqueur des perturbations de la perméabilité membranaire de *L. monocytogenes*. Les résultats ont montré que l'addition des peptides engendre une sortie massive, immédiate et rapide des ions potassium intracellulaires pour les peptides Ala-Ala-Gly-Gly-Val et Ala-Ala-Val-Lys-Met alors que

l'effet du peptide Ala-Ala-Ala-Leu est lent. Les deux premiers peptides agissent aux niveaux membranaires par des phénomènes osmotiques rapides alors que le troisième peptide agit par inhibition des mécanismes intra-cytoplasmiques. Le peptide Ala-Ala-Gly-Gly-Val semble être le peptide qui perméabilise le plus la membrane cellulaire de *L. monocytogenes*. La concentration extracellulaire en ion K⁺ augmente de 33 mg/l lorsque ce peptide est ajouté.

Finalelement, l'étude a été focalisée sur la purification et l'identification de peptides anti-dipeptidyl-peptidase-IV (anti-DPP-IV). Pour ce faire, un hydrolysats protéique de muscle de barbeau enrichi en biopeptides a été préparé, sous l'action de l'Alcalase[®]. Le degré d'hydrolyse final est de l'ordre de 16,4 %. L'étude de l'activité anti-DPP-IV, de cet hydrolysats enzymatique, a montré que cette activité est dose dépendante. L'hydrolysats protéique (DH = 16,4 %) a été fractionné sur une colonne de gel filtration Superdex peptide 3.2/30. Cinq pics majoritaires (F_I-F_V) ont été collectés. La fraction F_{III} est la plus active et elle a été soumise à un fractionnement par HPLC. Deux sous-fractions actives exerçant une activité anti-DPP-IV ont été détectées. La sous-fraction SF₄ a présenté la meilleure activité inhibitrice de la DPP-IV (CI₅₀ = 0,21 mg/ml). Cette sous-fraction a été soumise à un nouveau fractionnement par HPLC sur une colonne HALO Peptide. Le profil HPLC a montré la présence d'un seul pic majoritaire avec une CI₅₀ de l'ordre de 96 µg/ml. Les masses moléculaires ainsi que les séquences des peptides de cette sous-fraction ont été déterminées. Deux peptides inhibiteurs de la DPP-IV ont été identifiés (Trp-Ser-Gly et Phe-Ser-Asp). Ces deux peptides ne présentaient pas d'activité hémolytique. L'étude de la prédiction *in silico* de la structure des peptides a montré que le peptide Trp-Ser-Gly présente plus d'affinité envers la DPP-IV.

La suite des travaux portera essentiellement sur :

- Récupération de la fraction peptidique par hydrolyse du complexe caroténoprotéine et étude des activités biologiques *in vitro* et *in vivo*.
- L'optimisation des conditions d'extraction de l'astaxanthine et la mise en évidence d'autres activités biologiques.
- L'utilisation des peptides antibactériens purifiés dans l'élaboration des emballages actifs.
- Tests *in vivo* de l'effet des peptides anti-dipeptidyl-peptidase-IV purifiés sur un modèle animal.

Références bibliographiques

- Ahren B, Simonsson E, Larsson H, Landin-Olsson M, Torgeirsson H, Jansson P.A, Sandqvist M, Bavenholm P, Efendic S, Eriksson J.W, Dickinson S, Holmes D. (2002). Inhibition of dipeptidyl peptidase IV improves metabolic control over a 4-week study period in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 25, 869-875.
- Akdes D.H, Sutrisno N.I, Suryadi I. (2008). Extraction of astaxanthin from giant tiger (*Panaeus monodon*) shrimp waste using palm oil: Studies of extraction kinetics and thermodynamic. *Biotechnology*. 9, 4414-4419.
- Amar E.C, Kiron V, Satoh S, Watanabe T. (2004). Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. *Fish & Shellfish Immunology*. 16, 527-537.
- Amar E.C, Kiron V, Akutsu T, Satoh S, Watanabe T. (2012). Resistance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) experimental infection following ingestion of natural and synthetic carotenoids. *Aquaculture*. 330, 148-155.
- Amiot J and Brisson G.J. (1985). L'utilisation des actions enzymatiques pour modifier la valeur nutritionnelle et propriétés fonctionnelles des matières protéiques végétales. livre: *Protéines Végétales*. pp. 551-578.
- Andrea P.S.C, Hugo A.M.C, Losiane C.P, Fernando A.C. (2011). Supercritical CO₂ extraction of lipids and astaxanthin from Brazilian redspotted shrimp waste (*Farfantepenaeus paulensis*). *Journal of Supercritical Fluids*. 56, 164-173.
- Andres E, Dimarcq J.L. (2007). Cationic antimicrobial peptides: from innate immunity study to drug development. *Med Mal Infect*. 37, 194-199.
- Andreu D, Rivas L. (1998). Animal antimicrobial peptides: An overview. *Peptide Science*. 47, 415-433.
- Andrieux G. (2004). La filière française des coproduits de la pêche et de l'aquaculture: état des lieux et analyse. *Etudes de l'Ofimer*, pp. 63.
- Arason S. (2003). Utilization of fish byproducts in Iceland: Advances in Seafood Byproducts. Alaska Sea Grant College Program, AK-SG-03-01.
- Armenta R.E, Legarreta I.G. (2009). Amino acid profile and enhancement of the enzymatic hydrolysis of fermented shrimp carotenoproteins. *Food Chemistry*. 112, 310-315.
- Armstrong G.A, Hearst J.E. (1996) Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB Journal*. 10, 228-237.
- Babu C.M, Chakrabarti R, Surya-Sambasivarao K.R. (2008). Enzymatic isolation of carotenoid-protein complex from shrimp head waste and its use as a source of carotenoids. *LWT - Food Science and Technology*. 41, 227-235.
- Badii F, Howell N.K. (2006). Fish gelatin: Structure, gelling properties and interaction with egg albumen proteins. *Food Hydrocolloids*. 20, 630-640.
- Baker M.A, Maloy W.L, Zasloff M, Jacob L.S. (1993). Anticancer efficacy of magainin2 and analogue peptides. *Cancer Research*. 53, 3052-3057.
- Bakker E.P. (1993). Cell K⁺ and K⁺ transport systems in prokaryotes : Alkali Cation Transport Systems in Prokaryotes. CRC Press, Boca Raton. pp. 205-224.
- Balti R, Barkia A, Bougatef A, Ktari N, Nasri M. (2009). A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): Purification and characterization. *Food Chemistry*. 113, 146-154.

- Balti R, Bougatef A, El-Hadj Ali N, Zekri D, Barkia A, Nasri M. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties and angiotensin I-converting enzyme-inhibitory activity of protein hydrolysates from cuttlefish (*Sepia officinalis*) by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90, 2006-2014.
- Balti R, Jridi M, Sila A, Souissi N, Nedjar-Arroume N, Guillochon D, Nasri M. (2011). Extraction and functional properties of gelatin from the skin of cuttlefish (*Sepia officinalis*) using smooth hound crude acid protease-aided process. *Food Hydrocolloids*. 25, 943-950.
- Balti R, Bougatef A, Sila A, Guillochon D, Dhulster P, Nedjar-Arroume N. (2015). Nine novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle protein hydrolysates and antihypertensive effect of the potent active peptide in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*. 170, 519–525.
- Beaulieu L, Thibodeau J, Bonnet C, Bryl P, Carbonneauc M.E. (2013). Detection of antibacterial activity in an enzymatic hydrolysate fraction obtained from processing of Atlantic rock crab (*Cancer irroratus*) by-products. *PharmaNutrition*. 1, 149-157.
- Bekadja I.B, Mouffok S, Kherraz A, Boutiba Z. (2009). Etude préliminaire sur la biologie et la dynamique des populations de la crevette profonde *Parapenaeus longirostris* (LUCAS, 1846) de la Façade Maritime Oranaise. *European Journal of Scientific Research*. 36, 134-144.
- Benjakul S, Visessanguan W, Thummaratwasik P. (2000). Isolation and characterization of trypsin inhibitors from some Thai legume seeds. *Journal of Food Biochemistry*. 24, 107-127.
- Bennedsen M, Wang X, Willén R, Wadström T, Andersen L.P. (2000). Treatment of *H. pylori* infected mice with antioxidant astaxanthin reduces gastric inflammation, bacterial load and modulates cytokine release by splenocytes. *Immunology Letters*. 70, 185-189.
- Bhuvanewari S, Arunkumar E, Viswanathan P, Anuradha C.V. (2010). Astaxanthin restricts weight gain, promotes insulin sensitivity and curtails fatty liver disease in mice fed a obesity-promoting diet. *Process Biochemistry*. 45, 1406-1414.
- Bhuvanewari S, Yogalakshmi B, Sreeja S, Anuradha C.V. (2014). Astaxanthin reduces hepatic endoplasmic reticulum stress and nuclear factor- κ B-mediated inflammation in high fructose and high fat diet-fed mice. *Cell Stress Chaperones*. 19, 183-191.
- Biziulevicius G.A, Kislukhina O.V, Kazlauskaitė J, Zukaite V. (2006). Food-protein enzymatic hydrolysates possess both antimicrobial and immunostimulatory activities: a cause and effect theory of bifunctionality. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 46, 131-138.
- Blom W.R, Kunst A, Hakkaart M.J.J, Luli G.W, van Schie B.J. (1996). Peptides for tissue and cell culture media. PCT C12N 5/02, WO 96/26266.
- Bolin A.P, Macedo R.C, Marin D.P, Barros M.P, Otton R. (2010). Astaxanthin prevents in vitro auto-oxidative injury in human lymphocytes. *Cell Biology and Toxicology*. 26, 457-467.
- Boman H.G. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annual Review of Immunology*. 13, 61-92.

- Bougatef A, Souissi N, Fakhfakh N, Triki-Ellouze Y, Nasri M. (2007). Purification and characterization of trypsin from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*). Food Chemistry. 102, 343-350.
- Bougatef A, Balti R, Ben Zaied S, Souissi N, Nasri M. (2008). Pepsinogen and pepsin from the stomach of smooth hound (*Mustelus mustelus*): Purification, characterization and amino acid terminal sequences. Food Chemistry. 107, 777-784.
- Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Ellouze 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.
- Bougatef A, Ravallec R, Nedjar-Arroume N, Barkia A, Guillochon D, Nasri M. (2010a). Evidence of in vivo satietogen effect and control of food intake of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysate in rats. Journal of Functional Foods. 2, 10-16.
- Bougatef A, Balti R, Nasri R, Souissi N, Barkia A, Nasri M. (2010b). Biochemical properties of anionic trypsin acting at high concentration of NaCl purified from the intestine of a carnivorous fish: Smooth hound (*Mustelus mustelus*). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58, 5763-5769.
- Bougatef A, Balti R, Sila A, Nasri R, Graiaa G, Nasri M. (2012a). Recovery and physicochemical properties of smooth hound (*mustelus mustelus*) skin gelatin. LWT, Food science and Technology. 48, 248-254.
- Bougatef A, Balti R, Haddar A, Jellouli K, Souissi N, Nasri M. (2012b). Antioxidant and functional properties of protein hydrolysates of bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) heads as influenced by the extent of enzymatic hydrolysis. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 17, 841-852.
- Bougatef A. (2013). Trypsins from fish processing waste: characteristics and biotechnological applications—comprehensive review. Journal of Cleaner Production. 57, 257-265.
- Bowman H.G, Marsh J, Goode J.A. (1994). Symposium on Antimicrobial peptides. In: Wiley (Ed.), Ciba Foundation Symposium. John Wiley & Sons, London, U.K.
- Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H. (1995). Carotenoids Volume 1A: Isolation and Analysis, Birkhäuser Verlag, Basel.
- Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H. (2009) Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health, Birkhäuser Verlag, Basel.
- Brogden K.A, Ackermann M, McCray P.B.Jr, Tack B.F. (2003). Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. International Journal of Antimicrobial Agents. 22, 465-478.
- Brogden K.A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nature Reviews Microbiology. 3, 238-250.
- Bulet P, Stöcklin R, Menin L. (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. Immunological Reviews. 198, 169-184.
- Buteau J. (2008). GLP-1 receptor signaling: effects on pancreatic beta-cell proliferation and survival. Diabetes Metabolism. 34, S73-77.
- Calop J, Limat S, Frnandez C. (2008). Pharmacie clinique et thérapeutique. 3ème Ed. Masson, Elsevier Masson, Paris. pp 417-427.

- Cano-Lopez A, Simpson B.K, Haard N.F. (1987). Extraction of carotenoprotein from shrimp process wastes with the aid of trypsin from Atlantic Cod. *Journal of Food Sciences*. 52, 503-506.
- Cao W, Zhang C, Hong P, Ji H. (2008). Response surface methodology for autolysis parameters optimization of shrimp head and amino acids released during autolysis. *Food Chemistry*. 109, 176-183.
- Capelli B, Jenkins U, Cysewski G.R. (2013). Role of Astaxanthin in Sports Nutrition. Chapter 48. *Nutrition and Enhanced Sports Performance*. pp 465-471.
- Castillo-Yañez F.J, Pacheco-Aguilar R, Garcia-Carreño F.L, Toro M.A.N.D. (2004). Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. *Food Chemistry*. 85, 343-350.
- Castillo-Yanez F.J, Pacheco-Aguilar R, Garcia-Carreno F.L, Toro M.A.N. (2005). Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 140, 91-98.
- Castro M.S, Fontes W. (2005). Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein and Peptide Letters*. 12, 13-18.
- Catiou L, Traisnel J, Delval-Dubois V, Chihib N.E, Guillochon D, Nedjar-Arroume N. (2011a). Minimal antimicrobial peptidic sequence from hemoglobin alpha-chain: KYR. *Peptides*. 32, 633-638.
- Catiou L, Traisnel J, Chihib N.E, Le Flem G, Blanpain A, Melnyk O, Guillochon D, Nedjar-Arroume N. (2011b). RYH: a minimal peptidic sequence obtained from beta-chain hemoglobin exhibiting an antimicrobial activity. *Peptides*. 32, 1463-1468.
- Chai H.J, Chan Y.L, Li T.L, Shiau C.Y, Wu C.J. (2013). Evaluation of lanternfish (*Benthoosema pterotum*) hydrolysates as antioxidants against hydrogen peroxide induced oxidative injury. *Food Research International* .54, 1409–1418.
- Chakrabarti R. (2002). Carotenoprotein from tropical brown shrimp shell waste by enzymatic process. *Food Biotechnology*. 16, 81-90.
- Chang C.S, Chang C.L, Lai G.H. (2013). Reactive oxygen species scavenging activities in a chemiluminescence model and neuroprotection in rat pheochromocytoma cells by astaxanthin, beta-carotene, and canthaxanthin. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. 29, 412-421.
- Chem I.C. (1971). Nomenclature, Tentative rules for the nomenclature of carotenoids. *Biochemistry*. 10, 4827-4837.
- Chew W, Mathison B.D, Kimble L.L, Mixer P.F, Chew B.P. (2013) Astaxanthin decreases inflammatory biomarkers associated with cardiovascular disease in human umbilical vein endothelial cells. *American Journal of Food Science and Technology*. 1, 1-17.
- Chi C.F, Wang B, Wang Y.M, Zhang B, Deng S.G. (2015). Isolation and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysates of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) heads. *Journal of Functional Foods*. 12, 1-10.
- Chinchar V.G, Bryan L, Silphadaung U, Noga E, Wade D, Rollins-Smith L. (2004). Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides. *Virology*. 323, 268-270.
- 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. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 36, 187-194.
- Choubert G. (1983). Utilization of shrimp meal for rainbow trout (*Salmo gairdneri Rich.*) pigmentation. Influence of fat content of the diet. *Aquaculture*. 32, 19-26.
- Choubert G, Blanc J.M, Vallee F. (1997). Colour measurement, using the CIELCH colour space, of muscle of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), fed astaxanthin: Effects of family, ploidy, sex, and location of reading. *Aquaculture Research*. 28, 15-22.
- Clark R.J.H, Rodley G.A, Drake A.F, Church R.A, Zagalsky P.F. (1990). The carotenoproteins of the starfish *Linckia laevigata (Echinodermata asteroidea)*: A resonance raman and circular dichroism study. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 95, 847-853.
- Clemente A. (2000). Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*. 11, 254-262.
- Cros S, Lignot B, Razafintsalama C, Jaouen P, Bourseau P. (2004). Electrodialysis desalination and reverse osmosis concentration of an industrial mussel cooking juice: Process impact on pollution reduction and on aroma quality. *Journal of Food Sciences*. 69, 435-442.
- Csordas A, Michl H. (1970). Isolation and structure of haemolytic polypeptide from the defensive secretion of european bombina species. *Monatshefte Chemistry*. 101, 182-189.
- Cudennec B, Ravallec-Plé R, Courois E, Fouchereau-Peron M. (2008). Peptides from fish and crustacean by-products hydrolysates stimulate cholecystokinin release in STC-1 cells. *Food Chemistry*. 111, 970-975.
- Cudi M, Otvos Jr.L. (2002). Intracellular Targets of Antibacterial Peptides. *Current Drug Targets*. 3, 101-106.
- Cuthbertson B.J, Biillesbach E.E, Fievet J, Bachère E, Gross P.S. (2004). A new class of antimicrobial peptides from the Atlantic white shrimp (*Litopenaeus setiferus*) exhibits target specificity and an independent proline-rich-domain function. *Biochemical Journal*. 381, 79-86.
- d'Herbomez M. (2011). Dosages de la calcitonine : indications et interprétation. *La Presse Médicale*. 40, 1141-1146.
- Dao M.S, Dang V.T, Huynh N.D.B. (2005). Some information on low value and trash fish in Vietnam. Regional workshop on low value and "trash fish" in the Asia-Pacific region. Hanoi, Viet Nam, 7-9 June 2005.
- Daouad R, Dubois V, Bors-Dodita L, Nedjar-Arroume N, Krier F, Chihib NE, Mary P, Kouach M, Briand G, Guillochon D. (2005). New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin. *Peptides*. 26, 713-719.
- Das R, Dutta A, Bhattacharjee C. (2012). Preparation of sesame peptide and evaluation of antibacterial activity on typical pathogens. *Food Chemistry*. 131, 1504-1509.
- Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. (2011). Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 36, 981-1014.

- Debaty I, Halimi S, Muller M, Villaret L. (2008). Les nouveaux traitements du diabète de type 2 : quelle place pour les incrétines et le rimonabant par rapport aux précédents. *La Revue de médecine interne*. 29, 881-890.
- Del Castillo M.D, Ferrigno A, Acampa I, Borrelli R.C, Olano A, Martines-Rodriguez A, Fogliano V. (2007). In vitro release of angiotensin-converting enzyme inhibitors, peroxy radical scavengers and antibacterial compounds by enzymatic hydrolysis of glycated gluten. *Journal of Cereal Science*. 45, 327-334.
- De-Vecchi S.D, Coppes Z. (1996). Marine fish digestive proteases relevance to food industry and south-west Atlantic region a review. *Journal of Food Biochemistry*. 20, 193-214.
- Devine D.A. (2003). Antimicrobial peptides in defence of the oral and respiratory tracts. *Molecular Immunology*. 40, 431-443.
- DGPA (2012). Le secteur de la pêche et de l'aquaculture en Tunisie et mesures de préservation des ressources halieutiques. Direction Générale de la Pêche et de l'Aquaculture. Ministère de l'agriculture. République Tunisienne.
- Di Mascio P, Murphy M.E, Sies H. (1991). Antioxidant defense systems : the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *American Journal of Clinical Nutrition*. 53, 194-200.
- Dimarcq J.L, Bulet P, Hetru C, Hoffmann J. (1998). Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Peptide Science*. 47, 465-477.
- Dorozhkin S.V. (2007). Calcium orthophosphates. *Journal of Materials Science*. 42, 1061-1095.
- Doyen A, Saucier L, Beaulieu L, Pouliot Y, Bazinet L. (2012). Electro separation of an antibacterial peptide fraction from snow crab by-products hydrolysate by electro dialysis with ultrafiltration membranes. *Food Chemistry*. 132, 1177-1184.
- Dumay J, Barthomeuf C, Bergé J.P. (2004). How enzymes may be helpful for upgrading fish by-products: Enhancement of fat extraction. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 13, 69-84.
- Dumay J. (2006). Extraction des lipides par voie aqueuse par bioréacteur enzymatique combiné à l'ultrafiltration: application à la valorisation de coproduits de poisson (*sardina Pilchardus*) Thèse unique: Sciences de la vie et de la terre: Université de Nantes
- Ehrenstein G, Lecar H. (1977). Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 10, 1-34.
- Epstein W. (1986). Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews*. 39, 73-78.
- Evers D.J, Carroll D.J. (1998). Ensiling salt-preserved shrimp waste with grass straw and molasses. *Animal Feed Science and Technology*. 71, 241-249.
- Fales-Williams A.J, Brogden K.A, Huffman E, Gallup J.M., Ackermann M.R. (2002). Cellular distribution of anionic antimicrobial peptide in normal lung and during acute pulmonary inflammation. *Veterinary Pathology*. 39, 706-711.
- FAO (1990). Food and Agriculture Organisation. Elevage de crevettes de mer de Nosy-Bé. Rome, Fisheries Department.
- FAO Globefish (2009). Fishmeal market report, May.

- FAO: SOFIA. (2010). The state of world fisheries and aquaculture. In. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO (2012). La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2012. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture. Département des pêches et de l'aquaculture de la FAO. Rome.
- Fassett R.G, Combes J.S. (2011). Astaxanthin: A potential therapeutic agent in cardiovascular disease. *Marine Drugs*. 9, 447-465.
- Fernandez de Caleyá R, Gonzalez-Pascual B, Garcia-Olmedo F, Carbonero P. (1972). Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins in Vitro. *Applied Microbiology*. 23, 998-1000.
- Fletcher G.L, Goddard, S.V, Wu Y. (1999). Antifreeze proteins and their genes: From basic research to business opportunity. *CHEMTECH*. 30, 17-28.
- Fraser P.D, Bramley P.M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*. 43, 228-265.
- Froidevaux R, Kried F, Nedjar-Arroume N, Vercaigne-Marko D, Kodciarz E, Ruckebush C, Dhulster P, Guillochon D. (2001). Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine haemoglobin fragment. *FEBS Letters*. 491, 159-163.
- Gallego M, Aristoy M.C, Toldrá F. (2014). Dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides generated in Spanish dry-cured ham. *Meat Science*. 96, 757-761.
- García-Moreno P.J, Batista I, Pires C, Bandarra N.M, Espejo-Carpio F.J, Guadix A, Guadix E.M. (2014). Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species. *Food Research International*. 65, 469-476.
- Gauthier S.F, Pouliot Y, Sai nt-Sauveur D. (2006). Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *International Dairy Journal*. 16, 1315-1323.
- Gautier J.F, Choukem S.P. (2008). Les incrétines. *Nutrition clinique et métabolisme*. 22, 52-65.
- Gennaro R, Zanetti M. (2000). Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 55, 31-49.
- Gernat A.G. (2001). The effect of using different levels of shrimp meal in laying hen diets. *Poultry Science*. 80, 633-636.
- Gildberg A. (1988). Aspartic protease in fishes and aquatic invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*. B 91, 425-435.
- Gildberg A. (1992). Recovery of proteinase and protein hydrolysate from fish viscera. *Biology and Technology*. 39, 271-276.
- Gildberg A, Arnesn J.A, Carlehog M. (2002). Utilisation of cod backbone by biochemical fractionation. *Process Biochemistry*. 38, 475- 480.
- Gill I, López-Fandiño R, Jorba X, Vulfson E.N. (1996). Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enzyme and Microbial Technology*. 18, 162-183.
- Gimeno M, Ramírez-Hernández JY, Martínez-Ibarra C, Pacheco N, García-Arrazola R, Bárzana E, Shirai K. (2007). One-Solvent Extraction of Astaxanthin from Lactic Acid Fermented Shrimp Wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 10345-10350.

- Girgih A.T, Udenigwe C.C, Hasan F.M, Gill T.A, Aluko R.E. (2013). Antioxidant properties of Salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysate and peptide fractions isolated by reverse-phase HPLC. *Food Research International*. 52, 315-322.
- Goodwin T.W. (1980). *The biochemistry of the carotenoids*. Vol.I : Plants. Chapman & Hall, London. pp 377.
- Gorham S.D. (1991). "Collagen," in *Biomaterials. Novel Materials from Biological Sources*, D. Byrom, ed., New York, NY: Stockton Press, pp. 55-122. 49.
- Griffith M, Ewart K.V. (1995). Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods. *Biotechnology Advances*. 13, 375-402.
- Grimaldi A. (2005). Diabète : définition, dépistage et épidémiologie. In *Traité de diabétologie*. Paris, pp 3-21.
- Guani-Guerra E, Santos-Mendoza T, Zanetti M. (2010). Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical Immunology*. 135, 1-11.
- Guérard F, Dufossé L, De La Broise D, Binet A. (2001). Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 11, 1051-1059.
- Guerard F, Sumaya-Martinez M.T, Laroque D, Chabeaud A, Dufosse L. (2007). Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards. *Process Biochemistry*. 42, 1486-1491.
- Guerin M, Huntley M.E, Olaizola M. (2003). *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*. 21, 210-216.
- Guillausseau P.J, Kevorkian J.P, Virally M. (2008). Incrétines, incréto mimétiques et inhibiteurs de la DPP-4 : homéostasie glucidique et diabète de type 2. *Sang Thrombose Vaisseaux*. 20, 453-461.
- Gupta R, Beg Q, Lorenz P. (2002). Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59, 15-32.
- Haard N.F. (1994). Protein hydrolysis in seafoods. In F. Shahidi, & J. R. Botta (Eds.), *Seafoods chemistry, processing technology and quality*. Glasgow, UK: Blackie Academic and Professional, pp 11-33.
- Haard N.F. (1998). Speciality enzymes from marine organisms. *Food Technology*. 7, 64-67.
- Habermann E. (1972). Bee and wasp venoms. *Science*. 177, 314-322
- Hancock R.E.W, Chapple D.S. (1999). Peptide antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43, 1317-1323.
- Handayani A.D, Sutrisno B, Indraswati N, Ismadji S. (2008). Extraction of astaxanthin from giant tiger (*Penaeus monodon*) shrimp waste using palm oil: Studies of extraction kinetics and thermodynamic. *Bioresource Technology*. 99, 4414-4419.
- Harnedy P.A, FitzGerald R.J. (2012). Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods*. 4, 6-24.
- Hatanaka T, Inoue Y, Arima J, Kumagai Y, Usuki H, Kawakami K, Kimura M, Mukaihara T. (2012). Production of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from defatted rice bran. *Food Chemistry*. 134, 797-802.

- He H.L, Chen X.L, Wu H, Sun C.Y, Zhang Y.Z, Zhou B.C. (2007). High throughput and rapid screening of marine protein hydrolysates enriched in peptides with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity by capillary electrophoresis. *Bioresource Technology*. 98, 3499-3505.
- He H.L, Wu H, Chen X.L, Shi M, Zhang X.Y, Sun C.Y, Zhang Y.Z, Zhou B.C. (2008). Pilot and plant scaled production of ACE inhibitory hydrolysates from *Acetes chinensis* and its in vivo antihypertensive effect. *Bioresource Technology*. 99, 5956-5959.
- Heldt J.H. (1938). La reproduction chez les crustacés décapodes de la famille des Pénéides. *Annales de l'Institut océanographique*. 18, 31-206.
- Herman G.A, Bergman A, Stevens C, Kotey P, Yi B, Zhao P, Dietrich B, Golor G, Schrodter A, Keymeulen B, Lasseter K.C, Kipnes M.S, Snyder K, Hilliard D, Tanen M, Cilissen C, De Smet M, de Lepeleire I, Van Dyck K, Wang A.Q, Zeng W, Davies M.J, Tanaka W, Holst J.J, Deacon C.F, Gottesdiener K.M, Wagner J.A. (2006). Effect of single oral doses of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, on incretin and plasma glucose levels after an oral glucose tolerance test in patients with type 2 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolis*. 91, 4612-4619.
- Heu M.S kim J.S, Shahidi F. (2003). Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. *Food Chemistry*. 82, 235-242.
- Higuera-Ciapara I, Felix-Valenzuela L, Goycoolea F.M. (2006). Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science*. 46, 185-196.
- Hirano S. (1999). Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polymer International*. 48, 732-734.
- Holthuis L.B. (1987). Crevettes. In: Fischer, W., Schneider, M. and Bauchot, M.L. Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. Méditerranée et mer Noire, zone de pêche 37, végétaux et invertébrés (revision 1). Volume I, pp 189-292.
- Hsu K.C, Tung Y.S, Huang S.L, Jao C.L. (2013). Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitory Activity of Peptides in Porcine Skin Gelatin Hydrolysates: Bioactive Food Peptides in Health and Disease, pp 205-218.
- Huang S.L, Jao C.L, Ho K.P, Hsu K.C. (2012). Dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity of peptides derived from tuna cooking juice hydrolysates. *Peptides*. 35, 114-121.
- Hung C.C, Yang Y.H, Kuo P.F, Hsu K.C. (2014). Protein hydrolysates from tuna cooking juice inhibit cell growth and induce apoptosis of human breast cancer cell line MCF-7. *Journal of Functional Foods*. 11, 563-570.
- Inoue M, Tanabe H, Matsumoto A, Takagi M, Umegaki K, Amagaya S, Takahashi J. (2012). Astaxanthin functions differently as a selective peroxisome proliferator-activated receptor γ modulator in adipocytes and macrophages. *Biochemical Pharmacology*. 84, 692-700.
- Islam M.S, Khan S, Tanaka M. (2004). Waste loading in shrimp and fish processing effluents: potential source of hazards to the coastal and nearshore environments. *Mar Pol Bullet*. 49, 103-110.
- IUPAC-IUB. (1975). Report of IUPAC Commission on Nomenclature of Organic-Chemistry and Iupac-Iub Commission on Biochemical Nomenclature - Nomenclature of Carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*. 41, 405-431.

- Je J.Y, Park P.J, Kwon J.Y, Kim S.K. (2004). A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 76-82.
- Je J.Y, Kim S.Y, Kim S.K, (2005). Preparation and antioxidative activity of hoki frame protein hydrolysate using ultrafiltration membranes. *European Food Research and Technology*, 3, 220-221.
- Je J.Y, Qian Z.J, Byun H.G, Kim S.K. (2007). Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*. 42, 840-846.
- Jenssen H, Hamill P, Hancock R.E.W. (2006). Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 19, 491-511.
- Jeon Y.J, Byun H.G, Kim S.K. (1999). Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Process Biochemistry*. 35, 471-478.
- Jiang L, Wang B, Li B, Wang C, Luo Y. (2014). Preparation and identification of peptides and their zinc complexes with antimicrobial activities from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) protein hydrolysates. *Food Research International*. 64, 91-98.
- Johnson H.M. (2002). Perspectives de marché dans le secteur international du poisson et des fruits de mer. Autres produits/usages et questions de salubrité alimentaire. Bureau du Commissaire au développement de l'aquaculture, pp 43.
- Jun S.Y, Park P.J, Jung W.K, Kim S.K. (2004). Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *European Food Research and Technology*. 43, 212-219.
- Jung W.K, Park P.J, Byun H.G, Moon S.H, Kim S.K. (2005). Preparation of hoki (*Johnius belengerii*) bone oligophosphopeptide with a high affinity to calcium by carnivorous intestine crude proteinase. *Food Chemistry*. 91, 333-340.
- Jung W.K, Kim S.K. (2007). Calcium-binding peptide derived from pepsinolytic hydrolysates of hoki (*Johnius belengerii*) frame. *European Food Research and Technology*, 11, 224-232.
- Karppi J, Rissanen T.H, Nyyssönen K, Kaikkonen J, Olsson A.G, Voutilainen S, Salonen J.T. (2007). Effects of astaxanthin supplementation on lipid peroxidation. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 77, 3-11.
- Karrer P, Jucker E. (1950). Carotenoids. Translated Braude, E. A. London: Elsevier.
- Kavitha K, Kowshik J, Kranthi-Kiran-Kishore T, Basit-Baba A, Nagini S. (2013). Astaxanthin inhibits NF- κ B and Wnt/ β -catenin signaling pathways via inactivation of Erk/MAPK and PI3K/Akt to induce intrinsic apoptosis in a hamster model of oral cancer. *Biochemical et Biophysical Acta*. 1830, 4433-4444.
- Kelleher K. (2008). Les rejets des pêcheries maritimes mondiales : mise à jour. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, FAO, Rome.
- Khan S.K, Malinski T, Mason R.P, Kubant R, Jacob R.F, Fujioka K, Denstaedt S.J, King T.J, Jackson H.L, Hieber A.D, Lockwood S.F, Goodin T.H, Pashkow F.J, Bodary P.F. (2010). Novel astaxanthin prodrug (CDX-085) attenuates thrombosis in a mouse model. *Thrombosis Research*. 126, 299–305.

- Kim S.K, Mendis E, Shahidi F. (2008). Marine fisheries by-products as potential nutraceuticals: an overview. In: C.S.F. Barrow (Ed.) Marine nutraceuticals and functional foods. Nutraceutical Science and Technology, New York, pp 1-22.
- Kim S.Y, JE J.Y, Kim S.K. (2007). Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. The Journal of Nutritional Biochemistry. 18, 31-38.
- Kishimura H, Hayashi K. (2003). N-terminal amino acid sequence of trypsin from the pyloric ceca of the starfish *Asterias amurensis*. Fisheries Science. 69, 867-869.
- Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, Shahidi F. (2013). Inhibition of angiotensin converting enzyme, human LDL cholesterol and DNA oxidation by hydrolysates from blacktip shark gelatin. LWT - Food Science and Technology. 51, 177-182
- Komath M, Varma H.K. (2003). Development of a fully injectable calcium phosphate cement for orthopedic and dental applications. Bulletin of Materials Science. 26, 415-422.
- Korhonen H, Pihlanto-Leppälä A, Rantamäki P, Tupasela T. (1998). Impact of processing on bioactive proteins and peptides. Trends in Food Science & Technology. 9, 307-319.
- Korhonen H and Pihlanto A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. International Dairy Journal. 16, 945-960.
- Kraim M.M. (1994). Analyse de la variabilité morphométrique et méristique des population de *Barbus callensis* Valenciennes, (poisson, Cyprinidés) de Tunisie. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems. 334, 201-212.
- Krinsky N.I, Mayne S.T, Sies H. (2004). Carotenoids in health and disease, Marcel Dekker, New York.
- Kumari A, Kayastha A.M. (2011). Immobilization of soybean (*Glycine max*) α -amylase onto chitosan and amberlite MB-150 beads: Optimization and characterization. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 69, 8-14.
- Lahov E, Regelson W. (1996). Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: Casecidin, Isracidin peptides. Food Chemistry and Toxicology. 34, 131-145.
- Lai Y, Gallo R.L. (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. Trends Immunology. 30, 131-141.
- Latscha T. (1990). Carotenoids in animal nutrition their nature and significance in animal feed. Roche Publication No. 2175, F. Hoffmann-LaRoche, Animal Nutrition and Health, Basle, Switzerland, pp. 110.
- Lee S.H, Roh S.K, Park K.H, Yoon K.R. (1999). Effective extraction of astaxanthin pigment from shrimp using proteolytic enzymes. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 4, 199-204.
- Lee J.K, Jeon J.K, Byun H.G. (2014). Antihypertensive effect of novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) skin in spontaneously hypertensive rats. Journal of Functional Foods. 27, 381-389.
- Leite M.F, de Lima A.M, Massuyama M.M, Otton R. (2010). Astaxanthin restores the enzymatic antioxidant profile in salivary gland of alloxan-induced diabetic rats. Archives of Oral Biology. 55, 479-485.

- Lemaitre B, Hoffmann J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. Annual Review of Immunology. 25, 697-743.
- Lévesque M. (1995). Extraction de caractérisation de la chitine des résidus de la transformation industrielle des crustacés, Mémoire de maîtrise, Université Laval.
- Levy O. (2004) Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes. Journal of Leukocyte Biology. 76, 909-925.
- Li M, Wu W, Zhou P, Xie F, Zhou Q, Mai K. (2014). Comparison effect of dietary astaxanthin and Haematococcus pluvialis on growth performance, antioxidant status and immune response of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. Aquaculture. 434, 227-232.
- Liang J, Tian Y.X, Yang F, Zhang J.P, Skibsted L.H. (2009). Antioxidant synergism between carotenoids in membranes. Astaxanthin as a radical transfer bridge. Food Chemistry. 115, 1437-1442.
- Liceaga-Gesualdo A.M, Li-Chan E.C.Y. (1999). Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). Journal of Food Science. 64, 1000-1004.
- Li-Chan E.C, Hunag S.L, Jao C.L, Ho K.P, Hsu K.C. (2012). Peptides derived from atlantic salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 60, 973-978.
- Liepke C, Zucht H.D, Forssmann W.G, Standker L. (2001). Purification of novel peptide antibiotics from human milk. Journal of Chromatography B.752, 369-377.
- Liepke C, Baxmann S, Heine C, Breithaupt N, Standker L, Forssmann W.G. (2003). Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity: a class of host defense peptides. Journal of Chromatography B: Analytical technologies in the biomedical and life sciences. 791, 345-356.
- Lignot B, Froidevaux R, Nedjar-Arroume N, Guillochon D. (1999). Solvent effect on kinetics of appearance of neokyotorphin VVh4 and a bradykinin-potentiating peptide in the course of peptic hydrolysis of bovine haemoglobin. Biotechnology and Applied Biochemistry. 30, 201-207.
- Linder M, Fanni J, Parmentier M. (2001). Enzyme-catalysed enrichment of n-3 polyunsaturated fatty acids of salmon oil : optimisation of reaction conditions. OCL. 8, 73-77.
- Liu R, Zheng W, Li J, Wang L, Wu H, Wang X, Shi L. (2015). Rapid identification of bioactive peptides with antioxidant activity from the enzymatic hydrolysate of *Mactra veneriformis* by UHPLC-Q-TOF mass spectrometry. Food Chemistry. 167, 484-489.
- Liu Z, Dong S, Xu J, Zeng M, Song H, Zhao Y. (2008). Production of cysteine-rich antimicrobial peptide by digestion of oyster (*Crassostrea gigas*) with alcalase and bromelin. Food Control. 19, 231-235.
- Lockwood S.F., Penn M.S., Hazen S.L., Bikádic Z, Zsilac F. (2006). The effects of oral Cardax™ (disodium disuccinate astaxanthin) on multiple independent oxidative stress markers in a mouse peritoneal inflammation model: influence on 5-lipoxygenase in vitro and in vivo. Life Sciences. 79, 162-174

- Lopez C.F, Nielsen, S.O, Srinivas G, DeGrado W.F, Klein M.L. (2006). Probing Membrane Insertion Activity of Antimicrobial Polymers via Coarse-Grain Molecular Dynamics. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2, 649-655.
- Lu Y, Yao H, Gong Y, Sheng Q. (2005). Effects of enzymatic treatment of corn gluten meal on lutein and zeaxanthin extraction. *International Journal of Food Properties*. 8, 161-169.
- Machmudah S, Shotipruk A, Goto M, Sasaki M, Hirose, T. (2006). Extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using supercritical CO₂ and ethanol as entrainer. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 45, 3652-3657.
- Maity J.P, Lin T.J, Cheng H.P.H, Chen C.Y, Reddy A.S, Atla S.B, Chang Y.F, Chen H.R, Chen C.C. (2011). Synthesis of brushite particles in reverse microemulsions of the biosurfactant surfactin. *International Journal of Molecular Sciences*. 12, 3821-3830.
- Mak P, Wojcik, Wicherek L, Suder P, Dubin A. (2009). Antibacterial hemoglobin peptides in human menstrual blood. *Peptides*. 25, 1839-1847.
- Maldonado J, Gil A, Narbona E, Molina J.A. (1998). Special formulas in infant nutrition: a review. *Early Human Development*. 53, S23-S32.
- Malkoski M, Dashper S.G, O'Brien-Simpson N.M, Talbo G.H, Cross K.J, Reynolds E.C. (2001). Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45, 2309-2315.
- Mallet J.F, Duarte J, Vinderola G, Anguenot R, Beaulieu M, Matar C. (2014). The immunopotentiating effects of shark-derived protein hydrolysates. *Nutrition* .30, 706-712.
- Manabe E, Handa O, Naito Y, Mizushima K, Akagiri S, Adachi S, Takagi T, Kokura S, Maoka T, Yoshikawa T. (2008). Astaxanthin protects mesangial cells from hyperglycemia induced oxidative signaling. *Journal of Cellular Biochemistry*. 103, 1925-1937.
- Manu-Tawiah W, Haard N.F. (1987). Recovery of carotenoprotein from the exoskeleton of snow crab (*Chionocetes opilio*). *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* . 20, 31-33.
- Marin D.P, Bolin A.P, Macedo R.C.S, Sampaio S.C, Otton R. (2011). ROS production in neutrophils from alloxan-induced diabetic rats treated in vivo with astaxanthin. *International Immunopharmacology*. 11, 103-109.
- Martinez A, Serra J.L. (1989). Proteolytic activities in the digestive tract of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry*. 93, 61-66.
- Matsuzaki K, Murase O, Fujii N, Miyajima K. (1996). An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flipflop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry*. 35, 11361-11368.
- Matsuzaki K, (1998). Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochimica et Biophysica Acta: Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1376, 391-400.
- Matteucci E, Giampietro O. (2009). Dipeptidyl-peptidase-IV (CD26): Knowing the function before inhibiting the enzyme. *Current Medicinal Chemistry*. 16, 2943-2951.

- McCarty M.F. (2011). Full-spectrum antioxidant therapy featuring astaxanthin coupled with lipoprivic strategies and salsalate for management of non-alcoholic fatty liver disease. *Medical Hypotheses*. 77, 550-556.
- Mellander O. (1950). The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. II. Peroral calcium dosage of infants. *Acta Soc Med Ups*. 55, 247-255.
- Memarpoor-Yazdi M, Asoodeh A, Chamani J. (2012). A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. *Journal of Functional Foods*. 4, 278-286.
- Mendes-Pinto M.M, Raposo M.F.J, Bowen J, Young A.J, Morais R. (2001). Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: Effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability. *Journal of Applied Phycology*. 13, 19-24.
- Minke R, Blackwell J. (1978). The structure of alpha-chitin. *Journal of Molecular Biology*. 120, 167-181.
- Monroy-Ruiz J, Sevilla M.Á, Carrón R, Montero M.J. (2011). Astaxanthin-enriched-diet reduces blood pressure and improves cardiovascular parameters in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacological Research*. 63, 44-50.
- Mu J, Woods J, Zhou Y.P, Roy R.S, Li Z, Zycband E, Feng Y, Zhu L, Li C, Howard A.D, Moller D.E, Thornberry N.A, Zhang B.B. (2006). Chronic inhibition of dipeptidyl peptidase-4 with a sitagliptin analog preserves pancreatic beta-cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. *Diabetes*. 55, 1695-1704.
- Munõz Z, Moret A, Garcés S. (2009). Assessment of chitosan for inhibition of *Colletotrichum sp.* on tomatoes and grapes. *Crop Protection*. 28, 36-40.
- Muzzarelli R.A.A. (1977). Chitin. Oxford: Pergamon. pp 220-228.
- Muzzarelli R.A.A. (1997). Depolymerisation of chitins and chitosans with hemicellulase, lysosyme, papain and lipase. In: Chitin handbook, R. A. A. Muzzarelli, M. G. Peter, pp 153-163.
- Nagai T, Nagamori K, Yamashita E, Suzuki N. (2000). Isolation of collagen from fish waste material skin, bone and fins. *Journal of Food Science & Technology*. 37, 285-289.
- Nagaraj S, Rajaram M.G, Arulmurugan P, Baskaraboopathy A, Karuppasamy K, Jayappriyan K.R, Sundararaj R, Rengasamy R. (2012). Antiproliferative potential of astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* Flotow on human hepatic cancer (HepG2) cell line. *Biomedicine & Preventive Nutrition*. 2, 149-153.
- Naguib Y.M.A. (2000). Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 1150-1154.
- Naito Y, Uchiyama K, Aoi W, Hasegawa G, Nakamura N, Yoshida N, Maoka T, Takahashi J, Yoshikawa T. (2004). Prevention of diabetic nephropathy by treatment with astaxanthin in diabetic db/db mice. *BioFactors*. 20, 49-59.
- Nakajima K, Yoshie-Stark Y, Ogushi M. (2009). Comparison of ACE inhibitory and DPPH scavenging activities of fish muscle hydrolysates. *Food Chemistry*. 114, 844-851.
- Nakkariki M.S, Narayan B, Namdev S.M. (2006). Carotenoids in *Solonocera indica* and *Aristeus alcocki*, deep-sea shrimp from indian waters. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 2, 5-16.

- Narayan B, Velappan S.P, Zituji S.P, Manjabhatta S.N, Gowda L.R. (2010). Yield and chemical composition of fractions from fermented shrimp biowaste. *Waste Management & Research*. 28, 64-70.
- Nedjar-Arroume N, Dubois-Delval V, Miloudi K, Daoud R, Krier F, Kouach M, Briand G. (2006). Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. *Peptides*. 27, 2082-2089.
- Nedjar-Arroume N, Dubois-Delval V, Adje Y.E, Traisnel J, Krier F, Mary P, Kouach M, Briand G, Guillochon D. (2008). Bovine hemoglobin: an attractive source of antibacterial peptides. *Peptides*. 29, 969-977.
- Nelson J.S. (1994). *Fishes of the world*, 3ème édition. Wiley J. & Sons. New York. pp 600.
- Ngo D.H, Wijesekara I, Vo T.S, Ta Q.V, Kim S.K. (2011a). Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: An overview. *Food Research International*. 44, 523-529.
- Ngo D.H, Ryu B.M, Vo T.S, Himaya S.W.A., Wijesekara I, Kim S.K. (2011b). Free radical scavenging and angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 49, 1110-1116.
- Ni H, Chen Q.H, He G.Q, Wu G.B, Yang Y.F. (2008). Optimization of acidic extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Journal of Zhejiang University Science B-Biomedicine & Biotechnology*. 9, 51-59.
- Nongonierma A.B, Mooney C, Shields D.C, FitzGerald R.J. (2014). In silico approaches to predict the potential of milk protein-derived peptides as dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitors. *Peptides*. 57, 43-51.
- Norland R.E. (1990). *Fish Gelatin*: Voigt, M. J., Botta, J. R. (Eds.), *Advances in Fisheries Technology and Biotechnology for Increased Profitability*. Technomic Publisher Co. Inc., Lancaster. pp 297.
- Olaizola M. (2008). The production and health benefits of astaxanthin. In: C.S.F. Barrow (Ed.) *Marine nutraceuticals and functional foods*. Nutraceutical Science and Technology, New York. pp 321-344.
- Oliveira Cavalheiro J.M, Oliveira de Souza E, Bora P.S. (2007). utilization of shrimp industry waste in the formulation of tilapia (*oreochromis niloticus linnaeus*) feed. *Bioresource Technology*. 98, 602-606.
- OMS : Organisation mondiale de la santé. (2013). Aide-mémoire N° 312. Disponible en ligne : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/fr/index.html>.
- Oren Z, Shai Y. (1998). Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Peptide Science*. 47, 451-463.
- Orsolya T. (2005). Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infections. *Peptide Science*. 80, 717-735.
- Otazu Abrill M, Ceccaldi H.J. (1984). Influence de carotenoides purifiées ajoutées dans les aliments composés sur la pigmentation de *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Aquaculture*. 36, 217-228.
- Ourisson G, Rohmer M, Poralla K. (1987). Prokaryotic hopanoids and other polyterpenoid sterol surrogates, *Annual Review of Microbiology*. 41, 301-333.

- Pacheco N, Garnica-González M, Ramírez-Hernández J.Y, Floresalbino B, Gimeno M, Bárzana E, Shirai K. (2009). Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*. 100, 2849-2854.
- Paduraru G.D, Aelenei N, Luca D, Cimpoesu N. (2011). New brushite cements analysis. *Optoelectronics and Advanced Materials, Rapid Communications*. 5, 465-468.
- Palozza P, Torelli C, Boninsegna A, Simone R, Catalano A, Mele M.C, Picci N. (2009). Growth-inhibitory effects of the astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* in human colon cancer cells. *Cancer Letters*. 283, 108-117.
- Park J.S, Mathison B.D, Hayek M.G, Zhang J, Reinhart G.A, Chew B.P. (2013). Astaxanthin modulates age-associated mitochondrial dysfunction in healthy dogs. *Journal of Animal Science*. 91, 268-275.
- Pashkow F.J, Watumull D.G, Campbell C.L. (2008). Astaxanthin: A novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. *The American Journal of Cardiology*. 101, 58D-68D.
- Peña J, Izquierdo-Barba I, Martinez A, Vallet-Regi M. (2006). New method to obtain chitosan/apatite materials at room temperature. *Solid State Sciences*. 8, 513-519.
- Pereira F, Pereira C, Lacerda M.H. (1998). Contact dermatitis due to a cream containing chitin and a carbitol. *Contact Dermatitis*. 38, 290-291.
- Picot L, Bordenave S, Didelot S, Fruitier-Arnaudin I, Sannier F, Thorkelsson G, Bergé J.P, Guérard F, Chabeaud A, Picot J.M. (2006). Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochemistry*. 41, 1217-1222.
- Plascencia-Jatomea M, Olvera-Novoa M.A, ARredondo-Figueroa J.L, Hal G.M, Shirai K. (2002). Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus L*) diets. *Journal of The Science of Food and Agriculture*. 82, 753-759.
- Powers J.P, Hancock R.E. (2003). The relationship between peptide structure and bacterial activity. *Peptides*. 24, 1681-1691.
- Quaglia G.B, Orban E. (1987). Influence of degree of hydrolysis on the solubility of protein hydrolysates from sardine (*Sardina pilchardus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 38, 271-276.
- Raccach D. (2004). Epidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. *EMC-Endocrinologie*. 1, 29-42.
- Ramaswamy H.S, Simpson B.K, Ya T.U, Yaylayan V. (1991). Tray-drying of carotenoproteins recovered from lobster waste. *Journal of Food Processing and Preservation*. 15, 273-284.
- Ranga Rao A, Sarada R, Ravishankar G.A. (2007). Stabilization of astaxanthin in edible oils and its use as an antioxidant. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87, 957-965.
- Ranga Rao A, Raghunath-Reddy R.L, Baskaran V, Sarada R, Ravishankar G.A. (2010). Characterization of microalgal carotenoids by mass spectrometry and their bioavailability and antioxidant properties elucidated in rat model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58, 8553-8559.

- Ranga Rao A, Baskaran V, Sarada R, Ravishankar G.A. (2013). In vivo bioavailability and antioxidant activity of carotenoids from micro algal biomass—A repeated dose study. *Food Research International*. 54, 711-717.
- Rao M.B, Tanksale A.M, Ghatge M.S, Deshpande V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62, 597-635.
- Ravallec-Plé R. (2000). Valorisation d'hydrolysats d'origine marine: optimisation de la concentration en peptides apparentés aux facteurs de croissance et aux agents sécrétagogues. Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale, pp171
- Ravallec-Plé R, Van-Wormhoudt A. (2003). Secretagogue activities in cod (*Gadus morhua*) and shrimp (*Penaeus aztecus*) extracts and alcalase hydrolysates determined in AR4-2J pancreatic tumour cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 134, 669-679.
- Ravi-Kumar M.N.V. (2000). A review of chitin and chitosane applications. *Reactive and Functional Polymers*. 46, 1-27.
- Rawendra R.D.S, Chang C.I, Chen H.H, Huang T.C, Hsu J.L. (2013). A novel angiotensin converting enzyme inhibitory peptide derived from proteolytic digest of Chinese soft-shelled turtle egg white proteins. *Journal of Proteomics*. 94, 359-369
- Recio I, Visser S. (1999). Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine α S2-casein. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1428, 314-326.
- Refstie S, Olli J.J, Standal H. (2004). Feed intake, growth, and protein utilisation by post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. *Aquaculture*. 239, 331-349.
- Reimer M.K, Holst J.J, Ahren B. (2002). Long-term inhibition of dipeptidyl peptidase IV improves glucose tolerance and preserves islet function in mice. *European Journal of Endocrinology*. 146, 717-727.
- Richey B, Cayley D.S, Mossing M.C, Kolka C, Anderson C.F, Farrar T.C, Record M.T.Jr. (1987). 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. *Journal of Biological Chemistry*. 262, 7157-7164.
- Ruen-ngam D, Shotipruk A, Pavasant P. (2010). Comparison of extraction methods for recovery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Separation Science and Technology*. 46, 64-70.
- Rustad T. (2007). *Physical and Chemical Properties of Protein Seafood by-products*. CRC Press, Boca Raton (USA).
- Ruttanapornvareesakul Y, Somjit, K, Otsuka A, Hara K, Osatomi K, Osako K, Kongpun O, Nozaki Y. (2006). Cryoprotective effects of shrimp head protein hydrolysate on gel forming ability and protein denaturation of lizardfish surimi during frozen storage. *Fisheries Science*. 8, 66-72.
- Sachindra N.M, Mahendrakar N.S. (2005). Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils. *Bioresource Technology*. 96, 1195-1200.

- Sachindra N.M, Narayan B, Mahendrakar N.S. (2005). Carotenoids in different body components of Indian shrimps. *Journal of The Science of Food and Agriculture*. 34, 80-85.
- Sachindra N.M, Bhaskar N, Mahendrakar N.S. (2006). Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. *Waste Management*. 26, 1092-1098.
- Sachindra N.M, Bhaskar N, Siddegowda G.S, Sathisha A.D, Suresh P.V. (2007). Recovery of carotenoids from ensilaged shrimp waste. *Bioresource Technology*. 98, 1642-1646.
- Sachindra N.M, Bhaskar N. (2008). In vitro antioxidant activity of liquor from fermented shrimp biowaste. *Bioresource Technology*. 99, 9013-9016.
- Saidi S, Deratani A, Belleville M.P, Ben Amar R. (2014). Antioxidant properties of peptide fractions from tuna dark muscle protein by-product hydrolysate produced by membrane fractionation process. *Food Research International*. 65, 329-336.
- Sasaki Y, Kobara N, Higashino S, Giddings J.C, Yamamoto J. (2011). Astaxanthin inhibits thrombosis in cerebral vessels of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Nutrition Research*. 31, 784-789.
- Sathivel S, Bechtel P.J, Babbitt J, Smiley S, Crapo C, Reppond K.D, Prinyawiwatkul W. (2003). Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) byproduct hydrolysates. *Journal of Food Science*. 7, 61-68.
- Sattar M.A, Paul D.K, Arafat S.M.Y, Khan M.Z.H, Mia M.C. (2006). Antibacterial activity of methanol extraction of boal fish (*Wallago attu*). *CMU Journal*. 5, 323-331.
- Saw C.L.L, Yang A.Y, Guo Y, Kong A.N.T. (2013). Astaxanthin and omega-3 fatty acids individually and in combination protect against oxidative stress via the Nrf2–ARE pathway. *Food and Chemical Toxicology*. 62, 869-875.
- Scheen A.J. (2007). Le Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1), Nouvelle cible dans le traitement du diabète de type 2. *Revue Médicale Liege*. 62, 216-219.
- Schittek B, Hipfel R, Sauer B, Bauer J, Kalbacher H, Stevanovic S, Schirle M, Schroeder K, Blin N, Meier F, Rassner G, Garbe C. (2001). Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nature Immunology*. 2, 1133-1137.
- Schrieber R, Gareis H. (2007). *Gelatine handbook*. Weinheim: Wiley-VCH GmbH & Co.
- Shahidi F. (1994). Proteins from seafood processing discards. In Z. E. Sikorski, B. S. Pan, and F. Shahidi (Eds.), *Seafoods proteins*. New York, NY: Chapman and Hall. pp. 171-193.
- Shahidi F. (1995). Extraction of value added components from shellfish processing discards. *Developments in Food Science*. 37, 1427-1480.
- Shahidi F, Kamil J.Y.V.A. (2001). Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends Food Sci. Technol*. 12, 435-464.
- Shahidi F. (2006). Maximising the value of marine by-products. Memorial University of New foundland, Canada, pp 560.
- Shai Y. (2002). Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 66, 236-248.
- Sharma S.K, Le-Maguer M. (1996). Kinetics of lycopene degradation in tomato pulp solids under different processing and storage conditions, *Food Research International*; 29, 309-315.

- Shyni K, Hema G.S, Ninan G, Mathew S, Joshy C.G, Lakshmanan P.T. (2014). Isolation and characterization of gelatin from the skins of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*), dog shark (*Scoliodon sorrakowah*), and rohu (*Labeo rohita*). Food Hydrocolloids. 39, 68-76.
- Silveira S.T, Martínez-Maqueda D, Recio I, Hernández-Ledesma B. (2013). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides generated by tryptic hydrolysis of a whey protein concentrate rich in β -lactoglobulin. Food Chemistry. 141, 1072-1077.
- Simpson B.K, Haard N.F. (1985). The use of proteolytic enzymes to extract carotenoproteins from shrimps wastes. Journal of applied biochemistry. 7, 212-222.
- Simpson B.K, Smith J.P, Haard N.F. (1991). Marine enzymes. In Y. H. Hui (Ed.), Encyclopedia of Food Science and Technology. NewYork, NY: John Wiley and Sons, pp. 1645-1653.
- Slizyte R, Mozuraityte R, Martinez-Alvarez O, Falch, E, Fouchereau-Peron M, Rustad T. (2009). Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. Process Biochemistry. 44, 668-677.
- Snodderly D.M. (1995). Evidence for Protection against Age-Related Macular Degeneration by Carotenoids and Antioxidant Vitamins. American Journal of Clinical Nutrition. 62, S1448-S1461.
- Song R, Wei R, Luo H, Yang Z. (2014). Isolation and identification of an antiproliferative peptide derived from heated products of peptic hydrolysates of half-fin anchovy (*Setipinna taty*). Journal of Functional Foods. 10, 104-111.
- Srinivasa P.C, Tharanathan R.N. (2007). Chitin/Chitosan - safe, ecofriendly packaging materials with multiple potential uses. Food Reviews International. 23, 53-72.
- Straub O. (1987) Key to carotenoids, 296 pp. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Suzane P. (1998) Nouveau procédé de traitement des déchets à bord: les snekkar prennent de l'antirides. ECOPECHE. 4, 41.
- Svelter C.H. (1970). Enzymes activated by monovalent cations. Science. 168, 789-795.
- Tamehiro N, Okamoto-Hosoya Y, Okamoto S, Ubukata M, Hamada M, Naganawa H, Ochi K. (2002). Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 46, 315-320.
- Tanaka T, Morishita Y, Suzui M, Kojima T, Okumura A, Mori H. (1994). Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by the naturally occurring carotenoid astaxanthin. Carcinogen. 15, 15-19.
- Tang W, Zhang H, Wang L, Qian H, Qi X. (2015). Targeted separation of antibacterial peptide from protein hydrolysate of anchovy cooking wastewater by equilibrium dialysis. Food Chemistry. 168, 115-123.
- Theolier J, Hammami R, Labelle P, Fliss I, Jean J. (2013). Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. Journal of Functional Foods. 5, 706-714.
- Thomas A, Schänzer W, Delahaut P, Thevis M. (2012). Immunoaffinity purification of peptide hormones prior to liquid chromatography–mass spectrometry in doping controls. Methods. 56, 230-235.
- Toke O. (2005). Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infections. Peptide Science. 80, 717-735.

- Tomé D. (1998). Peptides fonctionnels. Danone World Newsletter, n° 17.
- Tomita M, Bellamy W, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K. (1991). Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *Journal of Dairy Science*. 74, 4137-4142.
- Tossi A, Sandri L, Giangaspero A. (2000). Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 55, 4-30.
- Tso M.O, Lam T.T. (1996). Method of retarding and ameliorating central nervous system and eye damage, US patent 5527533, Board of trustees of the University of Illinois, United States of America.
- Uchiyama K, Naito Y, Hasegawa G, Nakamura N, Takahashi J, Yoshikawa T. (2002) Astaxanthin protects beta-cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice. *Redox Report*. 7, 290-293.
- Umayaparvathi S, Meenakshi S, Vimalraj V, Arumugam M, Sivagami G, Balasubramanian T. (2014). Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). *Biomedicine & Preventive Nutrition*. 4, 343–353.
- Utzschneider K.M, Tong J, Montgomery B, Udayasankar J, Gerchman F, Marcovina S.M, Watson C.E, Ligueros-Saylan M.A, Foley J.E, Holst J.J, Deacon C.F, Kahn S.E. (2008). The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor vildagliptin improves beta-cell function and insulin sensitivity in subjects with impaired fasting glucose. *Diabetes Care*. 31, 108-113.
- Velu C.S, Czczuga B, Munuswamy N. (2003). Carotenoprotein complexes in entomostracan crustaceans (*Strptocephalus dichotomus* and *Moina micrura*). *Comparative Biochemistry & Physiology*. 135, 35-42.
- Verspohl E.J. (2009). Novel therapeutics for type 2 diabetes: Incretin hormone mimetics (glucagon-like peptide-1 receptor agonists) and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics*. 124, 113-138.
- Vieira G.H.F, Vieira R.H.S.F, Macrae A, Sousa O.V. (2005). Peptone preparation from fishing byproducts. *Journal of The Science of Food and Agriculture*. 85.
- Virally M, Kevorkian J.P, Guillausseau P.J. (2008). Incrétines, incrétinomimétique et inhibiteurs de la DPP-4 : homéostasie glucidique et diabète de type 2. *Sang Thrombose Vaisseaux*. 20, 453-461.
- Wang W, Du Y, Qiu Y, Wang X, Yang J, Cai J, Kennedy J.F. (2008). A new green technology for direct production of low molecular weight chitosan. *Carbohydrate Polymers*. 74, 127-132.
- Wang S.L, Liang T.W, Yen Y.H. (2011). Bioconversion of chitin-containing wastes for the production of enzymes and bioactive materials. *Carbohydrate Polymers*. 84, 732-742.
- Wang L, Yang B, Yan B, Yao X. (2012). Supercritical fluid extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* and its antioxidant potential in sunflower oil. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 13, 120-127.
- Wang M, Zhang J, Song X, Liu W, Zhang L, Wang X, Lu C. (2013). Astaxanthin ameliorates lung fibrosis in vivo and in vitro by preventing transdifferentiation, inhibiting proliferation, and promoting apoptosis of activated cells. *Food and Chemical Toxicology*. 56, 450-458.

- Wu J, Chen S, Ge S, Miao J, Li J, Zhang Q. (2013). Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*. 32, 42-51.
- Ya T, Simpson B.K, Ramaswamy H, Yaylayan V, Smith J.P, Hudon C. (1991). Carotenoproteins from lobster waste as a potential feed supplement for cultured salmonids. *Food Biotechnology*. 5, 87-93.
- 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.
- Yang L, Harroun T.A, Weiss T.M, Ding L, Huang H.W. (2001). Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores. *Biophysical Journal*. 81, 1475-1485.
- Yang J, Campitelli J, Hu G, Lin Y, Luo J, Xue C. (2007). Increase in DPP-IV in the intestine, liver and kidney of the rat treated with high fat diet and streptozotocin. *Life Science*. 81, 272-279.
- Yasui Y, Hosokawa M, Mikami N, Miyashita K, Tanaka T. (2011). Dietary astaxanthin inhibits colitis and colitis-associated colon carcinogenesis in mice via modulation of the inflammatory cytokines. *Chemico-Biological Interactions*. 193, 79-87.
- Yeaman M. R, Yount N.Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*. 55, 27-55.
- Yen Y.H, Li P.L, Wang C.L, Wang S.L. (2006). An antifungal protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* M-1001 with shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Enzyme and Microbial Technology*. 39, 311-317.
- Yoshida H, Yanai H, Ito K, Tomono Y, Koikeda T, Tsukahara H, Tada N. (2010). Administration of natural astaxanthin increases serum HDL-cholesterol and adiponectin in subjects with mild hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. 209, 520-523.
- Zambrowicz, B, Ding Z.M, Ogbaa I. (2013). Effects of LX4211, a dual SGLT1/SGLT2 inhibitor, plus sitagliptin on postprandial active GLP-1 and glycemic control in type 2 diabetes. *Clinical Therapeutics*. 35, 273–285.
- Zaslouff M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 415, 389-395.
- Zhang H.Q, Darvell B.W. (2011). Formation of hydroxyapatite whiskers by hydrothermal homogeneous precipitation using acetamide. *Journal of the American Ceramic Society*. 94, 2007-2013.
- Zhang X.S, Zhang X, Wu Q, Li W, Wang C.X, Xie G.B, Zhou X.M, Shi J.X, Zhou M.L. (2014). Astaxanthin offers neuroprotection and reduces neuroinflammation in experimental subarachnoid hemorrhage. *Journal of Surgical Research* (In press).
- Zioudrou C, Streaty R.A, Klee W.A. (1979). Opioid peptides derived from food proteins. The exorphins. *Journal of Biological Chemistry*. 254, 2446-2449.
- Zucht H.D, Raida M, Aderman K, Magert H.J, Forssmann W.G. (1995). Casocidin-I: a casein- α S2 derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Letters*. 372 185-188.
- Zukowski M. M. (1992). Production of commercially valuable products. In Doi R.H. & Gloughlin M.Mc (Eds.), *Biology of bacilli: Application to industry*. London: Butterworth-Heinemann. pp 311-337.

