

UNIVERSITÉ DE LILLE I – SCIENCES ET TECHNOLOGIES
École doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l’Environnement

THÈSE DE DOCTORAT
Spécialité : Ingénierie des Fonctions Biologiques

Présentée par

Rémi PRZYBYLSKI

Pour l’obtention du grade de

DOCTEUR DE L’UNIVERSITÉ DE LILLE I

Stratégie de production, de fractionnement et de valorisation du peptide antimicrobien α 137-141 à partir de l’hémoglobine et du cruor bovins

Préparée au laboratoire :

Institut Charles Viollette – ICV – EA 7394

Laboratoire des Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien

ProBioGEM – IUT « A », Polytech’Lille, Villeneuve d’Ascq

Soutenue publiquement le 23 mai 2016, devant le jury composé de :

Mme Naïma Nedjar	Professeur (Lille I – ICV)	Directrice de thèse
Mr Pascal Dhulster	Professeur (Lille I – ICV)	Co-directeur de thèse
Mme Loubna Firdaous	Maître de conférences (Lille I – ICV)	Co-encadrante de thèse
Mr Pascal Degraeve	Professeur (Lyon I – BioDyMIA)	Rapporteur
Mr Laurent Bazinet	Professeur (Laval – INAF)	Rapporteur
Mr Romain Kapel	Maître de conférences HDR (Nancy – LRGP)	Président

Résumé

Le cruor bovin, déchet des abattoirs, est principalement composé d'hémoglobine, protéine riche en peptides antimicrobiens après hydrolyse par la pepsine porcine. L'objectif de cette thèse est de proposer une stratégie de valorisation de ce co-produit en produisant, séparant puis appliquant comme conservateur naturel de la viande un peptide antimicrobien : l' α 137-141.

L'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine purifiée a été validée sur le cruor (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11) et a permis de produire rapidement l' α 137-141 selon un mécanisme *zipper*. L'hydrolyse enzymatique a également été réalisée à hautes concentrations en hémoglobine (1, 2, 5 et 8%, p/p), permettant de produire l' α 137-141 à grande échelle.

La séparation de l' α 137-141 par électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration (EDUF) a ensuite été effectuée selon plusieurs degrés d'hydrolyse, mettant en avant que celui de 5% était le plus favorable à l'enrichissement de l' α 137-141. Pour augmenter sa pureté, le maintien du pH au sein de l'EDUF a permis à pH 9 d'enrichir l' α 137-141 d'un facteur 75. Afin de valoriser au mieux le co-produit, la concentration peptidique a ensuite été augmentée jusqu'à 8% (p/p), permettant de récupérer jusqu'à 4 fois plus d' α 137-141.

Cette dernière fraction a montré une activité conservatrice de la viande hachée luttant contre le rancissement et la prolifération des bactéries, moisissures et levures jusqu'à 14 jours à 4°C, d'une manière aussi efficace que l'hydroxytoluène butylé (BHT), conservateur synthétique, prouvant que les fractions d'EDUF enrichies en α 137-141 sont de prometteurs conservateurs naturels de la viande et dérivées.

Mots-clés : conservateur, cruor, électrodialyse, hémoglobine bovine, hydrolyse, peptides antimicrobiens, ultrafiltration

Abstract

Bovine cruor, a slaughterhouse by-product, is mainly composed by hemoglobin which is a rich source of antimicrobial peptides obtained by pepsic hydrolysis. The goal of this thesis is to valorize cruor by producing, separating and applying an antimicrobial peptide (α 137-141) as a natural preservative on meat.

Cruor hydrolysis showed the same enzymatic mechanism *zipper* and the same peptide production as observed during purified hemoglobin hydrolysis with the used parameters (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11). Hydrolysis produced rapidly the α 137-141 and was carried out at high hemoglobin concentrations (1, 2, 5 and 8% w/v).

Several hydrolysis degrees (DH) were investigated on the selective α 137-141 separation by electro dialysis with ultrafiltration membranes (EDUF). The results showed that the most appropriated DH was of 5% to enrich fractions in α 137-141. After that, the increase of α 137-141 purity was studied by pH controlling. The best control was at pH 9 with a α 137-141 purity increase of 75-folds. Then, the increase of feed peptide concentration (from 1 to 8% w/v) was studied on the α 137-141 recovery to obtain the best by-product valorization. The 8% feed peptide concentration allowed a recovered concentration increase of 4-folds.

This fraction was applied on meat as preservative and showed powerful antimicrobial effects against bacteria, yeasts and molds during 14 days under 4°C and a reduction of lipid oxidation to protect meat against rancidity. These effects were close to those of butylated hydroxytoluene (BHT), known to protect food, and showed that the fractions enrich in α 137-141 by EDUF would be promising and natural preservative to protect meat and its derivatives.

Keywords: antimicrobial, bovine hemoglobin, cruor, electro dialysis, hydrolysis, peptides, preservative, ultrafiltration

Remerciements

Naturellement, mes premiers remerciements vont pour la Professeure Naïma Nedjar, Directrice de thèse, qui a su m'accorder une confiance sans faille et m'encadrer avec optimisme et enthousiasme. Je lui suis profondément reconnaissant pour son encadrement scientifique et humain, et la construction d'une ambiance de travail sereine et dynamique. J'espère pouvoir un jour imiter sa rigueur et sa passion pour ce métier !

Je remercie bien évidemment le Professeur Pascal Dhulster, Directeur de l'Institut Charles Viollette et Co-directeur de thèse, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire lors de mon stage de Master 2, puis lors du Doctorat. Merci pour l'engagement porté à la thèse, pour la constante vision des perspectives et pour la confiance accordée sur d'autres projets !

Je remercie également la Dr Loubna Firdaous, Co-encadrante de thèse, pour l'enseignement en génie des procédés et les heures passées à y apporter ses analyses.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude envers le Dr Romain Kapel, Président du jury, qui a su guider les discussions générées avec expertise et enthousiasme. De même, je remercie vivement les Professeurs Laurent Bazinet et Pascal Degraeve, qui ont jugé ce travail en tant que rapporteurs, avec précision, spontanéité et bonne humeur.

Je remercie fortement le Professeur Jean-François Goossens de m'avoir accueilli au CUMA, avec sympathie et grand intérêt pour notre projet. Bien évidemment, j'exprime toute ma fierté d'avoir pu travailler aux côtés du Dr Mostafa Kouach. Merci de m'avoir initié au monde des M+H⁺ et de m'avoir enseigné ta patience face à tant de complexité d'analyse.

Les milliers d'heures passées à ProBioGEM m'encouragent à vivement remercier des dizaines de personnes dont la sympathie a créé de si mémorables moments. Tout d'abord, un grand merci à Krasimir Dimitrov de m'avoir initié à la recherche durant mon stage de Master 2 avec l'aide de Leandro Galvan D'Alessandro. Puis, je pense à l'équipe du bureau d'à-côté, Rénato Froidevaux, Rozenn Ravalec, Benoît Cudennec et Christophe Flahaut. J'ai aussi une forte pensée pour Corinne Boistel, technicienne au laboratoire ProBioGEM, qui se démène sans

compter et sans ménager ses efforts. Je salue aussi le dévouement de Gabrielle Châtaigné, pour les nombreuses heures passées en salle HPLC. Bien sûr, les remerciements seraient incomplets sans une tape amicale à Max Béchet, heureux retraité ! J'ai également en tête les nombreuses heures passées au hall de l'IUT à enseigner les procédés, en compagnie de Bertrand Fertin, pédagogue hors-pair et puits de sciences sans fond, et d'Anne Fertin, avec qui j'ai pris tant de plaisir à enseigner aux pré-options !

Bien entendu, je remercie infiniment mes trois p'tits soldats, Fouzia, Geneviève et Nicolas, qui m'ont aidé sans retenir leurs efforts et ont bravé bien des tempêtes bactériennes. C'est grâce à vous trois que j'ai obtenu de si encourageants résultats en microbio' !

La thèse n'aurait pas été si agréable sans les dizaines d'autres doctorants croisés dans la surcharge viscérale de notre bureau. Je pense d'abord aux anciens qui m'ont intégré sans attente et notamment Cédric, Omar, Faïza, Assaâd, Adil et Rafik. Plus que simples collègues, je remercie vivement mes amis Juliette, Alexandra, Antoine, Cyril, Mike et Amirouche, qui ont participé à rendre chaque moment empreint d'une certaine folie. J'oublie volontairement mon indispensable ami Kalim, tantôt bonne conscience ou parfois Tic, mais souvent Tac. La thèse aura fait de nous des hommes meilleurs ! Je salue aussi le reste de l'équipe : Barbara, Delphine(s), Yazen, Qassim, Ameen, Alaa, Ahmed, Sabine, Oumayma, Paola, Debarun, Maxime, Sandy, Justine, Mahammed et Luiz. Bon courage à vous !

Je ne peux que clôturer mes remerciements en ayant une immense pensée pour mes amis, Antoine, Julien, Samy, Rasha, Quentin et Nicolas, pour tout et rien. J'embrasse également le reste du groupe, Mehdi, Marjorie, Guillaume, Delphine, Fanny, Tonxs et Anthony. J'adresse enfin une chaleureuse pensée à l'équipe d'Etherval, et notamment Franck, Déa, Jérôme, Amandine, Alain, Edwige et Christian. Merci mes amis pour tous ces moments faits de hasard et d'Irlandais, de Connemara ou de Louise Attaque, de Paris ou de Bollaert, en bref : tous ces moments vitaux !

Finalement, je remercie sans retenue ma p'tite famille adorée, ma Maman et ma Grande Sœur, Sabine, pour leur indestructible et constant soutien. J'ai une forte pensée pour mon p'tit Papa, à qui je dédie modestement l'ensemble de ce travail. Enfin, j'ai gardé la meilleure pour la fin, je remercie ma p'tite Pam' parce qu'on est les meilleurs et on le sait bien !

Table des matières

Table des matières

Table des matières	9
Introduction générale.....	19
Contexte de l'étude et problématique	21
Des enjeux de la valorisation industrielle des déchets agroalimentaires à une consommation plus naturelle	21
Du co-produit de l'industrie à la maîtrise de la protéolyse pour la production en masse de peptides bioactifs.....	23
De la production à la séparation de peptides-cible d'intérêt	26
Problématique et enjeux de la thèse	27
Hiérarchisation du manuscrit	28
Synthèse bibliographique	31
1.1. Hémoglobine et cruor bovins : présentation du co-produit de l'industrie agroalimentaire à valoriser	33
1.1.1. Intérêts et perspectives de valorisation du sang bovin.....	33
1.1.2. Présentation générale de l'hémoglobine bovine	35
1.1.3. Structure de la chaîne alpha de l'hémoglobine bovine	35
1.1.4. Structure de la chaîne bêta de l'hémoglobine bovine	36
1.1.5. Structure et fonction de l'hème.....	37
1.2. La pepsine porcine comme outil de production peptidique.....	38
1.2.1. Les pepsines comme outils biotechnologiques	38
1.2.2. Présentation générale de la pepsine porcine	39
1.2.3. Structure de la pepsine porcine	39
1.2.4. Spécificité et mécanisme d'action de la pepsine porcine.....	40
1.2.5. Principe catalytique de la pepsine sur l'hémoglobine bovine.....	41
1.3. Peptides bioactifs issus de l'hémoglobine bovine	42
1.3.1. Historique et potentiels des peptides bioactifs issus de l'hémoglobine bovine	42
1.3.2. Peptides opioïdes issus de l'hémoglobine bovine.....	48
1.3.3. Peptides hématopoïétiques issus de l'hémoglobine bovine	49

1.3.4. Peptides anti-hypertenseurs, potentialisateurs de la bradykinine, hypolipidémifiants, coronaro-constricteurs et stimulateurs de la croissance bactérienne issus de l'hémoglobine bovine	50
1.3.5. Peptides antimicrobiens issus de l'hémoglobine bovine.....	51
1.3.5.1. Potentiels et perspectives d'application des peptides antimicrobiens.....	51
1.3.5.2. Structure des peptides antimicrobiens.....	53
1.3.5.3. Caractéristiques physico-chimiques des peptides antimicrobiens	56
1.3.5.4. Mécanismes d'action des peptides antimicrobiens	59
1.3.5.5. Le peptide actif α 137-141 : un peptide antimicrobien original.....	68
1.4. Stratégies de séparation sélective de peptides issus d'hydrolysats peptidiques	71
1.4.1. Fractionnement d'hydrolysats : point de vue général	71
1.4.2. Fractionnement d'hydrolysats par extraction par solvant.....	74
1.4.3. Fractionnement d'hydrolysats par procédés chromatographiques.....	74
1.4.4. Fractionnement d'hydrolysats par procédés membranaires.....	75
1.4.4.1. Procédés membranaires : point de vue général	75
1.4.4.2. Fractionnement d'hydrolysats par ultrafiltration.....	77
1.4.4.3. Fractionnement d'hydrolysats par électro-ultrafiltration	78
1.4.4.4. Fractionnement d'hydrolysats par électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration	80
Matériels et méthodes : méthodes d'analyse peptidique	85
2.1. Analyse en Chromatographie Liquide Haute Performance en Phase Inverse (CLHP-PI)	87
2.1.1. Principe	87
2.1.2. CLHP-PI : équipement.....	89
2.1.3. Protocole d'analyse	89
2.1.4. Comparaison spectrale et estimation de la pureté d'un pic.....	90
2.1.5. Quantification de l' α 137-141	91
2.2. Analyse des peptides par spectrométrie de masse	92
2.2.1. Généralités de l'analyse par spectrométrie de masse.....	92
2.2.2. Identification des peptides par MALDI-TOF	93
2.2.2.1. Principe du MALDI-TOF.....	93
2.2.2.2. Équipement, logiciel utilisé et protocole.....	94
2.2.3. Identification des peptides par LC-MS/MS	95
2.2.3.1. Principe de la LC-MS/MS.....	95
2.2.3.2. Équipement, logiciels utilisés et protocole.....	96

Production du peptide actif α 137-141 au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine et du cruor bovins..... 99

3.1. Matériels et méthodes spécifiques : étude de la production pepsique du peptide actif α 137-141	101
3.1.1. Dosage de l'hémoglobine bovine en solution et préparation de la solution-mère.....	101
3.1.2. Dosage de l'activité enzymatique de la pepsine en solution.....	102
3.1.3. Préparation des hydrolysats peptidiques	103
3.1.4. Détermination du degré d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine.....	103
3.1.5. Détail des calculs de production du peptide actif α 137-141	104
3.2. Mécanisme réactionnel de l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine bovine par la pepsine porcine.....	105
3.2.1. Relation entre temps et degré d'hydrolyse.....	105
3.2.2. Mécanisme enzymatique mis en jeu	105
3.3. Obtention du peptide actif α 137-141 au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine et du cruor bovins.....	108
3.3.1. Obtention enzymatique du peptide actif α 137-141	108
3.3.2. Identification du peptide actif α 137-141	111
3.3.3. Caractérisation du peptide actif α 137-141	112
3.3.4. Effet de l'augmentation de la concentration initiale en hémoglobine bovine sur l'obtention enzymatique du peptide actif α 137-141.....	113
3.4. Quantification de la production du peptide actif α 137-141	118
3.5. Sélection et caractérisation des hydrolysats peptidiques pour la séparation sélective de l' α 137-141	121
3.5.1. Sélection des hydrolysats peptidiques	121
3.5.2. Identification des peptides au sein des hydrolysats sélectionnés.....	121
Conclusions.....	140
Production scientifique	141

Séparation sélective du peptide actif α 137-141 par électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration..... 143

4.1. Matériels et méthodes spécifiques : équipement de l'électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration et protocoles d'étude.....	145
4.1.1. Décoloration des hydrolysats d'hémoglobine et de cruor bovins	145
4.1.2. Pilote d'électrodialyse.....	146
4.1.3. Protocole d'étude de l'influence du degré d'hydrolyse	147

4.1.4. Protocole d'étude de l'influence du pH et de l'influence de la concentration en peptides au sein de la solution d'alimentation	148
4.1.5. Protocole de nettoyage	148
4.1.6. Détails des calculs.....	149
4.2. Décoloration des hydrolysats peptidiques	149
4.3. Étude de l'influence du degré d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine sur la séparation sélective du peptide actif α 137-141.....	152
4.3.1. Étude des paramètres électrodialytiques	152
4.3.1.1. Conductivité et pH	152
4.3.1.2. Intensité du courant et résistance apparente du système	158
4.3.2. Influence du degré d'hydrolyse sur la migration peptidique totale	160
4.3.3. Influence du degré d'hydrolyse sur la migration du peptide actif α 137-141.....	167
4.4. Effet du contrôle du pH sur la séparation sélective du peptide actif α 137-141.....	169
4.4.1. Contrôle du pH à 4.7	170
4.4.1.1. Évolution des paramètres électrodialytiques : pH, conductivités et intensité du courant électrique	170
4.4.1.2. Effet du contrôle du pH à 4.7 sur la migration peptidique totale.....	172
4.4.1.3. Effet du contrôle du pH à 4.7 sur la récupération du peptide actif α 137-141	181
4.4.2. Augmentation de la pureté en peptide actif α 137-141 au sein de la solution de récupération par contrôle du pH à 6.5 et 9	183
4.4.2.1. Évolution des paramètres électrodialytiques : conductivités et intensité du courant électrique	183
4.4.2.2. Effet du contrôle du pH à 6.5 et 9 sur la récupération totale en peptides	186
4.4.2.3. Effet du contrôle du pH à 6.5 et 9 sur la récupération du peptide actif α 137-141	189
4.5. Effet de l'augmentation de la concentration peptidique sur la séparation sélective du peptide actif α 137-141.....	191
4.5.1. Évolution des paramètres électrodialytiques selon la concentration peptidique de la solution d'alimentation.....	192
4.5.2. Effet de la concentration peptidique de l'hydrolysats sur la migration totale en peptides	194
4.5.3. Effet de la concentration peptidique de l'hydrolysats sur la récupération sélective du peptide actif α 137-141.....	197
Conclusions.....	200
Production scientifique	201

Valorisation des peptides actifs comme potentiels conservateurs des aliments.....	203
5.1. Matériels et méthodes spécifiques : mise en évidence de l'activité antimicrobienne et application comme conservateurs alimentaires	205
5.1.1. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne.....	206
5.1.1.1. Souches bactériennes utilisées	206
5.1.1.2. Préparation des pré-cultures	206
5.1.1.3. Réalisation du test antimicrobien sur boîte de Pétri.....	207
5.1.2. Application des peptides actifs comme conservateurs alimentaires	208
5.1.2.1. Préparation des échantillons et suivi de l'expérience.....	208
5.1.2.2. Évaluation de l'oxydation des lipides	209
5.1.2.3. Analyses microbiologiques	209
5.2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne du peptide actif α 137-141 et de la fraction d'EDUF obtenue à pH 9 et une concentration initiale en hémoglobine bovine de 8% (p/v).....	210
5.3. Application du peptide α 137-141 au sein d'une matrice alimentaire de type « viande hachée »	213
5.3.1. Évolution de l'oxydation des lipides durant le stockage	213
5.3.2. Croissances des microorganismes au sein de la viande durant le stockage	214
5.4. Application de la fraction d'EDUF enrichie en α 137-141 sur matrice alimentaire de type « viande hachée »	218
5.4.1. Évolution de l'oxydation des lipides durant le stockage	218
5.4.2. Croissances des microorganismes au cours du stockage de la viande.....	219
Conclusions.....	226
Production scientifique	227
Conclusions et perspectives	229
Conclusions générales et synthèse du manuscrit	231
Perspectives.....	233
Références	237
Liste des figures	257
Liste des tableaux	265
Annexes	269

Introduction générale

Introduction générale

L'introduction générale expose les contextes social et scientifique de l'étude afin d'en extraire la problématique principale, fil conducteur de toute la démarche expérimentale globale entreprise. La présentation de cette dernière y fait suite afin de souligner l'apparente hiérarchisation chronologique du manuscrit.

Contexte de l'étude et problématique

Des enjeux de la valorisation industrielle des déchets agroalimentaires à une consommation plus naturelle

De nos jours, les besoins et habitudes de consommation alimentaire engendrent un constat alarmant. D'une part, les ressources pouvant être transformées s'amenuisent et d'autre part, l'industrialisation mène à une accumulation des déchets (Segré *et al.*, 2012 ; Gunders, 2012). Pour exemple, l'Union Européenne produit à elle seule plus de 90 millions de tonnes de déchets alimentaires par an dont 38% sont imputables à l'industrie agroalimentaire (Pfaltzgraff *et al.*, 2013). Leurs potentiels sont pourtant sous-estimés et sous-exploités et de nombreux déchets peuvent aujourd'hui prétendre à une seconde vie. Ils constituent, de par leur richesse en composés encore actifs, de nouvelles ressources au haut potentiel de valorisation.

Selon Pfaltzgraff *et al.* (2013), la valorisation des déchets est un enjeu capital pour tendre vers une économie durable où la minimisation de la production de déchets non-renouvelables serait une priorité. Les avantages de ce modèle naissant de bio-raffineries sont pluriels et permettent une sensibilisation à plusieurs étages. Le premier impact serait environnemental avec la réduction des déchets non exploitables et la diminution de l'empreinte carbone grâce au réinvestissement de ces nouvelles ressources comme matériel de base (Gwehenberger *et al.*, 2008). De ce fait, il en découlerait des satisfactions économiques non négligeables. Les coûts de l'entreposage et du traitement des déchets générés seraient abaissés, tout en permettant l'apport de valeur ajoutée à des produits voués auparavant à la destruction

(Bah *et al.*, 2013; Lafarga *et al.*, 2014). En dernier lieu, l'impact social serait le reflet populaire de la démarche entreprise. Tout d'abord, ceci répondrait à une demande actuelle des consommateurs et satisferait les clients, de plus en plus sensibles et sensibilisés à ce type d'initiative. Ainsi, l'image de l'industrie agroalimentaire s'en trouverait améliorée, tout en permettant, à terme, d'innover dans le secteur technologique et d'accroître sa capacité possible d'emplois (Pfaltzgraff *et al.*, 2013).

D'une manière appliquée, l'exploitation de ce type de ressources renouvelables à partir de déchets de l'industrie agroalimentaire est une sérieuse alternative, notamment aux énergies fossiles avec le recyclage des huiles usagées (Corma *et al.*, 2011; Tuck *et al.*, 2012). Le concept de bio-raffineries commence donc à s'illustrer parfaitement pour tendre vers l'idolâtré « zéro déchet » en réinvestissant les co-produits en bio-carburants (Clark *et al.*, 2012).

Toutefois, la création de nouveaux produits ne concerne pas uniquement des usages non-alimentaires. Par exemple, de nombreux déchets sont encore riches en protéines (Goot *et al.*, 2016). Ces dernières, par l'utilisation de protéases adaptées, peuvent générer des peptides possédant une bio-activité (Castro *et al.*, 2015; Hartmann *et al.*, 2007). Leurs usages sont aujourd'hui largement sollicités, que ce soit en applications thérapeutiques ou pharmaceutiques (Agyei et Danquah, 2011; Danquah et Agyei, 2012; Saadi *et al.*, 2015) ou en usages alimentaires à visée animale (Martinez-Alvarez *et al.*, 2015) ou humaine pour leurs divers effets nutraceutiques (Hartmann *et al.*, 2007; Lafarga *et al.*, 2014; Li-Chan, 2015). De plus, ces composés d'origine naturelle suscitent un engouement croissant auprès du consommateur, souhaitant de plus en plus manger sainement, et éviter les additifs synthétiques chimiques dont les effets à longs termes sont parfois mal connus ou controversés (Agyei *et al.*, 2011; Bauer *et al.*, 2001; Imaida *et al.*, 1983; Lanigan *et al.*, 2002). En 400 ans avant Jésus-Christ, Hippocrate proclamait déjà « *que l'alimentation soit ta première médecine* », ce qui prend tout son sens aujourd'hui avec un appel pour un retour vers une consommation plus saine et plus naturelle. De ces aliments possédant une bio-activité en a découlé le terme d'« aliments fonctionnels », définis comme offrant, sous une forme concentrée, un principe actif visant à améliorer la santé (Zeisel, 1999).

En dépit de toute homologation spécifique actuelle en vigueur au sein de l'Union Européenne, l'emploi et la production des peptides comme aliment fonctionnel (ou nutraceutique) demeurent en pleine ascendance. En France, la société Copalis, basée à Le Portel, commercialise sous la forme d'hydrolysats actifs différents compléments alimentaires visant à rééquilibrer l'organisme, à partir de dérivés de produits de la mer. Parmi ceux-ci, le Protizen® se revendique comme un antistress ou le Nutripeptin® peut être recommandé pour la

réduction du stockage des graisses dans le cadre d'un programme de contrôle du poids. Le laboratoire Biothalassol (Mondeville, France) produit le Fortidium[®], préservant et renforçant le système nerveux, lui aussi réalisé à partir d'hydrolysats de poissons. Également, la caséine, probablement la protéine la plus étudiée au niveau de ses activités et applications (Clare *et al.*, 2000; Korhonen, 2009; Korhonen *et al.*, 2003), a fait l'objet de nombreux nutraceutiques. L'un des plus connus est le ProDiet F200[®] conçu par la société Ingrédia (Arras, France), visant à réguler le poids.

La liste ne peut être exhaustive tant le marché est important, même en se basant uniquement sur notre territoire. Selon une étude intitulée « *Le marché des aliments santé – Aliments fonctionnels, diététiques et compléments alimentaires vers de nouveaux business models* » réalisée par Percepta, division du groupe Xerfi, ce marché reste toujours en plein essor. Ainsi, en 2013 et 2014, le segment des aliments fonctionnels a connu deux croissances successives de 4.0%. Les prédictions pour les années 2015 et 2016 tableraient pour une croissance supplémentaire de 3.5% par an. Ceci témoigne donc d'un réel intérêt des consommateurs pour ce type de produits.

L'ensemble de ces considérations pousse donc à une refonte ou une évolution des pensées de conception et de distribution des produits alimentaires afin de s'adapter aux nouvelles demandes de consommation.

Du co-produit de l'industrie à la maîtrise de la protéolyse pour la production en masse de peptides bioactifs

En théorie, toute source protéique peut prétendre à servir de base pour la production d'aliments fonctionnels. La génération de peptides, fragments de protéines, permet l'obtention d'activités diverses par emploi de protéases, outil indispensable à l'industrie biotechnologique actuelle (Tavano, 2013). La production de peptides se réalise majoritairement au sein de réacteurs par addition de l'enzyme adaptée à la génération d'un produit spécifique à partir d'un substrat donné (Agyei et Danquah, 2011; Korhonen, 2009; Lafarga *et al.*, 2014; Li-Chan, 2015).

Pourtant, d'un point de vue pratique, il convient de sélectionner une source de base abondante et facilement accessible dans l'optique d'obtenir les meilleures retombées possibles suite à sa re-valorisation. Qui plus est, il est nécessaire, en vue des applications futures, de posséder une connaissance suffisante du co-produit afin d'en tirer le meilleur profit.

À titre d'exemple, la production de peptides bioactifs à partir de produits laitiers est particulièrement bien documentée. L'hydrolyse enzymatique des caséines permet la récupération d'activités variées ayant des effets bénéfiques sur les systèmes cardiovasculaire, digestif, endocrinien, immunitaire et nerveux (Clare *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2007; Korhonen, 2009; Korhonen *et al.*, 2003). Leurs potentiels en tant qu'agents antimicrobiens, anti-cariogènes, anti-hyperthrombiques ou opioïdes sont également le fruit d'un grand intérêt auprès des industriels, commercialisés sous la forme d'hydrolysats en poudre comme complément alimentaire ou incorporés au sein de fromages, de yaourts ou de chewing-gums (Korhonen *et al.*, 2006).

À l'échelle industrielle, *via* l'emploi de protéases, les mêmes types d'activités peuvent être retrouvés dans de nombreuses sources telles que le blanc d'œuf (Liu *et al.*, 2010) ou le soja (Tsou *et al.*, 2010).

Il peut être constaté que toutes les ressources, animales ou végétales, suscitent de l'intérêt. C'est ainsi que depuis plusieurs années, l'industrie de la viande cherche à convertir ses co-produits en d'autres ressources afin de lutter contre un véritable problème d'ordre environnemental et sanitaire. D'une manière globale, de nombreuses voies de valorisation des déchets sont déjà mises en place. Au niveau du non-comestible, les principales conversions des déchets concernent les filières du cuir, des engrais, du biodiesel et du plastique (Bah *et al.*, 2013; Mora *et al.*, 2014). Pourtant, les déchets des abattoirs possèdent encore une grande richesse en protéines et constituent des substrats idéaux pour la protéolyse, ce qui est notamment le cas du sang. Sa grande disponibilité et sa relative homogénéité en font un cas d'étude prometteur pour la production et la valorisation de composés bioactifs et principalement dans le cas du sang bovin, le plus abondant (Bah *et al.*, 2013; Lafarga *et al.*, 2014).

Le sang bovin issu des abattoirs est essentiellement subdivisé en deux parties après centrifugation. La partie incolore, le plasma, représente environ 60% du volume du sang et peut être utilisée en pharmaceutique, notamment pour sa richesse en thrombines, fibrinogènes ou sérum albumine (Bah *et al.*, 2013). La seconde partie représente jusqu'à 40% du volume sanguin et est responsable de la couleur rouge du sang. Elle est appelée « cruor » et contient principalement de l'hémoglobine, considérée comme déchet agricole, dont l'hydrolyse enzymatique est source de nombreux peptides à activités biologiques (Adje *et al.*, 2011a; Gomes *et al.*, 2010; Nedjar-Arroume *et al.*, 2008). Les activités générées sont variées, telles que les activités opioïde (Lignot *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 1997b), hématopoïétique (Vercaigne-Marko *et al.*, 2000) ou encore anti-hypertensive (Adje *et al.*, 2011b). Néanmoins, la plus décrite reste l'activité antimicrobienne (Choisnard *et al.*, 2002; Daoud *et al.*, 2005; Froidevaux *et al.*,

2001; Nedjar-Arroume *et al.*, 2006). Cette dernière est d'autant plus intéressante que les peptides la possédant pourraient se positionner comme conservateurs naturels des aliments une fois incorporés au sein d'une matrice alimentaire, de type viande hachée ou ses dérivés. En l'état actuel de la littérature scientifique, aucune étude ne discute de cette application des peptides dérivés de l'hydrolyse de protéines. En revanche, certaines font déjà état d'alternatives aux additifs chimiques des conservateurs à partir d'extraits de plantes (Chaâbane *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2013).

Au sein du laboratoire ProBioGEM, équipe constitutive de l'Institut Charles Violette, l'hémoglobine bovine représente un substrat protéique modèle. Si l'attrait pour les bio-activités générés demeure indiscutable, l'obtention de peptides actifs reste extrêmement sensible. En effet, l'hydrolyse de l'hémoglobine demeure un processus irréversible générant des populations peptidiques variées selon des paramètres opératoires pluriels (pH, température...) dont eux-mêmes influencent la sélectivité et la spécificité de l'enzyme pour son substrat (Linderstrom-Lang, 1953; Saadi *et al.*, 2015). En conséquence, un peptide donné et recherché ne peut être qu'un intermédiaire dans une cascade de réactions dont il convient d'en connaître l'enchaînement (Hedhili *et al.*, 2015; Hedhili *et al.*, 2014). De plus, à ces difficultés de compréhension de mécanisme de production, s'ajoutent des inconvénients préparatoires propres à la nature de l'hydrolysat lui-même. Les peptides d'intérêt sont souvent générés en concentration faible, dépendante des conditions d'hydrolyse-mêmes, imposant une production de peptides multiples aux caractéristiques physico-chimiques variées et variables selon l'état d'avancement de la réaction (Linderstrom-Lang, 1952, 1953).

Ces considérations mènent donc à penser que l'orientation de la sélectivité réactionnelle pourrait permettre une production spécifique de peptides bioactifs dont les caractéristiques physico-chimiques seraient proches. Ceci a par exemple été effectué pour la préparation de peptides opioïdes au sein d'un réacteur continu avec extraction par le biais d'un solvant organique (Froidevaux *et al.*, 2006). Une autre approche consistait à influencer directement la structure de l'hémoglobine initiale par l'ajout d'alcool (Adje *et al.*, 2011a). Toutefois, ces approches expérimentales peuvent susciter des problématiques d'un point de vue environnemental. L'emploi de solvants et les soucis de recyclage de ceux-ci rendent difficiles les considérations économiques pour ces techniques aux vues de la faible quantité de matière récupérée à une échelle donnée, facteur forcément limitant pour une commercialisation des peptides récupérés (Agyei *et al.*, 2011; Korhonen *et al.*, 2006; Woodley *et al.*, 2013).

Dans le cadre de la valorisation d'un co-produit protéique agroalimentaire sous la forme de peptides bioactifs, il convient donc de posséder une connaissance certaine de la source de

départ, tant au niveau de ses caractéristiques initiales que des mécanismes réactionnels impliqués, mais aussi d'estimer précisément les produits obtenus grâce à une méthode de détection et de dosage adaptée. Il est aussi nécessaire d'envisager une transformation rapide et importante du co-produit en prenant compte des paramètres pouvant influencer la productivité du procédé, tels que la durée de protéolyse ou la concentration de substrat traité. Au final, la richesse de l'hydrolysate obtenu, pouvant comporter plusieurs centaines de peptides, est à considérer comme facteur primordial pour la recherche d'une technique de séparation adaptée avant tout aux peptides d'intérêts souhaitant être récupérés.

De la production à la séparation de peptides-cible d'intérêt

Un hydrolysate représente un véritable challenge à séparer. Lui-même pouvant être source globale de plusieurs bioactivités, il est nécessaire d'en extraire le peptide ou fraction d'intérêt afin d'en obtenir une valorisation certaine. Également, il est admis qu'un peptide pur est davantage actif qu'une fraction plus importante, où son enrichissement est faible (Agyei et Danquah, 2011; Danquah et Agyei, 2012). Il en découle donc que plus la pureté du produit obtenu est importante, plus la valeur ajoutée du produit augmente.

Toutefois, la richesse de l'hydrolysate d'hémoglobine bovine contraint à différents heurts dans l'approche séparative. Comme pour tout procédé de ce type, le défi est d'arriver à un équilibre optimal entre rendement de production, sélectivité de séparation et coût. Il est donc indispensable de maîtriser ces aspects, sachant qu'il est estimé que plus de 70% des coûts du développement d'un tel produit en industrie se situent dans cette opération (Agyei et Danquah, 2011).

D'un point de vue résolutif, les techniques chromatographies et capillaires sont les plus efficaces et permettent jusqu'à l'isolement d'un peptide donné, selon différents caractères imposés par l'utilisateur, tels que l'hydrophobie et la masse molaire du peptide dans le cas d'une Chromatographie Liquide Haute Performante en Phase Inverse (CLHP-PI) (Agyei et Danquah, 2011; Castro *et al.*, 2015). Néanmoins, les faibles débits imposés et volumes traités impliquent difficilement son utilisation dans un cadre industriel en termes de productivité, et l'emploi de solvants, coûteux, tend à souligner cet aspect.

Généralement, la stratégie de purification d'un peptide consiste en une succession d'étapes impliquant différentes techniques et notamment : l'ultrafiltration, l'échange d'ions, la gel filtration puis la chromatographie liquide (Agyei et Danquah, 2011; Galanakis, 2012;

Lafarga *et al.*, 2014; Saadi *et al.*, 2015). Pour des raisons économiques, les contraintes engendrées par cet enchaînement imposent bien souvent de limiter le processus à un enrichissement du peptide plutôt qu'à son isolement.

Afin de réduire le temps et le coût de ces méthodologies, les méthodes membranaires représentent une véritable alternative pour la séparation de peptides bioactifs (Bazinet et Firdaous, 2013; Saxena *et al.*, 2009). N'employant pas de solvant, elles permettent une séparation sélective des composés d'un milieu liquide donné par leur passage au travers d'une membrane grâce à l'application d'une force motrice. Selon le procédé, cette dernière peut être un gradient de pression comme dans le cas de l'ultrafiltration, souvent utilisée en routine afin d'enrichir un hydrolysate en peptides actifs (Castro *et al.*, 2015). Également, l'application supplémentaire d'un champ électrique a permis d'augmenter la sélectivité de ce procédé vis-à-vis des peptides récupérés. Enfin, une technologie hybride consiste à appliquer un champ électrique comme unique force motrice au sein d'une cellule d'électrodialyse, sans gradient de pression, afin de ne faire migrer que les composés chargés au travers d'une membrane d'ultrafiltration (Bazinet et Firdaous, 2013).

L'ensemble de ces procédés membranaires tend vers une mise en œuvre simple, avec une capacité de *scale-up* facilitée et la possibilité d'effectuer des séparations à partir de nombreuses sources potentielles de déchets. De plus, il est possible d'envisager cette procédure comme unique étape de séparation pour arriver au produit fini, sans altérer les activités des composés récupérés.

Au sein d'un contexte se souhaitant le plus proche des considérations environnementales actuelles, ces dernières techniques paraissent donc tout à fait adaptées à l'exploitation d'un déchet de l'industrie agroalimentaire comme nouvelle ressource.

Problématique et enjeux de la thèse

De l'ensemble de ces considérations découle une interrogation majeure.

Le cruor, co-produit des abattoirs, peut-il servir de matière première pour la production de peptides antimicrobiens se positionnant comme conservateurs naturels des aliments ?

L'étude se porte plus particulièrement sur un peptide : le peptide actif α 137-141, dont les effets antimicrobiens le caractérisent comme un potentiel candidat pour intégrer les matrices alimentaires (Catiau *et al.*, 2011b).

Les enjeux sont donc pluriels. Ils consistent à aborder l'ensemble des thématiques scientifiques propres à la valorisation de ce co-produit. De ce fait, il convient dans un premier temps de participer à la maîtrise de la protéolyse du cruor pour la production du peptide d'intérêt. Dans un second temps, il faut envisager le fractionnement de l'hydrolysate complexe *via* une technologie séparative industriellement transposable et permettant la récupération de peptides en quantité suffisante pour permettre leur valorisation. Enfin, l'étude successive de leur impact microbiologique au sein d'une matrice alimentaire permettra de statuer sur l'efficacité et la faisabilité globale de la démarche entreprise.

Hierarchisation du manuscrit

Faisant suite à cette introduction générale, le premier chapitre se propose de présenter la « *Synthèse bibliographique* » du projet de thèse. La thèse s'appuyant à la fois sur les domaines du génie enzymatique, du génie des procédés et de la microbiologie, ce chapitre illustre un bref état de l'art des trois composantes du projet. Le premier axe présente l'hémoglobine bovine et le co-produit des abattoirs, le cruor. Il s'attache également à traiter de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine porcine, modèle d'étude au sein du laboratoire ProBioGEM, en présentant les peptides bioactifs en étant issus par le biais d'un second axe bibliographique. Ce dernier propose aussi une vision des différentes activités biologiques décrites, avec un *focus* particulier sur les peptides antimicrobiens, leurs potentielles applications et modes d'action, afin d'appuyer l'intérêt de la valorisation des peptides produits lors de la partie microbiologie de la thèse. Le dernier axe de cette synthèse concerne le génie des procédés et se centre principalement sur les procédés séparatifs appliqués aux fractionnements des hydrolysats peptidiques.

Ensuite, le second chapitre s'attache à proposer une section méthodologique consacrée à l'analyse des peptides. Intitulée « *Matériels et méthodes : méthodes d'analyse peptidique* », les différentes approches qualitatives et quantitatives de l'analyse des échantillons y sont abordées, que ce soit par chromatographie liquide ou par spectrométrie de masse. Des sections « matériels et méthodes » spécifiques à chacun des chapitres de résultats sont situées en début de celui-ci.

S'en suit le premier chapitre de résultats s'intéressant à la partie de génie enzymatique du projet de thèse. Ce chapitre 3, « *Production du peptide actif α 137-141 au cours de*

l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine et du cruor bovins », présente les résultats obtenus en termes de production enzymatique du peptide d'intérêt et se clôture par la présentation des hydrolysats sélectionnés pour la séparation du peptide actif.

Le chapitre 4 développe les résultats concernant la partie en génie des procédés. La « *Séparation sélective du peptide actif α 137-141 par électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration* » expose la stratégie de fractionnement des hydrolysats, du choix du degré d'hydrolyse le plus adapté à l'enrichissement en α 137-141, de l'augmentation de sa teneur récoltée, jusqu'à l'augmentation des concentrations recueillies.

Enfin, le chapitre 5 présente la dernière étape de la démarche expérimentale entreprise. La « *Valorisation des peptides actifs comme potentiels conservateurs des aliments* » y détaille l'ensemble des résultats concernant les effets antimicrobiens constatés, de leur mise en évidence à leur application sur matrice alimentaire de type « viande hachée ».

Un dernier chapitre conclut ce manuscrit en proposant des « *Conclusions et perspectives* » avec un intérêt particulier porté au champ interdisciplinaire du projet.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 :

Synthèse bibliographique

La synthèse bibliographique tente de poser les bases à la compréhension globale du manuscrit et des travaux entrepris. Elle s'efforce de proposer un contenu exhaustif et commun aux trois domaines rencontrés au cours de ces travaux, à savoir : le génie enzymatique, le génie des procédés et enfin, le génie microbiologique.

1.1. Hémoglobine et cruor bovins : présentation du co-produit de l'industrie agroalimentaire à valoriser

1.1.1. Intérêts et perspectives de valorisation du sang bovin

Le sang est un co-produit des abattoirs dont la valorisation permettrait de lutter contre d'importants problèmes environnementaux. Malgré l'abondance du sang récolté, il est estimé que seulement 30 % sont aujourd'hui utilisés (Gatnau *et al.*, 2001).

Le sang complet peut être employé en charcuterie, notamment pour la fabrication des boudins noirs, après pasteurisation (Santos *et al.*, 2003). Aussi, la poudre de sang obtenue après séchage aidait à l'élaboration d'engrais (Linden *et al.*, 1994).

Néanmoins, les difficultés de valorisation de cette filière sont nombreuses. En premier lieu, une qualité d'hygiène exceptionnelle est nécessaire afin d'éviter toute contamination pathogène, telle que l'encéphalopathie spongiforme bovine, communément nommée « maladie de la vache folle ». Également, les contraintes religieuses limitent l'emploi du sang « tel quel », du fait d'une perception parfois négative de la part du consommateur (Bah *et al.*, 2013).

De ce fait, des voies alternatives ont été explorées. Selon Bah *et al.* (2013), la **Figure 1** résume la démarche globale de valorisation du sang récolté à l'issue des abattoirs. Généralement, après injection d'anticoagulants, le sang est centrifugé puis séparé, afin de donner lieu à une fraction incolore, le plasma, et une fraction rouge, le cruor.

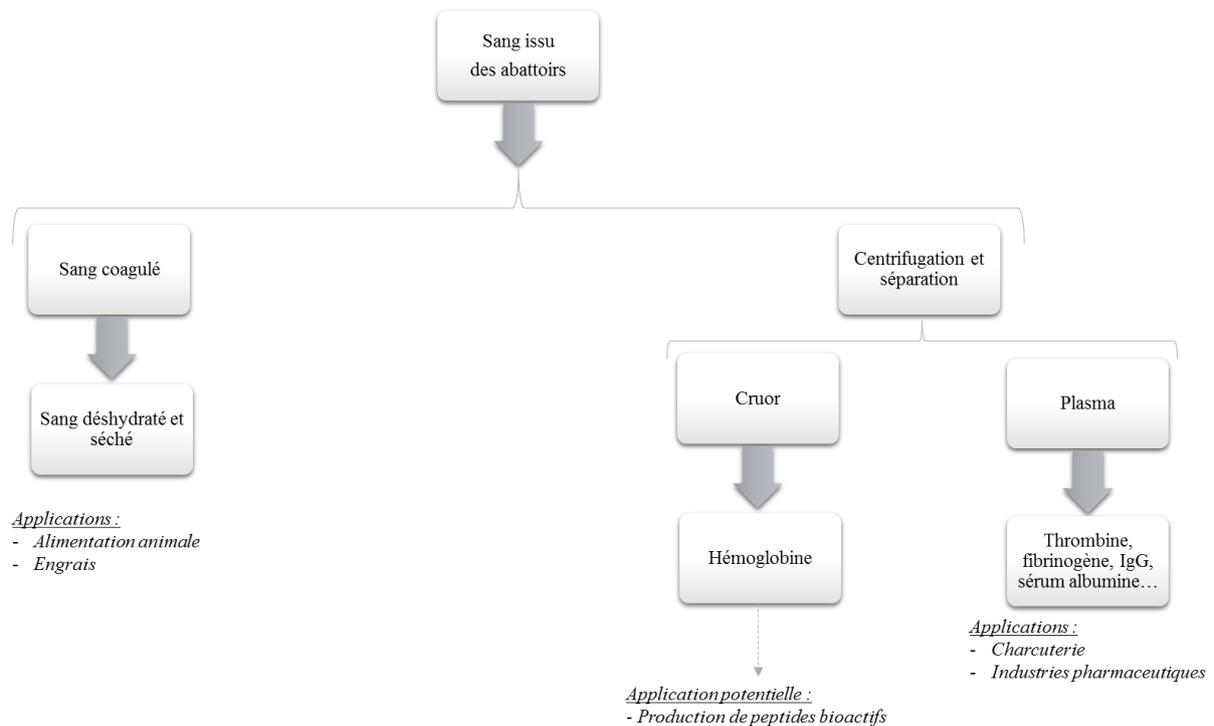


Figure 1 : Schéma de valorisation du sang bovin issu des abattoirs (Bah *et al.*, 2013)

La valorisation du plasma est effective pour des applications pharmaceutiques (Divakaran, 1982; Howell *et al.*, 1987; Pentadeo *et al.*, 1979) et alimentaires, principalement comme émulsifiant dans la mise en place de charcuteries (Linden *et al.*, 1994).

Il convient donc de particulièrement s'intéresser au développement de la valorisation de la fraction rouge du sang, le cruor. Ce dernier, représentant environ 40% du volume total du sang, est principalement composé d'hémoglobine, contenue aux seins des globules rouges (ou hématies).

Dans l'établissement de cette procédure de valorisation, l'emploi du sang bovin est aussi particulièrement adapté du fait de son abondance marquée, aux environs de quinze litres par bovin contre une moyenne de trois litres pour un individu d'espèce porcine (Bah *et al.*, 2013).

1.1.2. Présentation générale de l'hémoglobine bovine

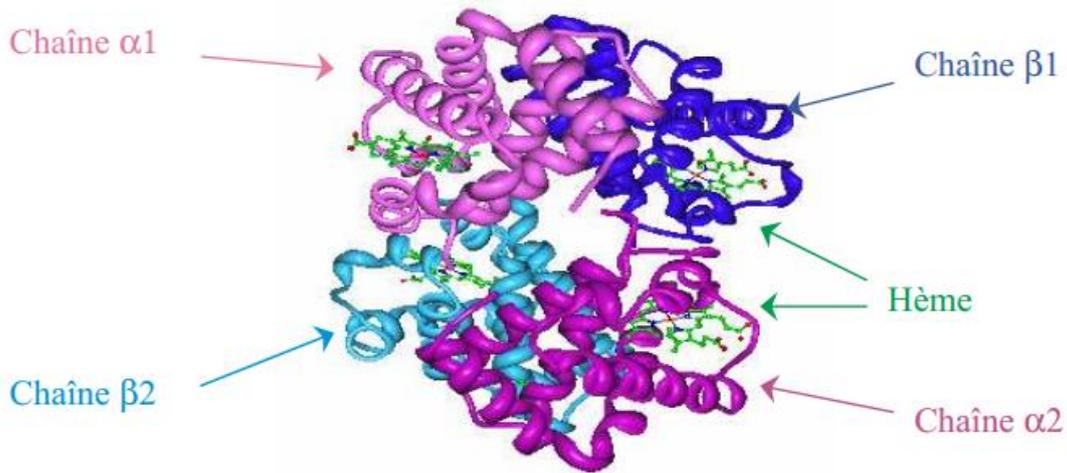


Figure 2 : Représentation spatiale de l'hémoglobine bovine

L'hémoglobine (**Figure 2**) est une protéine formée de quatre chaînes polypeptidiques, deux chaînes α et deux chaînes β , identiques deux à deux, et d'une masse moléculaire globale de 64 500 Da. Chacune des chaînes possède une partie protéique, aussi appelée globine ou apoprotéine, et une partie non protéique.

Cette dernière représente l'hème de l'hémoglobine, complexe tétrapyrrolique de fer ferreux, qui se trouve positionné au sein de la structure globulaire compacte formée par chaque protomère.

1.1.3. Structure de la chaîne alpha de l'hémoglobine bovine

La chaîne α est composée de 141 acides aminés et d'une masse moléculaire globale de 15053 Da (Sasakawa, 1961). Sa structure primaire, enchaînement des acides aminés, est présentée en **Figure 3**.

V¹LSAADKGNV¹⁰ KAAWGKVGGH²⁰ AA EYGAEALE³⁰ RMFLSFPTTK⁴⁰ TYFPHF⁴¹DL⁵⁰
H⁵⁰GSAQVKGHGA⁶⁰ KVAAALTKAV⁷⁰ EHLDDLPGAL⁸⁰ SELSDLHAHK⁹⁰ LRVDPVN¹⁰⁰
FKL¹⁰⁰ LSHSLLVTLA¹¹⁰ SHLPSDFTPA¹²⁰ VHASLDKFLA¹³⁰ NVSTVLTSKY¹⁴⁰ R

Figure 3 : Séquence en acides aminés de la chaîne α de l'hémoglobine bovine

D'un point isoélectrique global de 8.19, la chaîne α est constituée majoritairement d'acides aminés hydrophobes ou apolaires (76). Les acides aminés les plus abondants y sont la leucine (K) et l'arginine (R), alors qu'il y a absence d'isoleucine (I) et de cystéine (C).

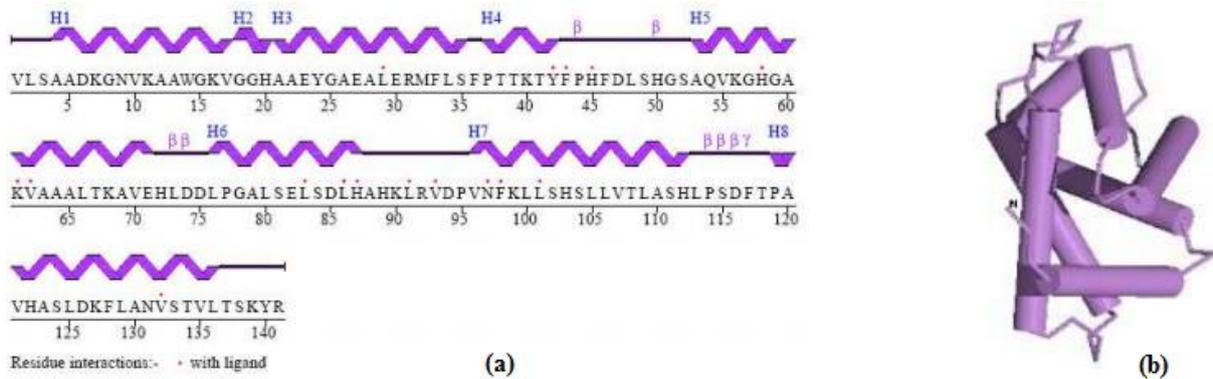


Figure 4 : Structure secondaire de la chaîne α de l'hémoglobine bovine : représentation linéaire (a) et représentation spatiale (b)

Sa structure secondaire permet d'identifier la présence de huit hélices α (de H1 à H8), reliées par des coudes β (**Figure 4**).

1.1.4. Structure de la chaîne bêta de l'hémoglobine bovine

La chaîne β , de 15 954 Da, possède 145 acides aminés (Shroeder *et al.*, 1967) dont la structure primaire est détaillée en **Figure 5**.

M¹**L****T****A****E****E****K****A****A****V**¹⁰**T****A****F****W****G****K****V****K****V****D**²⁰**E****V****G****G****E****A****L****G****R****L**³⁰**L****V****V****Y****P****W****T****Q****R****F**⁴⁰**F****E****S****F****G****D****L****S****T**
A⁵⁰**D****A****V****M****N****N****P****K****V****K**⁶⁰**A****H****G****K****K****V****L****D****S****P**⁷⁰**S****N****G****M****K****G****L****D****D****L**⁸⁰**K****G****T****F****A****A****L****S****E****L**⁹⁰**H****C****D****K****L****H****V**
D**P****E**¹⁰⁰**N****F****K****L****L****G****N****V****L****V**¹¹⁰**V****V****L****A****R****N****F****G****K****F**¹²⁰**F****T****P****V****L****Q****A****D****F****Q**¹³⁰**K****V****V****A****G****V****A****N****A****L**¹⁴⁰**A****H****R****Y**
H

Figure 5 : Séquence en acides aminés de la chaîne β de l'hémoglobine bovine

Son point isoélectrique est de 7.02 et sa composition en acides aminés laisse également voir une majorité d'acides aminés hydrophobes (82). Les acides aminés prépondérants sont la valine (V) et l'alanine (A).

Sa structure secondaire comporte 11 hélices α (de H1 à H11) reliées par des coudes β (**Figure 6**).

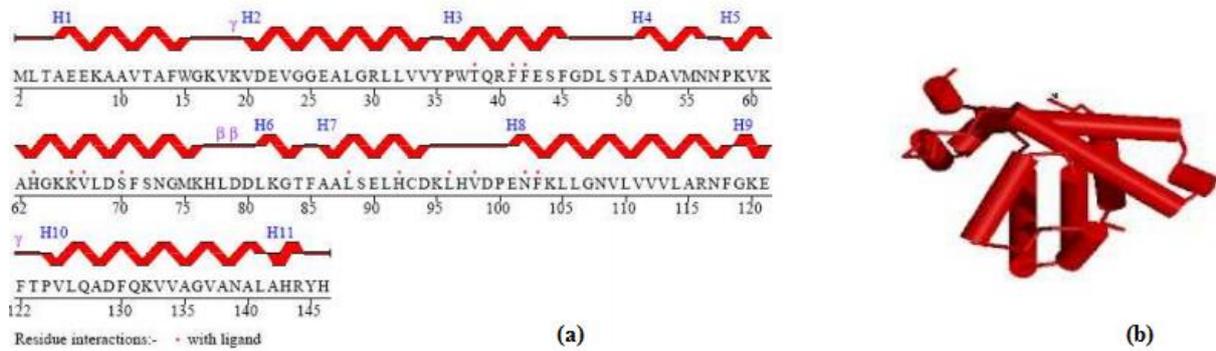


Figure 6 : Structure secondaire de la chaîne β de l'hémoglobine bovine : représentation linéaire (a) et représentation spatiale (b)

1.1.5. Structure et fonction de l'hème

La structure tertiaire des chaînes polypeptidiques α et β , c'est-à-dire leur repliement dans l'espace, leur permet d'adopter une structure globulaire et de ménager une poche où peut se nicher l'hème de l'hémoglobine dont la structure est présentée en **Figure 7**.

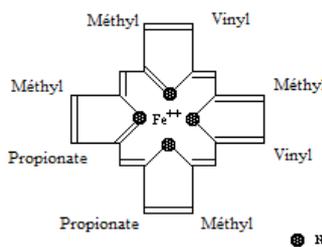


Figure 7 : Structure de l'hème

L'hème est constitué d'une protoporphyrine avec en son centre un atome de fer ferreux (Fe^{2+}). La protoporphyrine est formée de quatre cycles pyrroliques unis par l'intermédiaire de ponts méthényles ($-\text{CH}=\text{}$) et substitués par des groupes méthyl, propionate et vinyl dont la disposition est caractéristique du type IX.

Il permet d'assurer la fonction de transporteur d'oxygène (O_2) de l'hémoglobine qui se fixe au fer ferreux (Fe^{2+}) pour être distribué aux organes périphériques. L'hémoglobine passe alors de sa forme désoxygénée (ou désoxyhémoglobine) à sa forme oxygénée (ou oxyhémoglobine).

Au sein de la désoxyhémoglobine, l'atome de fer possède cinq liaisons de coordination stables : quatre avec les atomes d'azote des noyaux pyrrole de l'hème et une avec l'atome

d'azote d'un résidu histidine de la globine. La sixième liaison fixe l'oxygène, de façon réversible, formant ainsi l'oxyhémoglobine.

L'hème est aussi responsable de la couleur rouge, caractéristique de l'hémoglobine et du sang.

Cette première partie de la synthèse bibliographique permet de montrer que l'hémoglobine bovine est une protéine parfaitement bien définie. Elle apparaît comme un substrat de choix pour l'étude de la protéolyse dans l'objectif de la production en masse de peptides bioactifs.

La présentation qui fait suite concerne ainsi la pepsine porcine, enzyme de choix pour l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine.

1.2. La pepsine porcine comme outil de production peptidique

1.2.1. Les pepsines comme outils biotechnologiques

Les protéases sont aujourd'hui un outil important des industries biotechnologique et agroalimentaire. Les plus employées sont les aminopeptidases, les carboxypeptidases, la papaïne, la trypsine ou encore la chymotrypsine. La pepsine est également l'une des plus communes (Tavano, 2013).

La pepsine trouve son utilité au sein de différents procédés. Elle peut être, tout comme la trypsine, utilisée pour diminuer le caractère allergène de différentes protéines, notamment pour des plantes et légumes tels que le lupin, le pois chiche ou encore la lentille (Pinto *et al.*, 2009). La pepsine A de porc est également la pepsine majoritaire de l'extrait brut de pepsines, prélevé chez l'animal, contenant également les pepsines B, C et D, minoritaires. Celles-ci sont impliquées dans la coagulation du lait, en fromagerie, depuis la seconde guerre mondiale en association avec la chymosine au sein de la présure (Ernstrom *et al.*, 1983).

Enfin, la pepsine, à l'instar de la chymotrypsine et de la trypsine, est une enzyme particulièrement employée pour la production de peptides actifs par procédés *in vitro* (Korhonen *et al.*, 2006 ; Danquah et Agyei, 2012 ; Udenigwe et Aluko, 2012) ou pour simuler *ex vivo* la digestion gastro-intestinale de protéines (Benedé *et al.*, 2014; Dupont *et al.*, 2010).

1.2.2. Présentation générale de la pepsine porcine

La pepsine A de porc (EC 3.4.23.1) (**Figure 8**) désigne une endoprotéase appartenant à la famille des protéases à acide aspartique. Elle fait partie de la même famille que la chymosine ou la cathepsine D.

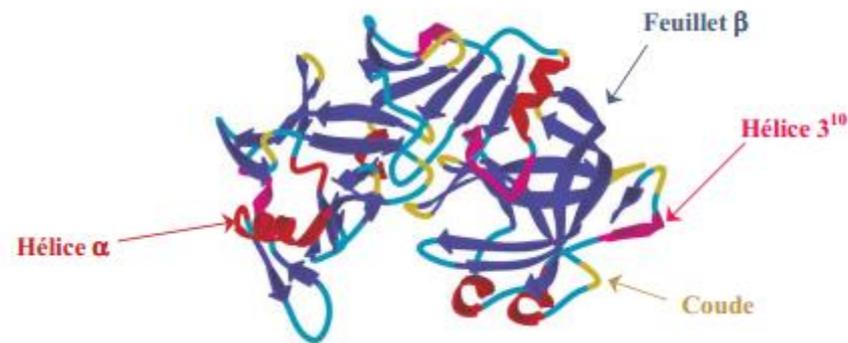


Figure 8 : Représentation spatiale de la pepsine porcine

Il s'agit d'une des hydrolases prédominantes dans le suc gastrique, sécrétée dans l'estomac des vertébrés. Elle est produite à partir d'un précurseur inactif, le pepsinogène. Ce dernier est stocké au sein des vésicules enzymatiques des cellules principales de l'estomac et est excrété au moment de la digestion. Il est alors converti en enzyme active à pH acide (inférieur à 5) par le clivage de sa liaison peptidique entre la leucine L⁵⁹ et l'isoleucine I⁶⁰ (Herriott, 1962).

1.2.3. Structure de la pepsine porcine

La chaîne peptidique de la pepsine porcine est constituée de 326 acides aminés, pour une masse moléculaire globale de 34 600 Da, répartis en deux domaines principaux, le N-terminal (AA¹-AA¹⁷⁶) et un C-terminal (AA¹⁷⁷-AA³²⁶) (Moravek *et al.*, 1974).

Elle possède essentiellement un agencement spatial en feuillets β, caractéristique des protéases à acide aspartique (Abad-Zapatero *et al.*, 1990) et trois ponts disulfures (Cys⁴⁵-Cys⁵⁰, Cys²⁰⁶-Cys²¹⁰ et Cys²⁴⁹-Cys²⁸²). Elle possède également des hélices α et des hélices 3¹⁰, mais en faible proportion, dont le pas est plus long que celui de l'hélice α (**Figure 9**).

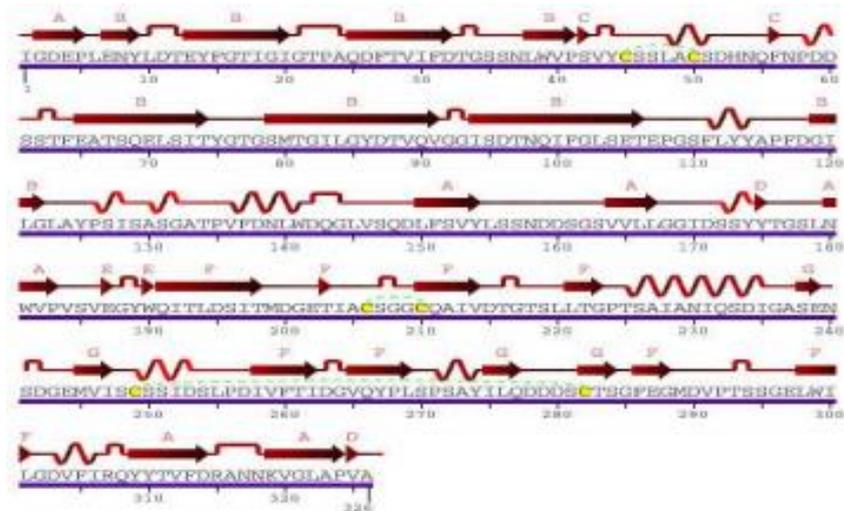


Figure 9 : Séquence en acides aminés de la pepsine porcine et structure secondaire

1.2.4. Spécificité et mécanisme d'action de la pepsine porcine

La nomenclature de Schechter *et al.* (1967), présentée en **Figure 10** pour la pepsine, permet de spécifier que la protéase clive entre les résidus P1 et P1' des acides aminés du substrat (l'hémoglobine bovine dans le cas ci-présent) et les résidus S1 et S1' au niveau du site actif de l'enzyme, la pepsine. Elle n'hydrolyse pas d'amide non-peptidique ou de liaison ester.

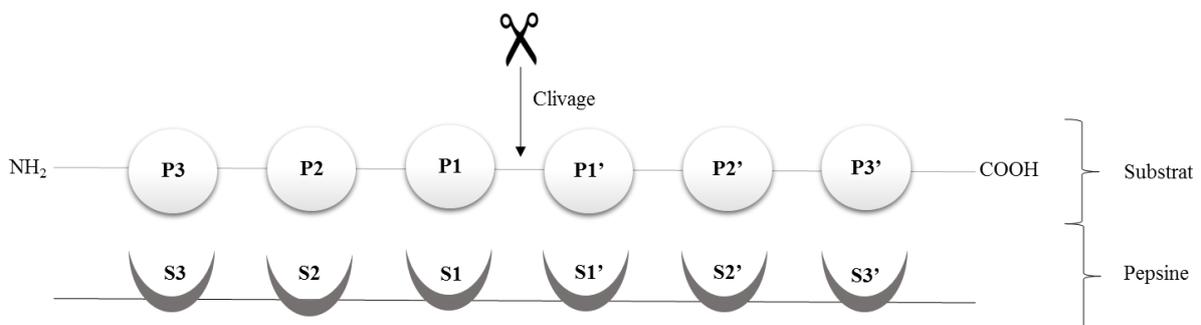


Figure 10 : Nomenclature de Schechter *et al.* (1967) pour la description des sites actifs des protéases, appliquée à la pepsine porcine

De manière préférentielle, la pepsine clive les liaisons peptidiques en position C-terminal dans lesquelles un acide aminé aromatique (Tyr, Trp ou Phe) ou hydrophobe (Leu, Ala, Glu ou Gln) engage sa fonction amine en position P1 (Keil, 1992). Il est à noter que certains acides aminés peuvent avoir des effets positifs sur le clivage de la liaison peptidique par la pepsine selon leur position au sein du site actif. C'est le cas notamment pour la proline en position P3 ou P4. Au contraire, son effet est négatif si elle se situe en P2 ou en P3'. De la même

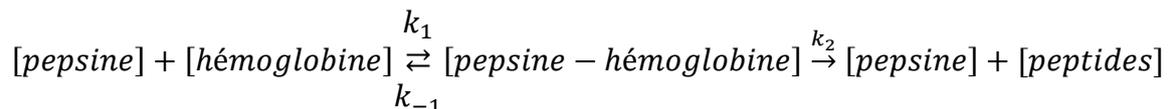
manière, l'arginine en position P1 et P3 et la lysine ou l'histidine en position P3 ont des effets négatifs sur le clivage. En présence de proline ou de glycine en position P1, la pepsine ne clive pas la chaîne polypeptidique.

D'un point de vue spatial, le site actif de la pepsine comprend deux acides aspartiques proches (Asp³² et Asp²¹⁵), ainsi que trois isoleucines (Ile³⁰, Ile¹²⁰ et Ile²¹³), une sérine (Ser³⁹), deux alanines (Ala¹²⁴ et Ala³⁰¹) et deux thréonines (Thr²¹⁸ et Thr³⁰⁵). L'ensemble constitue une crevasse où vient se loger le substrat (Davies, 1990) et où les deux acides aspartiques jouent simultanément les rôles de donneur et de receveur de protons (Dunn, 2002).

Au niveau des conditions opératoires, la pepsine possède un pH optimum d'activité de 2.1 (Tanaka *et al.*, 2001) et une température optimale de 37°C (Hunkapiller *et al.*, 1972). En outre, elle est dénaturée de manière irréversible à un pH au-delà de 8.5 (Ryle, 1984).

1.2.5. Principe catalytique de la pepsine sur l'hémoglobine bovine

La réaction catalytique entre la pepsine et son substrat, l'hémoglobine bovine, est une réaction de premier ordre, où la concentration de produit formé est proportionnelle à la quantité de substrat disparu par unité de temps, ce qui est le cas de nombreuses enzymes protéolytiques (Saadi *et al.*, 2015). La réaction peut donc être décrite selon le principe suivant, décrit par Michaelis *et al.* (1913), puis par Briggs *et al.* (1925) :



Selon ces auteurs, la production des peptides est donc majoritairement dépendante de la constante k_2 , ou k_{cat} , dont l'efficacité est soumise à la régulation ordonnée par les différentes conditions opératoires telles que le ratio enzyme/substrat, le pH ou la température de la réaction.

D'un point de vue général, les cinétiques d'hydrolyse possèdent initialement une vitesse élevée, suivie d'un ralentissement rapide de la vitesse d'hydrolyse (Adler-Nissen, 1978). Ce phénomène est induit principalement par l'inhibition de l'enzyme lors de son autolyse, sa dénaturation thermique ou encore la limitation de liaisons peptidiques disponibles (Constantinides *et al.*, 1980; Margot *et al.*, 1997). Également, Jr *et al.* (2004) détaillent que la production des peptides, produits de la réaction, provoque l'augmentation de la compétition entre le site actif et le substrat de départ, ici l'hémoglobine bovine. Les peptides générés, eux-mêmes considérés comme nouveaux substrats potentiels pouvant être clivés en des produits de

plus faible masse moléculaire (Saadi *et al.*, 2015), sont donc relargués en continu et participent à diminuer la vitesse d'hydrolyse entre l'enzyme et le substrat protéique.

Il a pu être précédemment détaillé que l'hémoglobine bovine était un substrat adapté à la protéolyse dans l'objectif de produire en masse des peptides bioactifs.

De plus, au sein du laboratoire ProBioGEM, le modèle de l'hémoglobine bovine hydrolysée par la pepsine porcine a particulièrement été étudié (Adje *et al.*, 2011a; Adje *et al.*, 2011b; Daoud *et al.*, 2005; Nedjar-Arroume *et al.*, 2008; Nedjar-Arroume *et al.*, 2006).

Il convient désormais de s'intéresser davantage aux peptides produits, avec un *focus* particulier sur les peptides antimicrobiens et notamment le peptide-cible de cette étude : le peptide actif α 137-141.

1.3. Peptides bioactifs issus de l'hémoglobine bovine

1.3.1. Historique et potentiels des peptides bioactifs issus de l'hémoglobine bovine

L'hémoglobine a été décrite comme une source endogène de peptides actifs (Ivanov *et al.*, 1997). Les premiers travaux menés sur l'isolement de tels peptides ont été réalisés à partir d'extraits d'organes porcins ou bovins comme le cerveau ou l'hypothalamus (Fukui *et al.*, 1983; Ivanov *et al.*, 1992; Schally *et al.*, 1978; Takagi *et al.*, 1982). Le but était principalement de trouver un lien entre ces séquences peptidiques et la fonction d'un organe cible, l'hémoglobine constituant *in vivo* une forte source de peptides bioactifs impliqués dans l'homéostasie (Gomes *et al.*, 2010).

La séquence en acides aminés de l'hémoglobine étant relativement conservée dans l'évolution, certains peptides actifs ont rapidement été retrouvés au sein du modèle bovin. *In vitro*, les premières séquences isolées concernaient une série de peptides dénommés les hémorphines et possédant une activité opioïde (Brantl *et al.*, 1986).

Depuis, décrivant de nombreuses activités telles que l'activité anti-hypertensive ou potentialisatrice de la bradykinine, d'autres équipes ont pu isoler des peptides actifs à partir de

l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine bovine (Adje *et al.*, 2011b; Nedjar-Arroume *et al.*, 2008; Piot *et al.*, 1992; Vercaigne-Marko *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 1997a).

L'essentiel des activités détectées *in vivo* et/ ou *in vitro* est résumé en **Figure 11**.

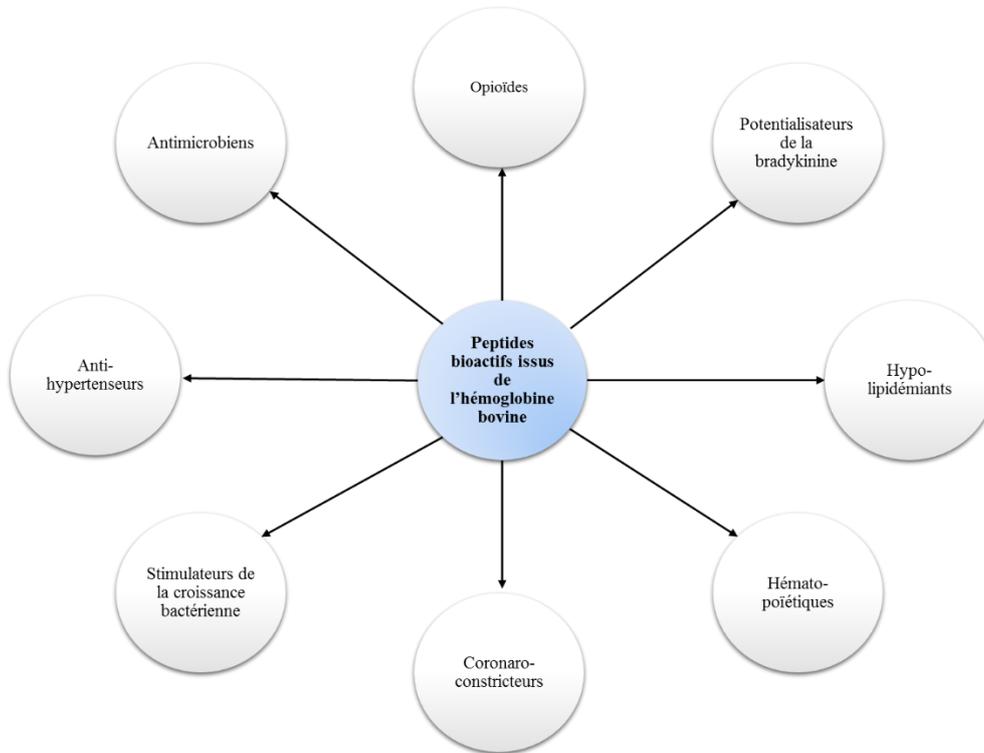


Figure 11 : Représentation schématique des activités biologiques identifiées pour les peptides issus de l'hémoglobine bovine

Les peptides identifiés sont représentés, pour la chaîne α et pour la chaîne β en **Figure 12** pour les peptides antimicrobiens issus de la chaîne α , en **Figure 13** pour les autres peptides actifs issus de la chaîne α , en **Figure 14** pour les peptides antimicrobiens issus de la chaîne β et en **Figure 15** pour les autres peptides bioactifs issus de la chaîne β .

Suite à cela, une brève présentation de chacune des activités a été réalisée, pour se tourner ensuite plus spécifiquement sur l'activité antimicrobienne.

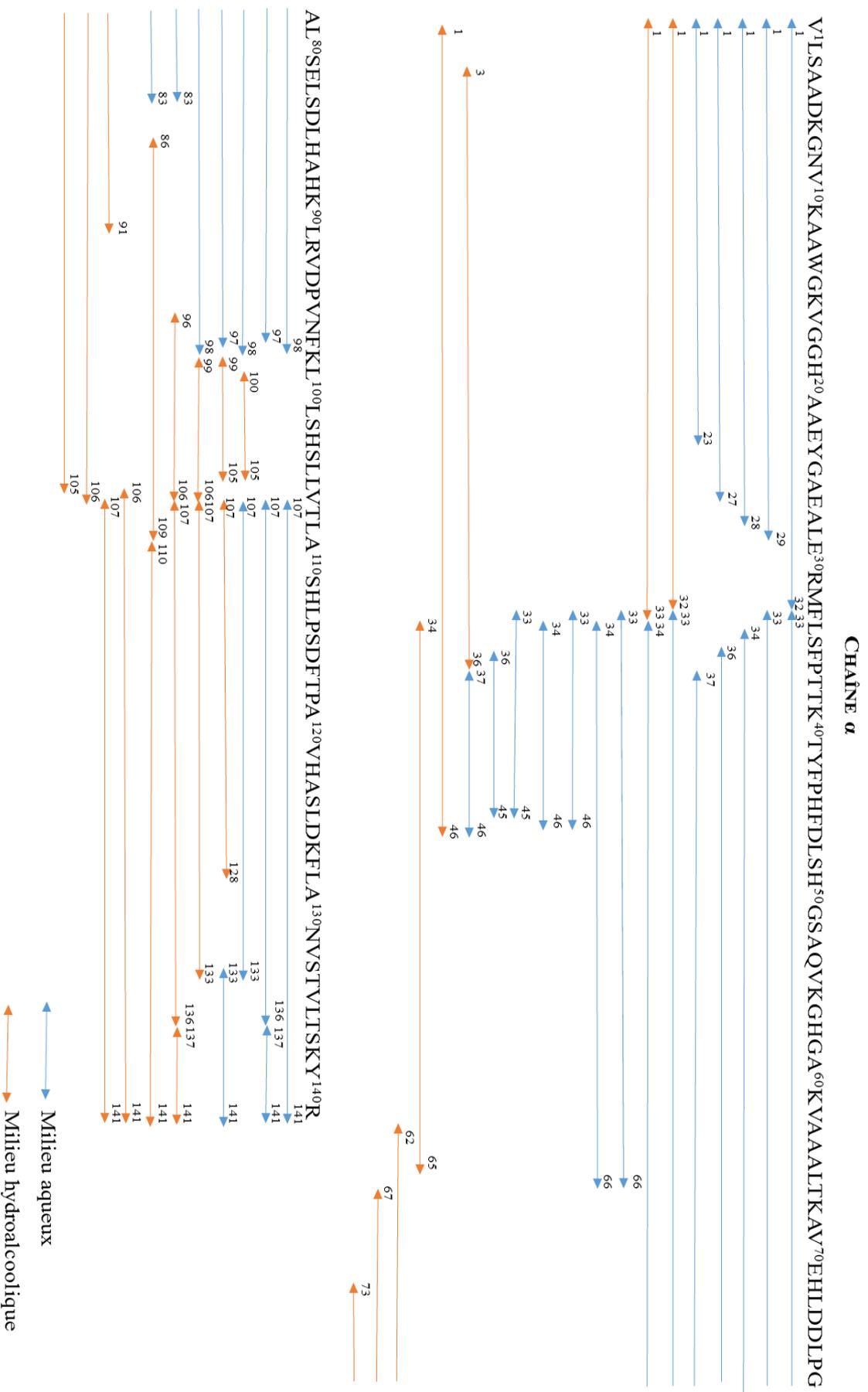


Figure 12 : Représentation schématique des peptides antimicrobiens de la chaîne α de l'hémoglobine bovine

CHAÎNE α

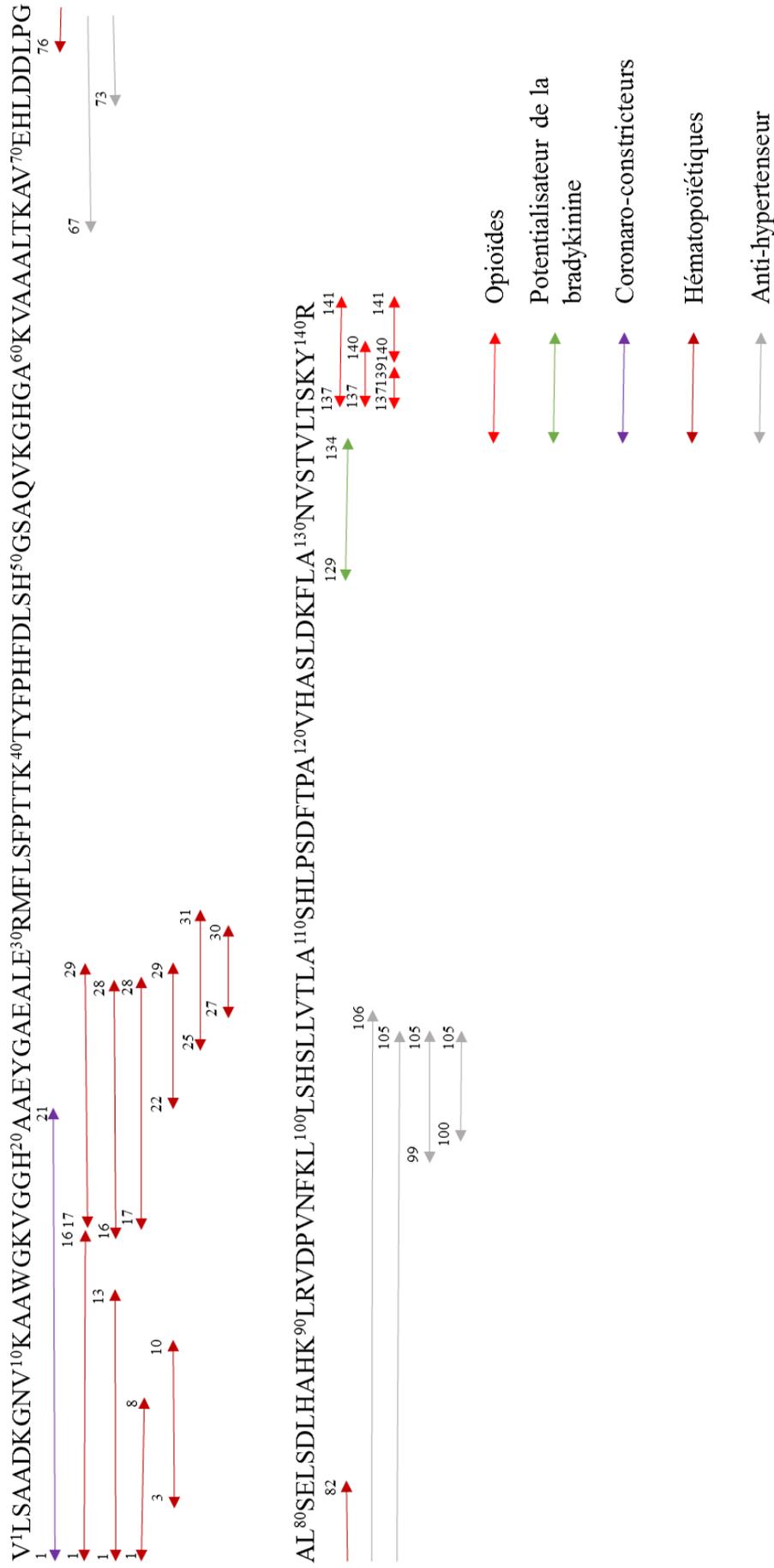


Figure 13 : Représentation schématique des peptides bioactifs de la chaîne α de l'hémoglobine bovine hors antimicrobiens

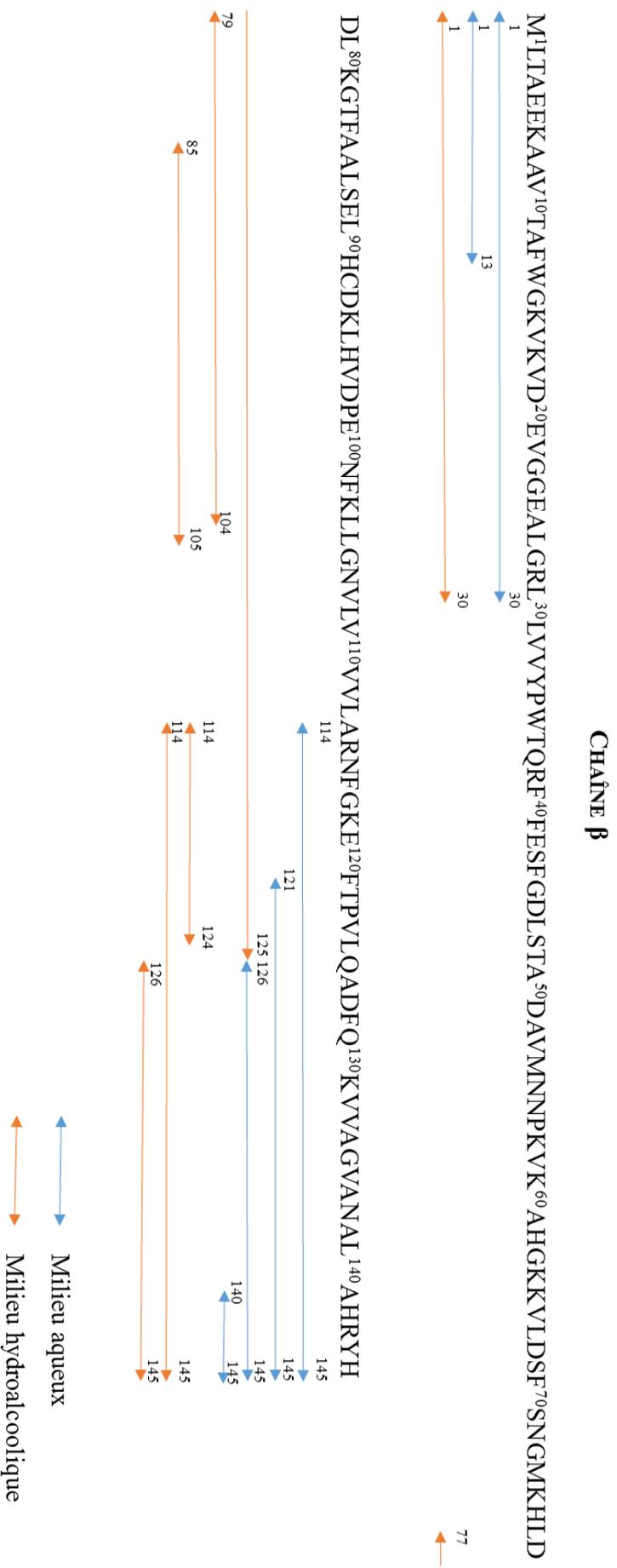


Figure 14 : Représentation schématique des peptides antimicrobiens de la chaîne β de l'hémoglobine bovine

CHAÎNE β

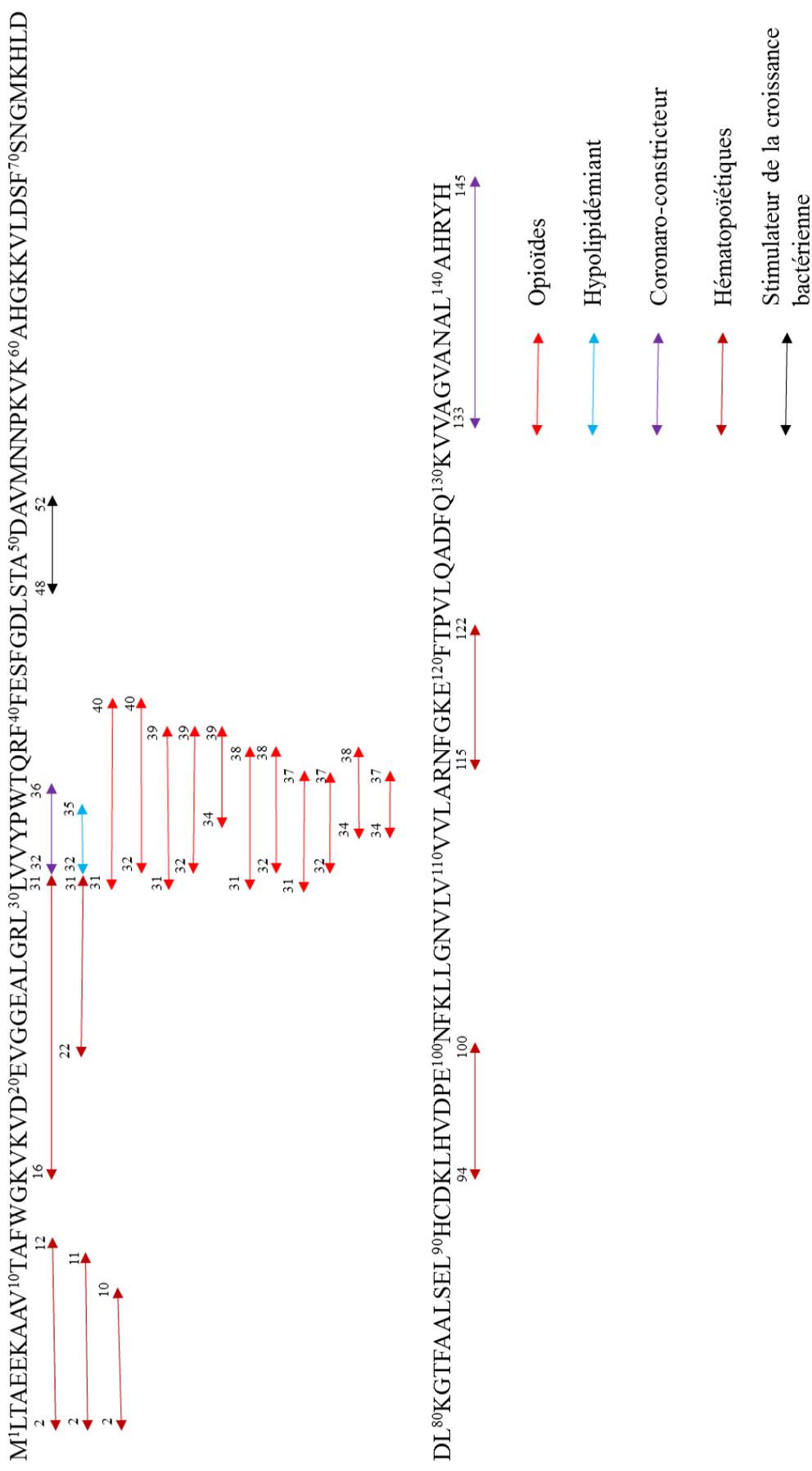


Figure 15 : Représentation schématique des peptides bioactifs issus de la chaîne β de l'hémoglobine bovine hors antimicrobiens

1.3.2. Peptides opioïdes issus de l'hémoglobine bovine

L'activité opioïde est décrite comme simulant l'action de l'opium. Les peptides la possédant ont donc des propriétés analgésiques, pouvant être de potentiels substituts pharmacologiques aux traitements contre la douleur.

L'isolement de ces familles de peptides au sein de l'hémoglobine bovine comprend principalement deux familles : celle des kyotorphines, dérivée de la fin de la chaîne α et principalement du peptide néokyotorphine (α 137-141), et celle des hémorphines, dérivée de la chaîne β , et plus précisément du fragment β 31-40, également nommé LVVh-7.

L'ensemble de ces peptides est résumé au sein du **Tableau 1**.

Tableau 1 : Peptides opioïdes issus de l'hémoglobine bovine

Position	Séquence	Références
α 137-141	TSKYR	Takagi <i>et al.</i> (1982)
α 137-140	TSKY	Blishchenko <i>et al.</i> (1996)
α 137-139	TSK	Orts <i>et al.</i> (1978)
α 140-141	YR	Fukui <i>et al.</i> , 1983
β 31-40	LVVYPWTQRF	Chang <i>et al.</i> (1980)
β 32-40	VVYPWTQRF	Chang <i>et al.</i> (1980)
β 31-39	LVVYPWTQR	Glamsta <i>et al.</i> (1991)
β 32-39	VVYPWTQR	Nyberg <i>et al.</i> (1997)
β 34-39	YPWTQR	Nyberg <i>et al.</i> (1997)
β 31-38	LVVYPWTQ	Zhao <i>et al.</i> (1997b)
β 32-38	VVYPWTQ	Zhao <i>et al.</i> (1997b)
β 34-38	YPWTQ	Brantl <i>et al.</i> (1986)
β 31-37	LVVYPWT	Nyberg <i>et al.</i> (1997)
β 32-37	VVYPWT	Lignot <i>et al.</i> , 1999
β 34-37	YPWT	Brantl <i>et al.</i> (1986)

Il est à noter qu'une activité complémentaire a été décrite pour l'ensemble des hémorphines, hormis pour les fragments β 32-39, β 34-38, β 32-37 et β 34-37. Il s'agit de l'activité anti-hypertensive, responsable de l'inhibition de l'enzyme convertissant l'angiotensine I en angiotensine II (Lantz *et al.*, 1991; Zhao *et al.*, 1994), et participant à la régulation de la tension artérielle.

1.3.3. Peptides hématopoïétiques issus de l'hémoglobine bovine

Les peptides à activité hématopoïétique (**Tableau 2**) interviennent dans la formation des globules rouges du sang, principalement au sein de la moelle rouge des os. La plupart de ces peptides n'ont toutefois pas été isolés après hydrolyse enzymatique mais hydrolyse chimique (Ivanov *et al.*, 1997).

Tableau 2 : Peptides hématopoïétiques issus de l'hémoglobine bovine

Position	Séquence	Références
α 1-8	VLSAADKG	a
α 1-13	VLSAADKGNVCAA	a
α 1-16	VLSAADKGNVKAAWGK	a
α 3-10	SAADKGNV	a
α 16-28	KVGGHAAEYGAEA	a
α 17-29	VGGHAAEYGAEAL	a
α 17-28	VGGHAAEYGAEA	a
α 22-29	AEYGAEAL	a
α 25-31	GAEALER	a
α 27-30	EALE	a
β 2-12	LTAEKAAVTA	a
β 2-11	LTAEKAAVT	a
β 2-10	LTAEKAAV	a
β 16-31	KVKVDE	a
β 22-31	VGGEALGRLL	a
β 115-122	RNFGKEFT	a
α 76-82	LPGALSE	b
β 94-100	KLHVDPE	b

Références :

a : Ivanov *et al.*, 1992

b : Vercaigne-Marko *et al.*, 2000

1.3.4. Peptides anti-hypertenseurs, potentialisateurs de la bradykinine, hypolipidémiant, coronaro-constricteurs et stimulateurs de la croissance bactérienne issus de l'hémoglobine bovine

Les activités opioïde, hématopoïétique ou antimicrobienne sont largement majoritaires au sein de l'hémoglobine bovine.

Toutefois, quelques activités supplémentaires sont également représentées et les peptides les possédant sont référencés en **Tableau 3**.

Tableau 3 : Peptides potentialisateur de la bradykinine, hypolipidémiant, stimulateur de la croissance bactérienne, anti-hypertenseurs et coronaro-constricteurs issus de l'hémoglobine bovine

Activités	Position	Séquence	Références
Potentialisateur de la bradykinine	α 129-134	LANVST	Piot <i>et al.</i> (1992)
Hypolipidémiant	β 32-35	VVYP	Kagawa <i>et al.</i> (1996)
	β 32-36	VVYPW	Barkhudaryan <i>et al.</i> (1992)
Coronaro-constricteur	α 1-21	VLSAADKGNVKA AWGKVG GHA	Barkhudaryan <i>et al.</i> (1993)
	β 133-145	VAGVANALAHRYH	Barkhudaryan <i>et al.</i> (1993)
Stimulateur de la croissance bactérienne	β 48-52	STADA	Zhao <i>et al.</i> (1996a)
Anti-hypertenseur	α 67-106	TKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKL-- --RVDPVNFKLLSHSL	Adje <i>et al.</i> (2011b)
	α 73-105	LDDLPGALSELSDLHAHKL RVDPVN-- --FKLLSHSL	
	α 99-105	KLLSHSL	
	α 100-105	LLSHSL	

Un peptide potentialisateur de la bradykinine, le α 129-134, a été découvert par Piot *et al.* (1992). Succinctement, il permet la production et un effet maximal de la quinine qui possède des effets analgésiques, en se fixant de manière spécifique sur ses récepteurs.

Un peptide hypolipidémiant, le β 32-35, a également été trouvé, diminuant le taux de lipides notamment au niveau hépatique (Kagawa *et al.*, 1996).

La croissance des bactéries Gram négatif a été stimulée par l'addition du β 48-52 (Zhao *et al.*, 1996a).

Trois peptides (β 32-36, β 133-145 et α 1-21) ont également montré une activité coronaro-constrictrice (Barkhudaryan *et al.*, 1993; Barkhudaryan *et al.*, 1992).

Enfin, récemment, Adje *et al.* (2011b) ont isolé quatre peptides anti-hypertenseurs qui ont pour rôle de lutter contre l'hypertension, et donc de diminuer la tension artérielle, généralement par un mécanisme visant à inhiber l'enzyme de conversion de l'angiotensine I en angiotensine II au sein du système rénine-angiotensine.

1.3.5. Peptides antimicrobiens issus de l'hémoglobine bovine

1.3.5.1. Potentiels et perspectives d'application des peptides antimicrobiens

Les applications des peptides bioactifs sont particulièrement bien renseignées dans la littérature en ce qui concerne les peptides bioactifs produits par fermentation microbienne, la voie de production étant la plus « traditionnellement » utilisée (Marx, 2005). Néanmoins, il est considéré que l'activité d'un peptide est dépendante de sa séquence en acides aminés ainsi que de sa conformation spatiale (Powers *et al.*, 2003). De la sorte, les applications décrites des peptides actifs issus d'un procédé fermentaire seraient sensiblement les mêmes que celles pouvant être décrites pour les peptides actifs issus d'hydrolysats de protéines (Agyei *et al.*, 2011).

En premier lieu, les peptides antimicrobiens se positionnent comme des candidats potentiels en tant que substitut pharmacologique de par leur multifonctionnalité (**Figure 16**).

En conséquence, leur principal intérêt potentiel est donc l'usage à destination thérapeutique (Danquah *et al.*, 2012). Leur attractivité réside dans le fait que leurs mécanismes d'action sont sensiblement différents de ceux des antibiotiques conventionnels, l'usage massif de ces derniers à travers le monde ayant largement contribué au phénomène de résistance. Les peptides antimicrobiens, de par leur large spectre d'action, pourraient ainsi se positionner comme des produits d'intérêt majeur en termes de traitement pour des pathologies variées (Li *et al.*, 2012). Leur mécanisme d'action particulier, n'impliquant généralement pas d'interaction membranaire avec un récepteur spécifique, leur permet également de pouvoir être employé comme vecteur pour l'administration de molécules pharmaceutiques à action intracellulaire (Aoki *et al.*, 2012; Stewart *et al.*, 2008). Également, les peptides antimicrobiens sont impliqués dans des processus de signalisation cellulaire au sein du système immunitaire chez de nombreux organismes et peuvent ainsi moduler l'immunité innée ou acquise (Pushpanathan *et al.*, 2013).

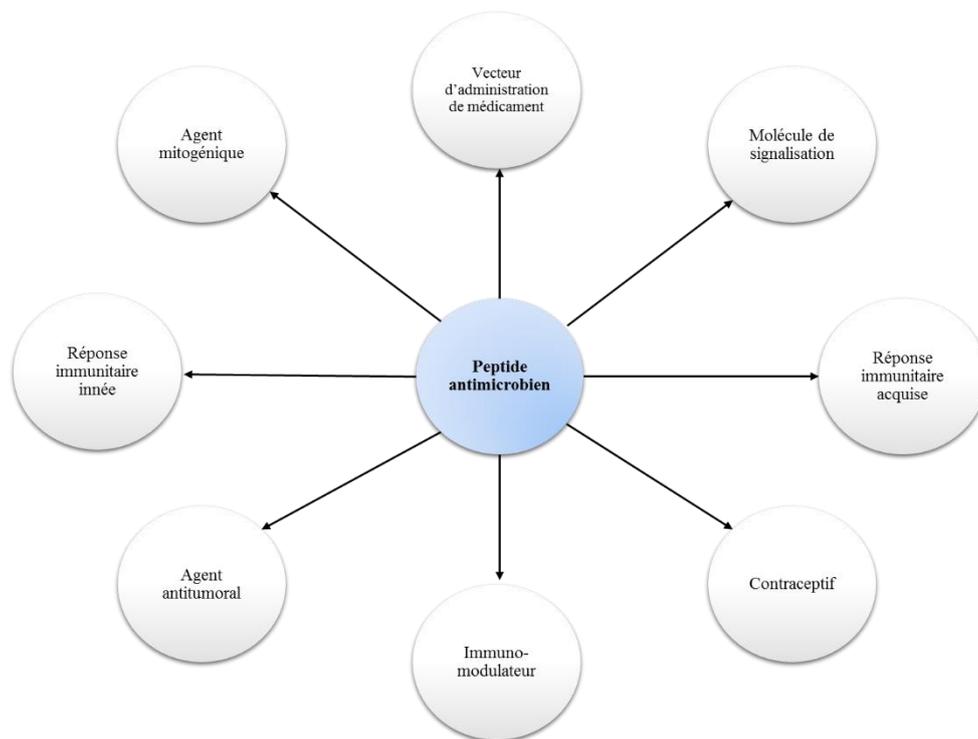


Figure 16 : Représentation schématique de la multifonctionnalité des peptides antimicrobiens (Pushpanathan *et al.*, 2013)

En effet, il a été décrit différentes activités complémentaires telles qu'un pouvoir antifongique ou antiviral, avec la particularité d'inhiber rapidement la croissance des agents infectieux (virus, bactéries, moisissures ou parasites). Ces propriétés peuvent permettre le positionnement de certains peptides antimicrobiens comme des biopesticides potentiels pour le contrôle des maladies des plantes (Li *et al.*, 2012). L'efficacité de ces peptides contre de nombreux pathogènes en font des candidats idéaux pour leur introduction en tant que transgènes au sein de plantes. En outre, ceci fut réalisé pour la tomate, le riz ou encore le tabac (Keymanesh *et al.*, 2009; Pushpanathan *et al.*, 2013).

D'autres effets ont été étudiés puisque les activités antitumorales ou contraceptives des peptides antimicrobiens sont également bien renseignées (Li *et al.*, 2012; Stewart *et al.*, 2008).

Au-delà de leurs propriétés thérapeutiques, les peptides antimicrobiens soulèvent aussi l'engouement dans d'autres secteurs d'activité. Aujourd'hui, la formation de biofilms en industries agroalimentaires ou en environnement médical constitue un véritable problème de santé publique. Elle est la cause de nombreuses infections nosocomiales ou alimentaires. Elle est généralement provoquée par contamination des surfaces, des équipements et matériels (Abdallah *et al.*, 2014). Pour lutter contre ces biofilms, les peptides antimicrobiens peuvent aussi bien intervenir dans la prévention de leur formation que dans la dispersion de ceux déjà existants, entraînant la mort des bactéries impliquées (Stempel *et al.*, 2015).

L'application peut également se faire pour protéger les denrées alimentaires lors de leur stockage ou de leur distribution. En premier lieu, ceci peut se réaliser par application directe au sein de la matrice alimentaire comme un conservateur classique des aliments (Keymanesh *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012). Toutefois, l'essor des emballages actifs permet de proposer une alternative plus moderne. De par leur interaction avec l'aliment, ces derniers peuvent alors répondre à des changements du milieu environnant ou du produit lui-même, notamment d'un point de vue microbiologique, afin d'augmenter sa durée de la vie et ses propriétés organoleptiques (Gontard, 2000). Au sein du laboratoire ProBioGEM, l'adsorption de la nisine sur des emballages alimentaires a permis d'évaluer des activités antimicrobiennes contre plusieurs bactéries pathogènes responsables de contaminations alimentaires telles que *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* (Karam *et al.*, 2013).

L'ensemble de ces propriétés énoncées démontre un véritable intérêt pour l'étude des peptides antimicrobiens, toutes sources initiales considérées. Ils représentent une véritable alternative à de nombreux produits employés aujourd'hui.

La protéolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine porcine permet ainsi d'aboutir à une large gamme de peptides antimicrobiens, dont l'historique, l'obtention et le référencement sont présentés ci-après.

Le cadre du projet de thèse permet de s'intéresser plus spécifiquement à l'un d'entre eux qui bénéficie de son sous-chapitre propre, autorisant à le présenter avec une attention particulière : il s'agit du peptide antimicrobien α 137-141.

1.3.5.2. Structure des peptides antimicrobiens

À ce jour, les peptides antimicrobiens ne possèdent pas de nomenclature internationale définie. De par leur grande diversité, il est en effet extrêmement difficile de les classer (Zasloff, 2002). En premier lieu, une classification se basant sur leur origine a été établie, mais a été vite abandonnée de par sa grande hétérogénéité (Diamant *et al.*, 2009; Jenssen *et al.*, 2006). Aujourd'hui, la charge globale du peptide et sa structure présentent la base de la classification (Boman, 1995; Gennaro *et al.*, 2000; Shai, 2002).

En règle générale, un peptide antimicrobien doit posséder au sein de sa structure plusieurs caractéristiques lui permettant d'interagir avec les membranes biologiques. Pour cela,

il est tout d'abord décrit une charge globale positive, permettant l'interaction avec la membrane. Ensuite, un caractère amphiphile semble souvent nécessaire afin d'insérer le peptide dans la membrane, puis un caractère hydrophobe afin de la perméabiliser (Powers *et al.*, 2003; Yeaman *et al.*, 2003).

Au final, les peptides antimicrobiens peuvent être répartis en quatre grands groupes : les peptides en hélice α amphiphile, en feuillet β stabilisé par un ou plusieurs ponts disulfures, les peptides linéaires riches en acides aminés particuliers et, enfin, les petits peptides à structure dite « *random coil* ».

Peptides en hélice α amphiphile

Historiquement, ces peptides ont été les premiers à être découverts. Ils sont présents chez de nombreux organismes comme l'homme, les insectes ou même les champignons (Powers *et al.*, 2003). La famille la plus représentative de ces peptides a été isolée chez les amphibiens : il s'agit de la famille des magainines (Powers *et al.*, 2003).

De par leur relative ubiquité, ils ont été les plus étudiés et apparaissent comme possédant une structure et un mode d'action plutôt simple. Généralement cationiques et possédant 40 à 60% de résidus hydrophobes, ils sont d'une taille inférieure à quarante acides aminés et ne possèdent pas de résidu cystéine. Rarement structurés en solution aqueuse, ces peptides linéaires vont se structurer au contact de la membrane bactérienne, adoptant une conformation en hélices α amphiphiles (**Figure 17**). Induisant une perméabilisation membranaire, ces peptides forment des pores au sein de la membrane, facilitant leur insertion en son sein après interaction avec les phospholipides membranaires.



Figure 17 : Structure secondaire d'un peptide antimicrobien en hélice α amphiphile (Powers *et al.*, 2003)

Peptides en feuillets β

La famille des peptides organisés en feuillets β contient généralement des cystéines leur permettant de stabiliser leur structure au moyen de ponts disulfures. Généralement, ils vont être caractérisés par une série de feuillets β anti-parallèles. De plus, la présence de portions

organisées en hélices α permet de maintenir un caractère amphiphile nécessaire à l'interaction avec la membrane biologique et au mécanisme d'action antimicrobien (**Figure 18**).

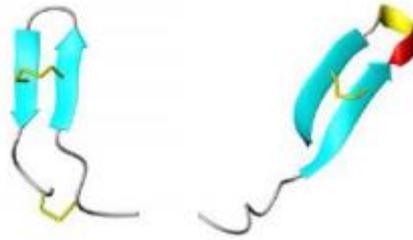


Figure 18 : Structure secondaire des peptides antimicrobiens organisés en feuillets β (Powers *et al.*, 2003)

Ce sont des peptides non linéaires dont trois classes peuvent être référencées en fonction du nombre de ponts disulfures présents. Contenant un ou deux ponts disulfures, la première classe possède des peptides tels que la protégrine (Toke, 2005). La deuxième, avec trois ou quatre ponts disulfures, forme généralement un cycle ouvert, comme pour les défensines (Bulet *et al.*, 2004). Enfin, la troisième classe regroupe les peptides cycliques, comme la thnatine (Powers *et al.*, 2003).

Peptides non structurés riches en acides aminés particuliers

Les peptides antimicrobiens riches en acides aminés particuliers n'adoptent pas de structure secondaire organisée en hélice α ou en feuillet β . Ils sont appelés « *extended peptide* » (Powers *et al.*, 2003), comme illustré en **Figure 19**.



Figure 19 : Structure secondaire d'un peptide non structuré (Powers *et al.*, 2003)

Leur séquence est caractéristique puisqu'elle est riche en certains acides aminés. Les plus répandus sont ceux riches en histidine (histatine), proline et argine (Pr 39), proline et phénylalanine (prophénine) et tryptophane (indolicine) (Epanand *et al.*, 1999; Powers *et al.*, 2003).

Au contraire des peptides organisés en hélice α qui induisent une perméabilisation de la membrane bactérienne, ces derniers agissent plutôt au niveau de la synthèse de protéines (Andreu *et al.*, 1998).

Peptides à structure « random coil »

Cette famille se différencie des antimicrobiens classiques de prime abord par une séquence courte, souvent inférieure à dix acides aminés. La charge globale du peptide est positive mais il possède peu de résidus hydrophobes, voire même aucun (Catiau *et al.*, 2011b; Nedjar-Arroume *et al.*, 2008).

En solution aqueuse, ces peptides dits en structure « *random coil* » peuvent s'organiser au contact de la membrane biologique par des mécanismes d'action qui leur sont propres, faisant intervenir un déterminant antimicrobien tel que le Lys-Tyr-Arg (KYR) ou le Arg-Tyr-His (RYH) (Catiau *et al.*, 2011b; Nedjar-Arroume *et al.*, 2008).

Le peptide antimicrobien α 137-141, issu de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine et peptide-cible de l'étude présente, figure au sein de cette famille et fait l'objet d'une présentation particulière ci-après.

1.3.5.3. Caractéristiques physico-chimiques des peptides antimicrobiens

Les structures des peptides antimicrobiens décrites précédemment ne sont pourtant pas seules garantes de l'activité. De ce fait, un certain nombre de caractéristiques physico-chimiques est aussi essentiel afin que le peptide puisse conférer son action. La charge, la conformation, l'hydrophobicité et le caractère amphiphile de la séquence peptidique sont autant d'éléments influençant son action de manière conjointe (Yeaman *et al.*, 2003).

Charge du peptide

La charge du peptide antimicrobien est un élément primordial de son activité. La plupart d'entre eux possède une charge globale positive, pouvant aller jusque +9 à pH neutre (Hancock *et al.*, 2006). D'une manière générale, il est décrit que ces domaines cationiques sont essentiels à l'établissement des interactions entre la membrane phospholipidique biologique, chargée

négativement, et le peptide par le biais d'interactions électrostatiques. Plus la charge du peptide est élevée, plus le potentiel antimicrobien du peptide est important.

Par ailleurs, Dathe *et al.* (2001) ont décrit que l'augmentation de la charge pouvait améliorer l'activité antimicrobienne d'un peptide contre des pathogènes Gram positif ou Gram négatif, par exemple en la portant de +3 à +5. Néanmoins, au-delà de cette charge, l'activité antimicrobienne se trouvait diminuée et en parallèle, l'activité hémolytique augmentée. Ceci était principalement dû au fait que l'interaction du peptide avec les têtes polaires des membranes bactériennes était devenue trop importante, empêchant la translocation de la séquence à l'intérieur de la membrane.

Conformation du peptide

En milieu neutre ou aqueux, les peptides antimicrobiens n'ont généralement pas de conformation définie. Leur organisation en structures secondaires, comme précédemment décrite, intervient lors de l'interaction de la séquence peptidique avec la membrane bactérienne.

Concernant les peptides en hélice α , de nombreux travaux ont montré leur instabilité dans les milieux aqueux et que le changement de conformation de linéaire à hélicoïdale se faisait au contact de la membrane biologique (Bechinger *et al.*, 1993; Matsuzaki *et al.*, 1991).

Les peptides organisés en feuillets β sont, quant à eux, beaucoup plus stables. Leur interaction avec les phospholipides membranaires leur permet d'adopter des conformations diverses, exposant des surfaces hydrophiles et hydrophobes distinctes, mais aboutissant le plus souvent à la formation de pores, comme les peptides en hélice α . Certaines formes particulières, notamment adoptées par les peptides riches en proline, arginine ou tryptophane, possèdent un mécanisme d'action différent de par leur plus grande rigidité. Leur activité serait induite par une modification de leur structure quaternaire ou par monomérisation (Yeaman *et al.*, 2003).

Les peptides sous forme cyclique sont eux aussi beaucoup plus rigides que les peptides sous forme linéaire. Moins efficaces lors de leur phase de fixation membranaire, ils présentent pourtant ensuite la même efficacité de perméabilisation membranaire. Leur activité serait liée à une modification de leur structure tertiaire (Powers *et al.*, 2003; Yeaman *et al.*, 2003).

Enfin, il a également été décrit que des peptides pouvaient s'assembler entre eux, par simple orientation favorable de leurs domaines hydrophiles et hydrophobes (Yeaman *et al.*, 2003).

Hydrophobie du peptide antimicrobien

L'hydrophobie d'un peptide est définie comme étant le pourcentage de résidus hydrophobes au sein de sa séquence en acides aminés. Cette caractéristique influe sur la capacité intrinsèque du peptide à se mouvoir depuis une phase aqueuse vers une phase hydrophobe (Dathe *et al.*, 1999).

La plupart des peptides antimicrobiens possède entre 40 et 60% de résidus hydrophobes, alternés avec des domaines cationiques. Ainsi, la partie cationique se charge de fixer le peptide aux têtes polaires des phospholipides des membranes, alors que la partie hydrophobe permet d'insérer le peptide au sein de la membrane, la déstabilisant et engendrant la lyse de l'agent microbien par entrée d'eau (Hancock *et al.*, 2000).

Le caractère hydrophobe du peptide est donc un élément-clé de l'activité antimicrobienne puisqu'une insuffisance de l'hydrophobie conduira à une affinité trop faible pour les lipides, alors qu'un excès d'hydrophobie provoquera son agrégation à la surface membranaire. Dans ce cadre, Dathe *et al.* (1997) et Wieprecht *et al.* (1997) ont pu étudier que l'élévation de l'hydrophobie augmentait l'activité antimicrobienne, mais qu'en parallèle, l'activité hémolytique était davantage prononcée. De plus, la spécificité antimicrobienne se trouvait diminuée. Plus précisément, l'hydrophobie d'un peptide joue principalement sur sa capacité à perméabiliser les membranes neutres, composées de phosphatidylcholine. Son influence sur les membranes négatives, c'est-à-dire contenant majoritairement des phospholipides anioniques comme le phosphatidylglycérol, est beaucoup moins notable. Dathe *et al.* (1999) expliquent dans ce cas que les interactions électrostatiques vont compenser la diminution des interactions hydrophobes.

Caractère amphiphile du peptide antimicrobien

Les interactions entre peptides antimicrobiens et membrane biologique provoquent la formation d'une structure fortement amphipathique. L'amphipacité reflète l'abondance et la polarisation relative des domaines hydrophobes et hydrophiles d'un peptide. Ce paramètre est aussi nommé « moment hydrophobe » et représente la résultante vectorielle des forces hydrophiles et hydrophobes présentes dans la structure normalisée à un idéal d'hélicité (Eisenberg, 1984).

L'augmentation du caractère amphiphile peut se faire par l'augmentation du nombre d'hélices α , entraînant l'augmentation de l'activité antimicrobienne sur les membranes

anioniques. Néanmoins, le peptide devient davantage hémolytique par effet plus prononcé sur les membranes neutres (Yeaman *et al.*, 2003).

1.3.5.4. Mécanismes d'action des peptides antimicrobiens

De par leurs structures et caractéristiques physico-chimiques variées, les peptides antimicrobiens possèdent des mécanismes d'action divers qui sont également adaptés au microorganisme dont ils vont inhiber la croissance.

Il a déjà été évoqué que la plupart des peptides antimicrobiens agissent directement au niveau de la membrane cellulaire, entraînant sa perturbation puis la mort de la cellule, par la mise en jeu de phénomènes osmotiques rapides. Toutefois, il existe des peptides antimicrobiens agissant sur des mécanismes intracellulaires, par exemple sur la synthèse de protéines (Jenssen *et al.*, 2006).

Mécanismes d'action des peptides perméabilisant les membranes

Globalement, le mécanisme d'action des peptides antimicrobiens se fait en plusieurs étapes : *i*) la fixation à la membrane (dépendante de la concentration du peptide et de sa capacité à s'auto-structurer), *ii*) l'intégration dans la membrane (dépendante de la conformation et de la capacité d'auto-assemblage des peptides) et *iii*) l'action (généralement la perméabilisation membranaire).

i) Fixation du peptide antimicrobien à la membrane bactérienne

Il s'agit de l'étape initiale de l'action antimicrobienne et implique d'une part des interactions hydrophobes entre les chaînes acyles lipidiques et les chaînes hydrophobes des peptides. D'autre part, les interactions électrostatiques entre les chaînes hydrophiles des peptides et les têtes polaires des phospholipides sont aussi indispensables.

L'établissement de l'interaction entre les charges positives des peptides et les charges négatives des phospholipides de la membrane bactérienne s'opère différemment selon le type de bactérie-cible. Le lipopolysaccharide (ou LPS) des bactéries à Gram-négatif, par le biais de ces groupements phosphate, ou le peptidoglycane des bactéries à Gram-positif, par le biais d'acides lipoteichoïques, sont impliqués (Jenssen *et al.*, 2006).

Il existe toutefois certains peptides interagissant de manière préférentielle avec des molécules spécifiques de l'enveloppe. Pour exemple, la nisine se lie spécifiquement à un précurseur de la biosynthèse des peptidoglycanes (Breukink *et al.*, 1999).

Une fois fixé à la membrane, il a été décrit que les peptides antimicrobiens possédaient deux états de fixation. Le premier est un état dit « de surface » (ou S). Le second, ou état I, est un état de formation de pores, où le peptide est prêt à intégrer la membrane biologique (Huang, 2000).

ii) Intégration du peptide antimicrobien au sein de la membrane bactérienne

Les peptides, une fois fixés, peuvent se multimériser afin d'adopter des structures spécifiques à leur mode d'action telles que des pores. Il est à noter que la création de ces structures s'effectue seulement après le dépassement d'un seuil de concentration spécifique non seulement au peptide donné, mais également au microorganisme visé (Yang *et al.*, 2000).

Dans un premier temps, où le ratio peptides/lipides est faible, les peptides sont donc sous état inactif, ou état S, adsorbés sur la membrane. Pour cet état, les peptides sont orientés de manière parallèle à la membrane. Ensuite, avec l'augmentation de peptides fixés, le ratio peptides/lipides augmente lui aussi, permettant aux peptides de s'orienter de manière perpendiculaire à la membrane. Ils peuvent alors s'y insérer et former des pores transmembranaires : les peptides sont en état I (Huang, 2000).

iii) Actions antimicrobiennes : les différents modèles

Après fixation et intégration des peptides antimicrobiens, l'expression de l'activité s'effectue ensuite. Une fois la membrane lipidique passée, les peptides peuvent agir avec la membrane cytoplasmique et exercer leur activité antimicrobienne. D'une part, cela peut s'effectuer par le biais de la lyse membranaire aboutissant à une fuite du contenu cytoplasmique. Il s'agit principalement des peptides arrangeant des pores aboutissant à une modification de la perméabilité membranaire.

Différents modèles ont été décrits : le modèle en douves de tonneau, le modèle en pores toroïdaux et le modèle en tapis. Exposés ci-après successivement, ces modèles historiques ont ensuite fait l'objet du modèle de Shai, Matsuzaki et Yang.

Modèle en douves de tonneau

Le modèle en douves de tonneau est le modèle le plus classique. Il est principalement décrit pour des peptides adoptant une structure en hélice α lors de leur interaction avec la membrane phospholipidique, comme décrit par Breukink *et al.* (1999) ou Yeaman *et al.* (2003)

Les peptides s'orientent de manière perpendiculaire à la membrane. Leurs résidus hydrophobes se retrouvent en contact des lipides. Après internalisation, les peptides se regroupent dans la membrane et exposent leurs régions peptidiques hydrophiles vers l'intérieur afin de se disposer en canal en forme de tonneau, à travers duquel une fuite du contenu cytoplasmique s'effectue (**Figure 20**). La lyse de la bactérie est alors due à un déséquilibre osmotique.

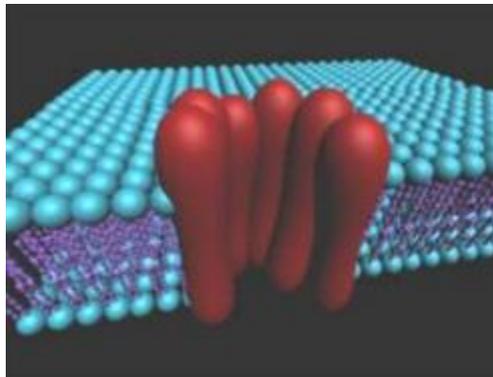


Figure 20 : Représentation du modèle en douves de tonneau (Etienne, 2004)

Modèle en pores toroïdaux

Le modèle en pores toroïdaux implique que les peptides antimicrobiens soient organisés en hélices α (**Figure 21**).

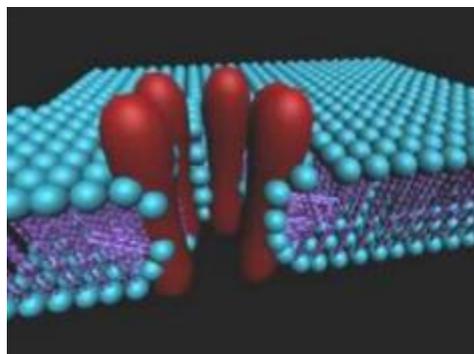


Figure 21 : Représentation du modèle en pores toroïdaux (Etienne, 2004)

Dans un premier temps, ces derniers forment des structures amphiphiles au contact de la membrane, puis y enfouissent leur partie hydrophobe. L'insertion de ces parties provoque un déplacement des têtes polaires des phospholipides, induisant une courbure de la membrane (Hirsh *et al.*, 1996). Les peptides s'orientent ensuite de manière perpendiculaire à la membrane jusqu'à former un pore dont les parois sont constituées non seulement par les domaines hydrophiles des peptides, mais également par les phospholipides qui participent aussi à la réalisation du pore. Ceci contraste avec le modèle en douves de tonneau où l'intérieur du pore n'était construit que de la partie hydrophile des peptides antimicrobiens.

Modèle en tapis

Contrairement aux deux modèles précédents, l'orientation des peptides s'effectue ici uniquement de manière parallèle à la membrane (Pouny *et al.*, 1992). Cela se traduit par le fait que les peptides restent en contact avec les têtes polaires des lipides durant l'ensemble du processus de perméabilisation de la membrane sans pour autant s'insérer au niveau de son cœur hydrophobe (**Figure 22**).

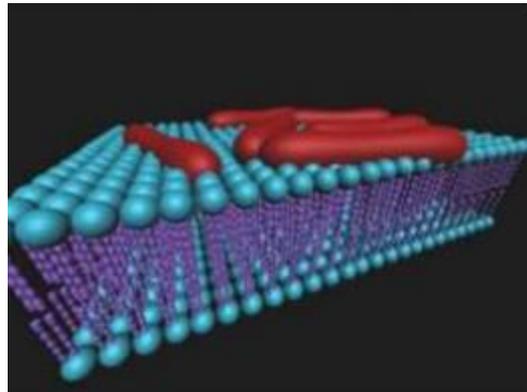


Figure 22 : Représentation du modèle en tapis (Etienne, 2004)

Les perturbations de fluidité de la membrane aboutissant à sa rupture interviennent grâce à l'accumulation des peptides, formant un véritable tapis en surface. Ce dernier s'insinue alors plus ou moins entre les têtes hydrophiles des phospholipides. Les peptides présents engendrent la formation de micelles et de pores dans la membrane une fois un important ratio peptides/lipides atteint (Jenssen *et al.*, 2006). En outre, ce modèle ne requiert pas l'adoption d'une structure secondaire particulière par les peptides.

L'ensemble de ces trois modèles (en douves de tonneau, en pores toroïdaux et en tapis) a abouti à un modèle décrit par trois auteurs : Shai, Matsuzaki et Yang. Ils ont émis l'hypothèse que ces modèles n'en étaient en réalité qu'un seul et unique où les différents états survenaient de manière chronologique (Matsuzaki, 1999; Shai, 1999; Yang *et al.*, 2000).

Modèle de Shai, Matsuzaki et Yang

Zasloff (2002) décrit ce modèle comme étant la succession de quatre étapes menant à deux finalités (**Figure 23**).

Globalement, les peptides s'associent sous la forme d'un tapis dans un premier temps. Ce dernier, s'il n'est pas suffisant pour rompre la membrane, conduit à la pénétration membranaire de peptides organisés en hélice α et, enfin, à la formation de pores. Ces désordres osmotiques engendrent soit la mort de la cellule, soit la diffusion de fragments peptidiques à cible intracellulaire.

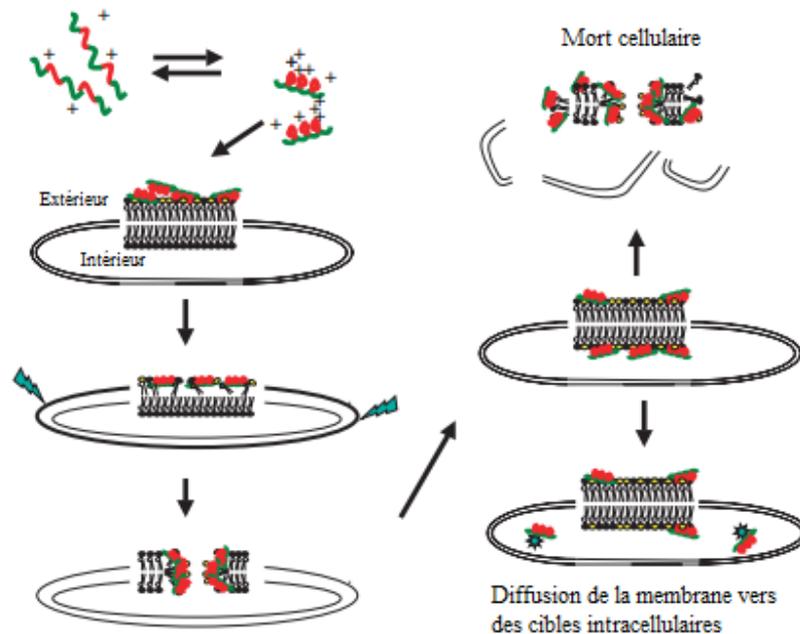


Figure 23 : Modèle de Shai, Matsuzaki et Yang (Zasloff, 2002)

iv) Aboutissement du mécanisme d'action : la mort cellulaire

Les mécanismes d'action ont ainsi pour principal but d'arriver à déstabiliser suffisamment la membrane cellulaire afin de conduire à la mort de la bactérie.

Le premier fait dans cet aboutissement réside en des perturbations d'ordre local, au niveau de l'organisation des phospholipides de la membrane. Ensuite, surviennent une fuite des

métabolites cytoplasmiques, une dépolarisation membranaire et enfin l'arrêt des activités de synthèse de l'organisme menant à l'arrêt des fonctions essentielles de la cellule (Yeaman *et al.*, 2003).

Néanmoins, la perméabilisation seule de la membrane ne suffit pas à engendrer la mort cellulaire. Il apparaît qu'un peptide donné puisse agir à plusieurs niveaux ou encore faciliter l'action d'autres protéines impliquées dans les phénomènes de cytolyse.

Également, un effet synergique de plusieurs peptides antimicrobiens peut être décrit. Ainsi, si de nombreux mécanismes de perméabilisation sont aujourd'hui proposés et sont probablement les plus connus, certains peptides antimicrobiens peuvent agir différemment.

Mécanismes d'action des peptides antimicrobiens à action intracellulaire

Les peptides antimicrobiens à action intracellulaire fonctionnent comme un couple ligand-récepteur.

Ce mécanisme a par exemple été décrit pour des peptides riches en un acide aminé particulier, comme les peptides riches en arginine qui peuvent être facilement transportés au sein du milieu intracellulaire, que ce soit pour une bactérie à Gram positif ou à Gram négatif (Powers *et al.*, 2003). Leur action se situe au niveau d'interaction avec des protéines, ADN ou ARN, afin d'inhiber des voies métaboliques menant à terme à la mort cellulaire (Brogden, 2005; Jenssen *et al.*, 2006).

Cette vue d'ensemble des peptides antimicrobiens permet d'identifier la complexité du domaine et d'appréhender non seulement la variété des composés, mais également la diversité des mécanismes mis en jeu.

Au sein de l'hémoglobine bovine, de nombreuses séquences ont été identifiées comme ayant une activité antimicrobienne. Le **Tableau 4** les récapitule.

Tableau 4 : Peptides antimicrobiens issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine

Milieu d'hydrolyse	Position	Séquence	Référence
	α 1-32	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAELERM	a
	α 1-29	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEL	a
	α 1-28	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAFA	a
	α 1-27	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEE	a
	α 1-23	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAE	a
	α 3-98	FLSFPTTKTYFPHFDSLHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNF	a
	α 3-97	FLSFPTTKTYFPHFDSLHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVN	a
	α 3-98	LSFPTTKTYFPHFDSLHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNF	a
	α 3-97	SFPTTKTYFPHFDSLHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVN	a
	α 3-98	PTTKTYFPHFDSLHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNF	a
	α 3-83	FLSFPTTKTYFPHFDSLHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSEL	a
	α 3-83	LSFPTTKTYFPHFDSLHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSEL	a
Milieu aqueux	α 3-66	FLSFPTTKTYFPHFDSLHGSAQVKGHGAKVAAAL	a
	α 3-66	LSFPTTKTYFPHFDSLHGSAQVKGHGAKVAAAL	a
	α 3-46	FLSFPTTKTYFPHF	a
	α 3-45	FLSFPTTKTYFPFH	a
	α 3-46	LSFPTTKTYFPHF	a
	α 3-45	FPTTKTYFPFH	a
	α 3-46	PPTTKTYFPFH	a
	α 107-141	VTLASHLPSDFTPAVHASLDFLANVSTVLTSKYR	a
	α 107-136	VTLASHLPSDFTPAVHASLDFLANVSTVL	a
	α 107-133	VTLASHLPSDFTPAVHASLDFLANVS	a
	α 133-141	STVLTSKYR	a
	α 137-141	TSKYR	a
	β 1-30	MLTAEKAAVTAFWGKVKVDEVGGEALGRL	a
	β 1-13	MLTAEKAAVTAF	a

(suite du Tableau 4)

Milieu d'hydrolyse	Position	Séquence	Référence
Milieu aqueux	β114-145	ARNFGKEFTPV LQADFQKVVAGVANALAHRYH	a
	β121-145	FTPV LQADFQKVVAGVANALAHRYH	a
	β126-145	QADFQKVVAGVANALAHRYH	a
hydroalcoolique	β140-145	LAHRYH	a
	α1-32	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAELERM	b
	α1-33	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAELERM	b
	α1-46	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAELERMFLSPTTKTYPPHF	b
	α100-105	LLSHSL	b
	α106-141	LVTLASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVSTVLTSKYR	b
	α107-128	VTLSHLPSDFTPAVHASLDKF	b
	α107-133	VTLSHLPSDFTPAVHASLDKFLANVS	b
	α107-136	VTLSHLPSDFTPAVHASLDKFLANVSTVL	b
	α107-141	VTLSHLPSDFTPAVHASLDKFLANVSTVLTSKYR	b
	α110-141	ASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVSTVLTSKYR	b
	α137-141	TSKYR	b
	α3-36	SAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAELERMFLSF	b
	α34-65	LSPTTKTYPPHFDSLHSGSAQYKKGAKVAAA	b
	α62-91	VAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKL	b
α67-106	VAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKL RVDVPVNFKLLSHSL	b	
α73-105	LDDLPGALSELSDLHAHKL RVDVPVNFKLLSHSL	b	
α86-109	LHAHKL RVDVPVNFKLLSHSLVTL	b	
α96-106	VNFKLLSHSL	b	
α99-105	KLLSHSL	b	
α99-106	KLLSHSL	b	
β1-30	MLTAEKAAVTAFWGKVKVDEVGGEALGRL	b	
β77-125	LDDLKGTFAALSELHCDKLVDPENFKLLGNVLVVVLARNFGKEFTPV L	b	

(suite du Tableau 4)

Milieu d'hydrolyse	Position	Séquence	Référence
	β79-104	DLKGTFAAALSELHCDKHLHVDPENFKL	b
	β85-105	AALSELHCDKHLHVDPENFKLL	b
Milieu hydroalcoolique	β114-124	ARNFGKEFTPV	b
	β114-145	ARNFGKEFTPVLQADFQKVVAGVANALAHRYH	b
	β126-145	QADFQKVVAGVANALAHRYH	b

Références :

a : Nedjar-Arroume *et al.*, 2008

b : Adje *et al.*, 2011a; Adje *et al.*, 2011b

1.3.5.5. Le peptide actif α 137-141 : un peptide antimicrobien original

Le peptide α 137-141 (**Figure 24**) représente les cinq derniers acides aminés en C-terminal de la chaîne α de l'hémoglobine bovine, à savoir : Thr¹³⁷-Ser¹³⁸-Lys¹³⁹-Tyr¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ (TSKYR), est d'une masse molaire de 653 Da et possède un point isoélectrique de 10.5. Il est ainsi chargé +2 à un pH de 7 (Catiau *et al.*, 2011b).

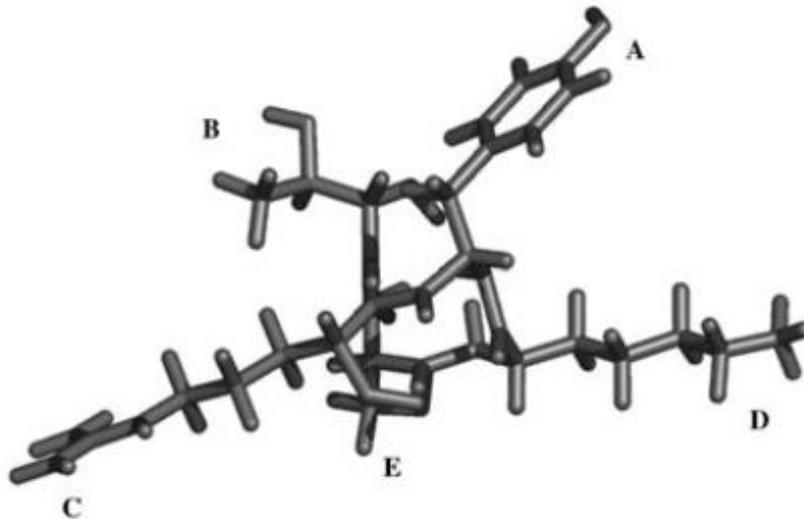


Figure 24 : Structure de l' α 137-141 (Lopes *et al.*, 2005)
A : tyrosine, B : thréonine, C : arginine, D : lysine, E : serine

Il fut isolé pour la première fois en 1982 à partir du cerveau bovin (Takagi *et al.*, 1982). La première activité découverte pour ce peptide fut l'activité analgésique, qui lui valut le nom de « néokyotorphine ». Il possédait un effet comparable à celui de la Leu-enképhaline, un neuropeptide endogène produit par les cellules neuronales intervenant comme messager chimique dans les circuits de la douleur (Kiso *et al.*, 1983). L'action de la néokyotorphine est bloquée par un antagoniste aux récepteurs opioïdes, la naloxone. Ce traitement est principalement administré en cas de surdose aux substances morphiniques et permet de bloquer l'interaction entre composés opioïdes ou morphiniques et leur récepteur afin d'en arrêter l'action (Ueda *et al.*, 1987). Également, l'acide γ -aminobutyrique, ou GABA, est un neurotransmetteur dit « de l'anxiété », ayant pour fonction de participer à la diminution de l'activité nerveuse des neurones lors d'une situation de stress ou de peur. La néokyotorphine serait impliquée dans l'inhibition de ce processus, maintenant une surexcitation neuronale (Ueda *et al.*, 1987).

L'implication physiologique de ce peptide ne se limite pas à ces seuls effets analgésiques. Il a également été référencé d'autres activités telles que des rôles dans la thermorégulation (Kolaeva *et al.*, 1990), dans la modulation vagale sur le rythme cardiaque (Pokrovky *et al.*, 1995), dans la sortie de l'état d'hibernation chez certains animaux (Popova *et al.*, 2003) ou encore dans la prolifération des adipocytes ou de certaines cellules cancéreuses (Blishchenko *et al.*, 2001; Sazonova *et al.*, 2003; Sazonova *et al.*, 2007).

Bien qu'il soit impliqué dans de nombreuses chaînes de réactions physiologiques, le processus de génération *in vivo* de la néokyotorphine reste peu documenté (Gomes *et al.*, 2010). En revanche, *in vitro*, sa production à partir de l'hémoglobine bovine purifiée modèle, composante majeure du cruor, co-produit des abattoirs, est bien renseignée et implique l'utilisation de la pepsine porcine (Catiau *et al.*, 2011b; Dubois *et al.*, 2005; Lignot *et al.*, 1999; Nedjar-Arroume *et al.*, 2006), outil de production peptidique précédemment décrit.

En plus de ses effets analgésiques, son isolement à partir de d'hydrolysats peptidiques de l'hémoglobine bovine a permis de mettre en évidence une activité antimicrobienne particulièrement intéressante contre de nombreuses bactéries, incluant des souches pathogènes. L'action a ainsi permis de montrer des effets contre des Gram-positifs (*Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua* et *Micrococcus luteus*) et des Gram-négatifs (*Escherichia coli* et *Salmonella enteritidis*) (Catiau *et al.*, 2011b; Nedjar-Arroume *et al.*, 2006). Par comparaison avec des peptides antimicrobiens plus connus de l'hémoglobine bovine, les fragments α 1-23 et α 1-32, l' α 137-141 possède des concentrations minimales inhibitrices (ou CMI) jusqu'à 54 fois plus faibles contre une souche donnée (**Tableau 5**), marquant une activité antimicrobienne bien plus puissante que d'autres peptides issus de l'hémoglobine bovine, mais dont la séquence en acides aminés est plus longue (Catiau *et al.*, 2011b; Nedjar-Arroume *et al.*, 2006).

Tableau 5 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de peptides purs issus de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine isolés par CLHP-PI (Catiau *et al.*, 2011b; Nedjar-Arroume *et al.*, 2008; Nedjar-Arroume *et al.*, 2006)

Peptides \ Souches	Gram -		Gram +		
	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. innocua</i>	<i>M. luteus</i>
α 1-23	54	27	27	54	90
α 1-32	154	54	38	38	90
α 137-141	9	4.6	1	1	9

(CMI exprimées en μ M)

De par sa séquence de seulement cinq acides aminés, ne possédant pas de résidus hydrophobes ni structure secondaire, son mécanisme d'action n'est pas classique. Il fait intervenir un déterminant antimicrobien, le Lys-Tyr-Arg (ou KYR), constitué des trois derniers acides aminés en C-terminal du peptide (Catiau *et al.*, 2011b). Ceci a également été décrit pour un autre peptide antimicrobien, issu de la chaîne β l'hémoglobine bovine, possédant les acides aminés Arg-Tyr-His (ou RYH) comme déterminant antimicrobien (Catiau *et al.*, 2011a).

Les charges positives des acides aminés d'un peptide, induites par la lysine et l'arginine dans le cas de la néokyotorphine, peuvent permettre l'interaction du peptide avec les membranes biologiques, sans intervention d'une structure secondaire (Powers *et al.*, 2003). Les charges positives du peptide interagissent avec les charges négatives disponibles au niveau des phospholipides membranaires. Ceci induit un changement conformationnel de la tyrosine (Y). Son noyau phénolique change d'orientation par rapport à la membrane lipidique, devenant parallèle aux phospholipides (Lopes *et al.*, 2005), comme montré en **Figure 25**.

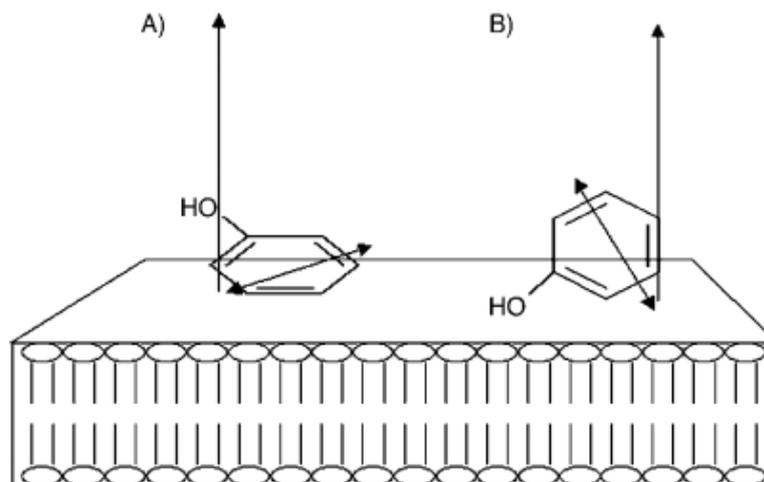


Figure 25 : *Changement d'orientation du noyau aromatique de la tyrosine de la néokyotorphine après interaction avec une membrane biologique (Lopes et al., 2005)*
A : *noyau phénolique perpendiculaire à la membrane biologique induisant une pénétration réduite du peptide au sein de la structure* ; B : *noyau phénolique parallèle à la membrane biologique favorable à une pénétration importante du peptide au sein de la structure*

De cette manière, le peptide peut pénétrer plus profondément au sein de la membrane, jusqu'à déstabiliser totalement la structure, induisant un effet antimicrobien particulièrement important (Catiau *et al.*, 2011b; Lopes *et al.*, 2005). Il a ainsi été démontré que la néokyotorphine possédait la capacité de rompre les membranes artificielles des liposomes, autant pour les Gram-positifs comme *Staphylococcus aureus* que les Gram-négatifs comme *Escherichia coli* (Catiau *et al.*, 2011b).

L'ensemble de ces caractéristiques permet de souligner l'originalité du peptide α 137-141 comme antimicrobien.

Les peptides bioactifs issus de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine porcine sont donc particulièrement renseignés et variés, permettant de prendre conscience de la bonne connaissance de la source de base. Ceci en fait un co-produit de l'industrie agroalimentaire parfaitement adapté pour la valorisation par le biais de la production en masse de peptides bioactifs.

Néanmoins, l'activité antimicrobienne reste la plus abondante et la plus documentée. Les spécificités du peptide actif α 137-141 en font un peptide de choix en termes d'études séparatives à partir d'hydrolysats complexes.

La suite de la synthèse bibliographique s'intéresse donc logiquement aux différentes stratégies mises en place pour la séparation sélective de peptides issus d'hydrolysats peptidiques.

1.4. Stratégies de séparation sélective de peptides issus d'hydrolysats peptidiques

1.4.1. Fractionnement d'hydrolysats : point de vue général

Les hydrolysats possèdent la particularité de présenter une richesse et une diversité de peptides aux paramètres physico-chimiques variés. Toutefois, le nombre de peptides générés lors de l'hydrolyse enzymatique engendre le fait qu'un ensemble de peptides puisse posséder des caractéristiques proches, rendant ainsi complexe l'extraction sélective et spécifique d'un seul d'entre eux. Bien souvent, l'enrichissement d'une fraction en un peptide particulier est privilégié à son isolement (Agyei et Danquah, 2011). De plus, l'extraction et/ ou la concentration en peptides d'intérêt est généralement nécessaire afin d'obtenir une bioactivité intéressante pour une éventuelle valorisation applicative (Danquah et Agyei, 2012; Udenigwe et Aluko, 2012).

Les techniques sélectionnées pour extraire un peptide d'intérêt à partir de son milieu font intervenir ses caractéristiques physico-chimiques, d'où l'importance de la caractérisation

initiale de son environnement afin de connaître les paramètres pouvant influencer le procédé de séparation, tant dans sa sélectivité que dans sa productivité. Les paramètres physico-chimiques des peptides sont principalement la masse moléculaire, l'encombrement stérique, leur charge et leur hydrophobie. Pour cela, de nombreux procédés ont vu le jour et mettent à profit un ou plusieurs de ces critères de sélection, comme résumé par le **Tableau 6** pour les méthodes les plus classiquement utilisées aujourd'hui. Il est à noter qu'en fonction des membranes utilisées au sein des procédés membranaires, la sélectivité peut s'appliquer sur un ou plusieurs critères (Saxena *et al.*, 2009).

Tableau 6 : Procédés de fractionnement d'hydrolysats et critères de sélectivité mis à profit

Procédé / Critère sélectif	Masse moléculaire	Encombrement stérique	Charge	Hydrophobie
Extraction par solvant	-	-	-	+
Chromatographie d'exclusion stérique	+	+	-	-
Chromatographie d'échange d'ions	-	-	+	-
Chromatographie d'affinité	-	+	-	-
Chromatographie d'interaction hydrophile/ hydrophobe	+	-	-	+
Procédés baromembranaires	+	+	+	+
Procédés électrobaromembranaires	+	+	+	+
Procédés électromembranaires	+	+	+	+

D'autres procédés peuvent également être envisagés, mais sont peu renseignés pour l'étude de la séparation sélective de peptides à partir d'hydrolysats peptidiques. Ces technologies émergentes peuvent toutefois être intéressantes dans les années à venir. Il s'agit par exemple de l'extraction par solvant assistée par ultrasons (D'Alessandro *et al.*, 2013), de l'emploi de membranes constituées de polyélectrolytes (Guedidi *et al.*, 2010), de la chromatographie de partage centrifuge (Boudesocque *et al.*, 2012), des fluides supercritiques (Tognarelli *et al.*, 2010), du moussage-drainage (Vanhoute *et al.*, 2008), ou de l'extraction par système à deux phases aqueuses (Raja *et al.*, 2011).

Toutefois, la proximité physico-chimique des peptides en présence rend complexe l'emploi d'une seule étape de séparation, généralement basée sur un ou deux critères de sélectivité. Les procédures d'enrichissement de peptides se basent donc bien souvent sur une succession d'étapes, permettant chronologiquement de discriminer du mélange initial les peptides ne correspondant pas au(x) critère(s) de sélection de l'étape donnée. Néanmoins, pour permettre de maximiser le rendement obtenu en composés cibles et d'éviter toute détérioration ou perte de fonction de ceux-ci, il est primordial que l'ensemble soit optimisé et maîtrisé en chaque point (Galanakis, 2012). Classiquement, la méthodologie mise en place pour le fractionnement peptidique ou l'enrichissement inclut une étape d'ultrafiltration, utilisée en routine pour l'enrichissement à partir de mélanges protéiques ou peptidiques, suivie d'une ou deux étapes additionnelles. Parmi celles-ci, l'échange d'ions, la gel filtration ou encore la chromatographie liquide sont largement plébiscitées (Agyei *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2015; Clemente, 2000; Lafarga *et al.*, 2014). Un schéma global des procédés de séparation et de leur succession en stratégie de purification a été proposé par Galanakis (2012) (**Figure 26**). Son originalité est d'opposer technologies classiques et émergentes pour la récupération de composés actifs à partir de déchets de l'industrie agroalimentaire afin d'en être des produits finaux à haute valeur ajoutée.

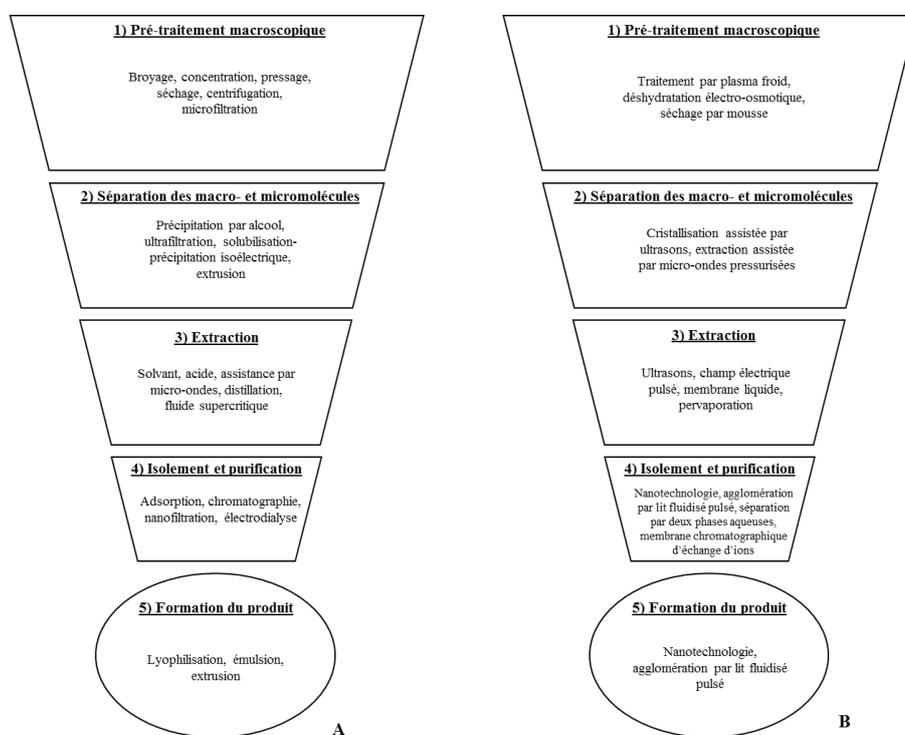


Figure 26 : Schéma global de purification de composés à haute valeur ajoutée à partir de déchets de l'industrie agroalimentaire (Galanakis, 2012)
(A) technologies classiques ; (B) technologies émergentes

Après une brève présentation des procédés d'extraction et chromatographiques appliqués au fractionnement d'hydrolysats peptidiques, un intérêt particulier sera porté aux procédés membranaires.

1.4.2. Fractionnement d'hydrolysats par extraction par solvant

Les procédés d'extraction liquide/liquide font intervenir des systèmes reposant sur l'affinité du soluté d'intérêt pour la phase réceptrice. Généralement, cette dernière est constituée d'un solvant organique.

Ce système a par exemple été utilisé afin d'extraire les hémorphines, notamment le peptide β 32-40, à partir de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par le biais d'une phase réceptrice constituée de 2-butanol (Aubes-Dufau *et al.*, 1995). Les hémorphines, peptides particulièrement hydrophobes, ont également pu être produites par hydrolyse enzymatique et extraites en continu au sein d'un réacteur bi-phasique (Froidevaux *et al.*, 2008; Froidevaux *et al.*, 2006).

L'avantage de cette technique ici démontré est la facilité de couplage entre l'extraction et la production peptidique. Néanmoins, les faibles rendements constatés sont un frein certain en termes de productivité. De plus, l'emploi de solvant en usage alimentaire est fortement déconseillé et pose aujourd'hui de véritables problèmes économiques et de recyclage. Cette technique apparaît donc comme inadaptée face aux enjeux de ce projet.

Également, dernier inconvénient et non des moindres, ce type de procédé est parfaitement inadapté à la récupération de peptides hydrophiles, comme c'est le cas du peptide actif α 137-141.

1.4.3. Fractionnement d'hydrolysats par procédés chromatographiques

Les procédés chromatographiques sont les utilisés pour l'isolement de peptides actifs mais également pour leur identification. La variété de ces procédés en fait des outils puissants, de par leur haute sélectivité et leur important pouvoir de résolution. Selon les phases stationnaires pouvant être mises en jeu, les procédés chromatographiques peuvent orienter leur sélectivité selon la masse moléculaire d'un composé d'intérêt pour l'exclusion stérique, le point

isoélectrique pour l'échange d'ions et l'hydrophobie ou l'hydrophilie pour les chromatographies en phase inverse ou normale (Castro *et al.*, 2015).

Néanmoins, leur coût d'utilisation est un frein important, de par non seulement l'emploi de solvants mais également par les faibles débits pouvant être imposés, souvent bien inférieurs à l'ordre du mL.min⁻¹.

Aujourd'hui, l'utilisation de la chromatographie s'avère bien trop prohibitive pour une montée à l'échelle industrielle et se cantonne bien généralement au secteur de l'analytique afin d'éviter des coûts de production exorbitants des peptides d'intérêt (Agyei *et al.*, 2011; Korhonen *et al.*, 2006).

1.4.4. Fractionnement d'hydrolysats par procédés membranaires

1.4.4.1. Procédés membranaires : point de vue général

La tendance industrielle actuelle impose des méthodologies permettant de maximiser la valeur ajoutée du produit, tout en réduisant l'impact environnemental des procédés utilisés et en garantissant un gain de temps optimal.

En cela, les procédés membranaires se positionnent dans leur ensemble comme des candidats tout à fait adaptés à la production en masse de peptides bioactifs à partir d'hydrolysats de protéines. Leur principal avantage est de permettre une montée en échelle, ou *scale-up*, particulièrement aisée sans utilisation de solvants. De par ce fait, le procédé peut se positionner comme éco-responsable et lutter contre le facteur limitant de la perte de bioactivité due à l'utilisation de liquides organiques. Le faible coût des membranes en fait également une catégorie de procédés très compétitifs (Saxena *et al.*, 2009).

Historiquement, l'industrie laitière fut la première à les adopter en masse et à les proposer comme alternatives à d'autres techniques de concentration (comme les procédés thermiques) ou de séparation (comme par exemple la décantation, la filtration, la centrifugation ou encore la chromatographie) (Pouliot, 2008). Leur utilisation couvre une large gamme d'opérations, comme exposé en **Figure 27**.

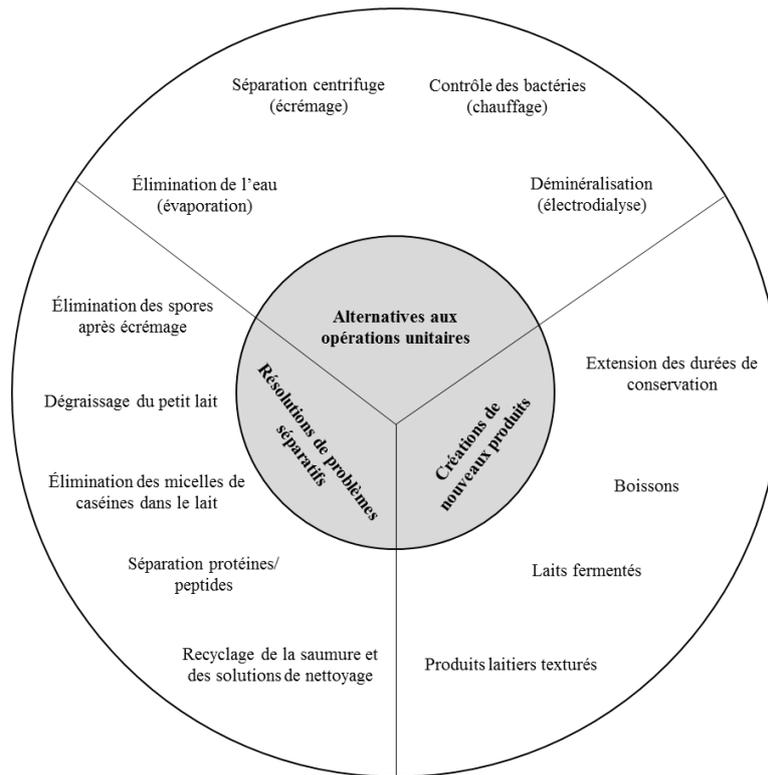


Figure 27 : Les procédés membranaires en industrie laitière (Pouliot, 2008)

Le principe des procédés membranaires est basé sur la perméabilité sélective d'un ou de plusieurs constituants liquides au travers d'une membrane donnée par application d'une force motrice. Lorsque cette dernière est un gradient de pression, il est alors discuté de procédés baromembranaires. Toutefois, d'autres forces peuvent aussi participer au transfert de matière de part et d'autre de la membrane. Si un potentiel électrique est appliqué de manière additionnelle, il sera alors parlé de procédé électrobaromembranaire. Si le champ électrique est la seule force motrice, on parlera alors de procédé électromembranaire (Bazinet et Firdaous, 2013).

Plus spécifiquement, les membranes sont considérées comme des barrières sélectives qui retiennent au sein de la solution d'alimentation les composés dont la masse moléculaire est plus élevée que son seuil de coupure. En revanche, elles permettent le passage, au sein de la solution de récupération (ou perméat), des composés dont la masse moléculaire est plus petite que son seuil de coupure. Ce dernier est défini comme étant la masse molaire du soluté le plus petit retenu à 90%. Ainsi, le large choix de membranes avec des tailles de pores variées permet d'employer la technologie adaptée à la séparation désirée. Pour les procédés baromembranaires, sont distinguées l'osmose inverse, la nanofiltration, l'ultrafiltration et la microfiltration, allant respectivement du soluté le plus petit (ions) au plus grand (suspension bactérienne), comme illustré en **Figure 28**.

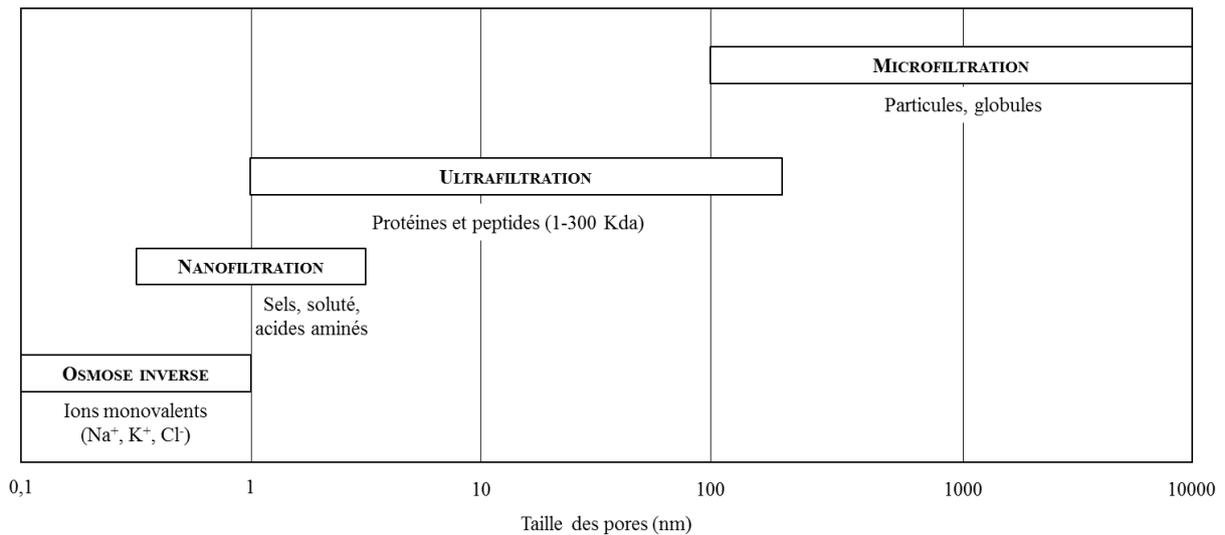


Figure 28 : Représentation schématique des procédés baromembranaires et des solutés retenus en fonction du seuil de coupure (Bazinet et Firdaous, 2013)

De par son seuil de coupure, l’ultrafiltration apparaît comme étant le procédé baromembranaire le plus adapté au fractionnement d’hydrolysat.

1.4.4.2. Fractionnement d’hydrolysats par ultrafiltration

L’ultrafiltration est une technique baromembranaire appliquée en routine dans le cadre de procédures d’enrichissement en peptides à partir d’hydrolysats protéiques par le biais de l’application d’un gradient de pression de part et d’autre de la membrane d’ultrafiltration (Bazinet et Firdaous, 2013; Saxena *et al.*, 2009), comme illustré par la **Figure 29**.

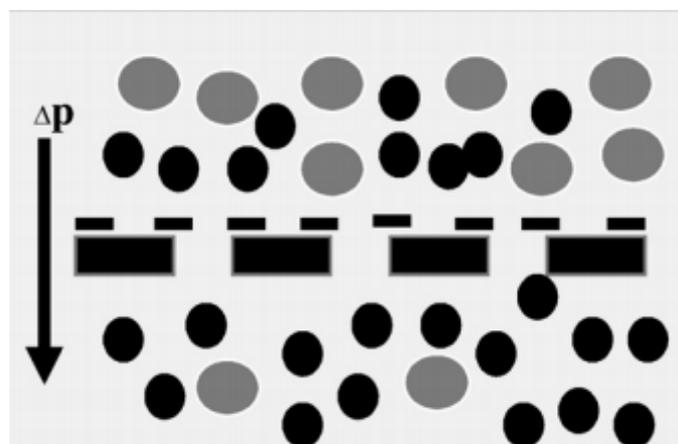


Figure 29 : Principe de l’ultrafiltration (Saxena *et al.*, 2009)

De nombreuses études ont permis l'obtention de fractions actives à partir d'hydrolysats de protéines variées et sont majoritairement recensées au sein de la revue « *Separation of bioactive peptides by membrane processes : technologies and devices* » (Bazinet et Firdaous, 2013). À titre d'exemples, il peut être cité des peptides antithrombotiques issus de la caséinomacropéptide bovine (Bouhallab *et al.*, 1995), l'hémorphine β 31-40 à partir de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine (Kapel *et al.*, 2003) ou encore divers inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I issus de l'hydrolyse de l' α -lactalbumine bovine (Pihlanto-Leppälä *et al.*, 2000).

Si aujourd'hui l'ultrafiltration est préférée aux techniques chromatographiques en industrie, c'est principalement pour son faible coût d'utilisation et sa facilité de montée en échelle permettant ainsi la production commerciale d'un produit (Agyei *et al.*, 2011, Danquah *et al.*, 2012, Saxena *et al.*, 2009).

Toutefois, la tendance au colmatage due à l'application d'un gradient de pression et l'adsorption des protéines ou peptides lors de l'opération de filtration est un désavantage certain dans son utilisation industrielle (Bazinet et Firdaous, 2013). Également, son manque de sélectivité restreint ses applications de par l'intervention d'une ou plusieurs étapes de séparation supplémentaire afin d'obtenir un produit dont la bioactivité serait directement exploitable (Agyei *et al.*, 2011). Néanmoins, l'ultrafiltration reste très largement plébiscitée comme simple méthode de concentration protéique (Saxena *et al.*, 2009).

De cette manière, il a été contraint d'œuvrer d'un point de vue technologique à l'amélioration de ce procédé en termes de sélectivité.

1.4.4.3. Fractionnement d'hydrolysats par électro-ultrafiltration

En raison de faibles différences de tailles entre les peptides d'un même hydrolysat peptidique, il a été jugé intéressant d'ajouter un second critère de sélection au procédé afin d'en améliorer la résolution séparative.

En plus d'un gradient de pression, un champ électrique a été ajouté comme seconde force motrice afin de faire migrer au sein du perméat non seulement selon la masse moléculaire du composé, mais également selon sa charge ou son point isoélectrique. Le principe de l'électro-ultrafiltration est présenté en **Figure 30**.

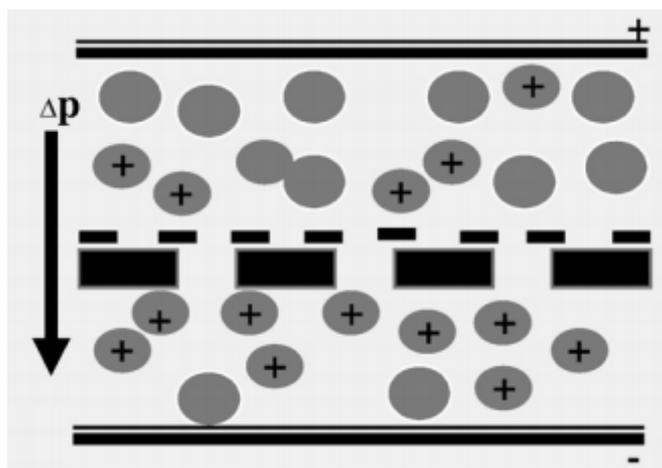


Figure 30 : Principe de l'électro-ultrafiltration (Saxena *et al.*, 2009)

L'électro-ultrafiltration a été notamment employée pour fractionner des hydrolysats d' α_s2 -caséine bovine (Bargeman *et al.*, 2002) et de lactoferrine bovine (Bargeman *et al.*, 2000) afin de récupérer des peptides antimicrobiens.

L'électro-ultrafiltration a permis de minimiser le colmatage membranaire impliqué dans les procédés baromembranaires (Zumbusch *et al.*, 1998) et a permis d'augmenter la sélectivité de ces derniers tout en augmentant la récupération des composés d'intérêt (Lentsch *et al.*, 1993).

Néanmoins, deux inconvénients majeurs sont à déplorer pour les procédés électrobaromembranaires. D'importantes variations de pH, dues à l'application du champ électrique, sont à noter au sein des compartiments, pouvant provoquer des interactions entre composés d'intérêt et électrodes, conduisant à des réactions d'oxydo-réduction et modifiant ainsi la solution d'alimentation et la solution de récupération (Bazinet, 2005). De plus, le gradient de pression appliqué provoque l'accumulation de molécules d'intérêt à proximité de la membrane, créant une couche à sa surface et participant à la modification de la sélectivité membranaire, ce qui a principalement été décrit pour l'électro-nanofiltration (Lapointe *et al.*, 2006). D'autres inconvénients sont également notables comme une grande consommation énergétique et un effet de dégagement de chaleur dus à l'application d'un champ électrique important, rendant difficile l'exploitation des procédés électrobaromembranaires pour la séparation de peptides à usage alimentaire (Saxena *et al.*, 2009).

Pour pallier à ces désavantages, d'autres systèmes ont été proposés, principalement avec l'unique application du champ électrique comme force motrice de part et d'autre de la membrane d'ultrafiltration.

1.4.4.4. Fractionnement d'hydrolysats par électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration

L'électrodialyse est un procédé électromembranaire, c'est-à-dire employant un champ électrique comme unique force motrice et non un gradient de pression. Les espèces chargées peuvent ainsi migrer d'un compartiment à un autre en traversant une ou plusieurs membranes sélectives. Les composés chargés vont donc être séparés de l'eau, des macro-solutés ou des espèces non-chargées par l'intermédiaire de membranes échangeuses d'ions qui permettent soit le passage des cations (pour les membranes échangeuses de cations), soit celui des anions (pour les membranes échangeuses d'anions) (Bazinet, 2005; Bazinet et Firdaous, 2013). Historiquement, les plus anciens travaux sur l'électrodialyse peuvent être attribués à Maignot *et al.* (1890), décrivant la plus simple forme d'électrodialyse. En effet, cette dernière n'était composée que de trois compartiments séparés par deux membranes semi-perméables, utilisées comme barrière physique entre les solution d'alimentation et produit. Un schéma d'une installation classique d'électrodialyse est proposé en **Figure 31**.

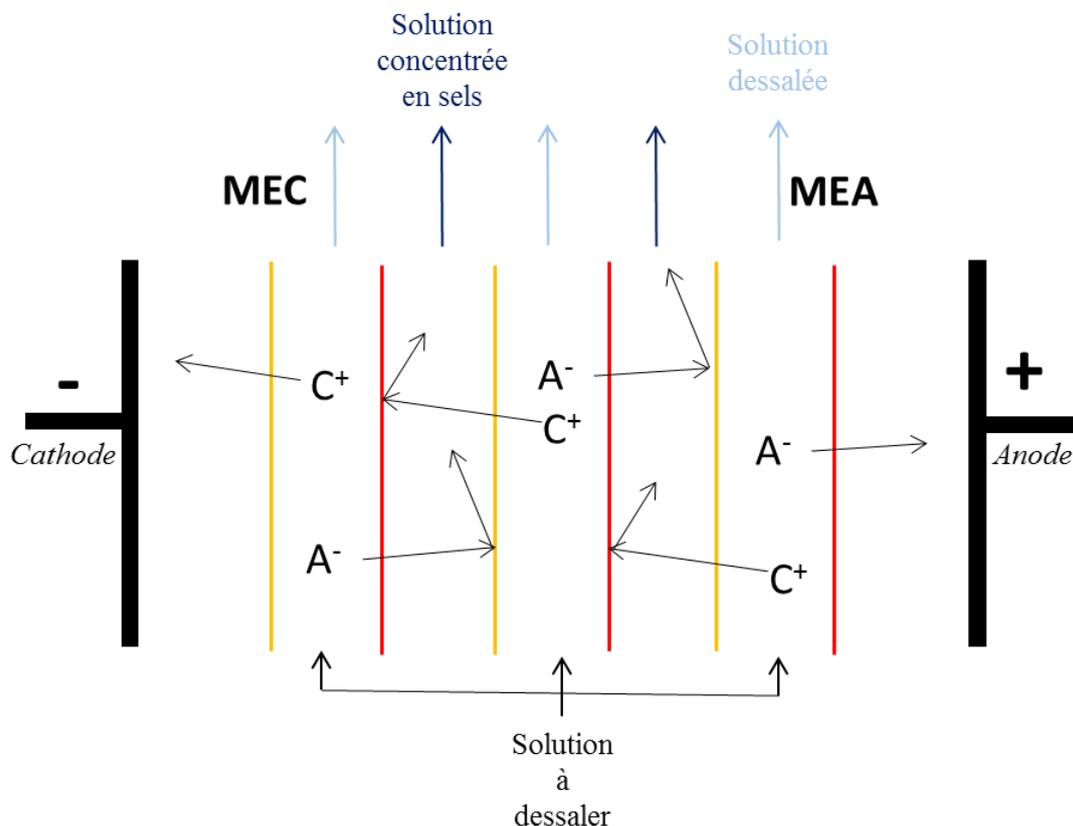


Figure 31 : Schéma d'électrodialyse conventionnelle
(MEC : Membrane Échangeuse de Cations ; MEA : Membrane Échangeuse d'Anions ;
A⁻ : anions ; C⁺ : cations)

Aujourd'hui, l'électrodialyse dite « conventionnelle » est toujours utilisée en industrie, notamment pour retirer les ions d'une solution, comme dans le cas des eaux saumâtres ou l'élimination des minéraux du lactosérum (Bazinet *et al.*, 1998). Fait notable, elle a également été employée récemment pour la purification de peptides bioactifs. En effet, sous l'influence du champ électrique, la solution d'alimentation initiale est déminéralisée, ce qui est particulièrement intéressant dans le cas des peptides obtenus par hydrolyse enzymatique à partir d'une protéine, l'hydrolysate en présence étant généralement riche en sels. De cette manière, les rendements de migration obtenus pouvaient être augmentés (Prévot *et al.*, 2003). Autre application, l'électrodialyse conventionnelle a été utilisée afin d'éliminer des petits peptides contenant des acides aminés non-désirés, ce qui a été expérimenté par Beckhoven *et al.* (2009) et Roos *et al.* (2011). Ceci a majoritairement permis de récupérer des séquences de deux ou trois acides aminés, comportant toutes un tryptophane.

Néanmoins, l'emploi des membranes échangeuses d'ions est un frein à la purification de peptides. Étant des membranes denses au sein desquelles le transfert de matière s'effectue essentiellement par diffusion, il serait préférable d'utiliser, comme dans le cas de l'ultrafiltration, des membranes bien calibrées, avec une taille de pores et un seuil de coupure bien définis. Toutefois, l'électrodialyse conventionnelle possède des avantages certains comme une faible consommation d'énergie, une installation déjà effective au sein des industries, ainsi qu'une bonne résistance à la chaleur, ce qui est particulièrement intéressant pour le travail de produits alimentaires (Bazinet et Firdaous, 2013). Ces arguments de taille tendaient donc à favoriser son développement comme procédé de séparation et/ ou de purification de mélanges complexes.

Prenant appui sur les modèles d'électrodialyse conventionnelle déjà présents sur le marché et au sein des laboratoires, Bazinet *et al.* (2005) ont breveté une technologie hybride, couplant l'électrodialyse conventionnelle à des membranes de filtration, permettant d'employer concrètement l'électrodialyseur comme technologie de séparation de protéines ou de peptides, en y insérant les membranes adaptées. L'électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration, ou EDUF, permet donc la séparation de molécules non seulement selon la charge (par l'application du champ électrique), mais également selon leur masse moléculaire (par le biais du seuil de coupure des membranes utilisées). Il en résulte un procédé électromembranaire, de par le fait qu'aucun gradient de pression n'est appliqué comme force motrice au sein du système pour séparer les composés d'intérêt. Ainsi, au sein de la solution d'alimentation, seuls les composés chargés et étant plus petits que le seuil de coupure de la membrane de filtration utilisée peuvent prétendre migrer au sein de la solution de récupération. Un schéma de l'EDUF, en configuration

simultanée, est détaillée en **Figure 32**. Elle permet de récupérer à la fois des composés cationiques et anioniques au cours du même traitement. Toutefois, elle peut être adaptée pour recueillir uniquement les composés anioniques ou cationiques. Dans ce cas, on parle respectivement de configuration anionique ou cationique.

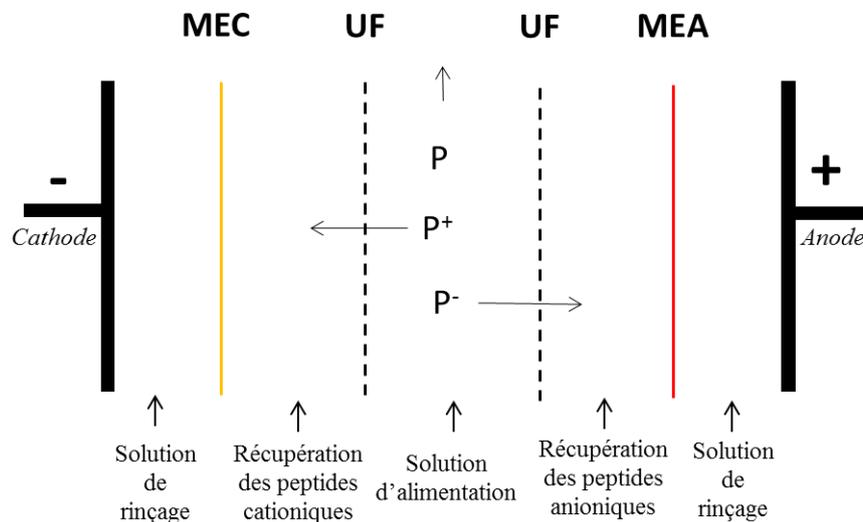


Figure 32 : Schéma de l'électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration en configuration simultanée (EDUF)
 (MEC : Membrane Échangeuse de Cations ; MEA : Membrane Échangeuse d'Anions ;
 UF : membrane d'UltraFiltration ; P : Peptide)

L'EDUF a permis le fractionnement de peptides bioactifs à partir de sources protéiques variées telles que les protéines blanches de luzerne (Firdaous *et al.*, 2010; Firdaous *et al.*, 2009), la β -lactoglobuline bovine (Poulin *et al.*, 2006, 2007), le soja (Langevin *et al.*, 2012; Roblet *et al.*, 2013) ou encore le crabe des neiges (Doyen *et al.*, 2011; Suwal *et al.*, 2014). Les activités des fractions récupérées après traitement sont elles aussi encourageantes pour la production de fractions bioactives puisque des peptides antimicrobiens, opioïdes, antihypertenseurs, antioxydants, hypocholestérolémiques ou encore anticancéreux ont pu être récupérés.

Véritable alternative pour la purification de peptides bioactifs aux techniques chromatographiques trop onéreuses et aux techniques baro- ou électrobaromembranaires peu sélectives, ce système n'emploie pas de solvant et permet de récupérer des composés sans étape supplémentaire de purification et sans perte d'activité. Néanmoins, dans le but d'isoler un composé à partir d'un mélange complexe initial, il peut être envisagé de coupler de manière aisée les opérations, comme ce fut par exemple évoqué pour le cas d'un couplage nanofiltration-EDUF par Langevin *et al.* (2012). De plus, son industrialisation est facilement envisageable, le parc d'électrodialyses conventionnelles étant conséquent. L'intérêt porte aussi sur ces capacités

d'intensification comme l'augmentation de la surface membranaire ou l'empilement des membranes afin de récupérer les composés d'intérêt recherchés en grande quantité.

De par son éco-responsabilité et ses capacités de *scale-up* et d'intensification particulièrement élevées, l'EDUF apparaît comme un outil prometteur et moderne pour le fractionnement d'hydrolysats peptidiques dans le but de récupérer des fractions actives immédiatement exploitables pour la valorisation d'un co-produit de l'industrie agroalimentaire.

Au travers de cette synthèse bibliographique, il a été mis en exergue l'intérêt d'employer le cruor bovin, co-produit des abattoirs, comme source à valoriser pour la production de produits d'intérêt à haute valeur ajoutée.

Il a ainsi été mis en avant sa facilité de procuration mais également sa très bonne documentation, avec un nombre remarquable d'articles scientifiques détaillant l'abondance des peptides bioactifs en étant issus. La plupart sont produits *via* hydrolyse enzymatique du composant majeur du cruor, l'hémoglobine bovine, par l'emploi d'un outil biotechnologique qui est la pepsine porcine. Ceci a particulièrement fait remarquer que les peptides antimicrobiens étaient majoritaires au sein de l'hydrolysats formé et qu'ils faisaient preuve d'une effervescence toute particulière de par leur multifonctionnalité et donc leur potentiel comme substitut à de nombreux produits de synthèse chimique, encore largement utilisés aujourd'hui.

La séparation des hydrolysats afin de récupérer spécifiquement ces composés est néanmoins un véritable challenge. Toutefois, des technologies émergentes peuvent prétendre à réussir cet objectif en ne se soustrayant pas aux règles d'éco-responsabilité actuelles, tout en ne sacrifiant pas les besoins de production massive, nécessaires à une valorisation économique intéressante du co-produit initial.

Chapitre 2

*Matériels et méthodes :
méthodes d'analyse peptidique*

Chapitre 2 :

Matériels et méthodes : méthodes d'analyse peptidique

Ce chapitre de « Matériels et méthodes » se consacre aux techniques d'analyse, communes à tous les chapitres de ce manuscrit. Les différents principes des techniques y sont exposés et les équipements et protocoles utilisés y sont détaillés.

Par la suite, chaque chapitre possède une section « Matériels et méthodes » qui lui est propre, détaillant les protocoles spécifiques au chapitre de résultats correspondant.

2.1. Analyse en Chromatographie Liquide Haute Performance en Phase Inverse (CLHP-PI)

La Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) en Phase Inverse (PI) a été utilisée comme méthode d'analyse de routine des différents échantillons réalisés tout au long de la démarche expérimentale. Elle a notamment permis de s'assurer de la bonne reproductibilité des résultats, mais également de quantifier les peptides présents. Elle a aussi permis de faire un premier pas dans l'identification des peptides obtenus lors de l'hydrolyse ou fractionnement par électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration (EDUF).

2.1.1. Principe

La CLHP est basée sur le principe de la différence d'affinité des composés à séparer, injectés au préalable, entre une phase dite « mobile » et une phase dite « stationnaire » représentée par la colonne. Pour l'étude de mélange complexe tel que les hydrolysats, les colonnes utilisées sont généralement constituées d'une phase hydrophobe, d'où l'appellation « en phase inverse » (PI), au contraire d'une phase plutôt hydrophile dite « phase normale ».

La phase stationnaire va ainsi comprendre un support composé de particules poreuses de silice, d'un diamètre oscillant entre 5 à 10 μm . Chacune possède un greffage de chaînes

aliphatiques constituées d'une succession d'un nombre déterminé de carbones. Dans le cas ci-présent, les groupements étaient un enchaînement de quatre carbones, soit une colonne de type C₄. Ce type de colonne est généralement recommandé pour l'analyse d'hydrolysats possédant des peptides d'une taille supérieure à vingt acides aminés.

La phase mobile, quant à elle, est souvent composée d'un mélange de solvants, l'un plutôt hydrophile, l'autre plutôt hydrophobe. Leur mélange permet ainsi de fournir de multiples combinaisons aboutissant à l'élution des composés d'intérêt sous la forme d'un gradient.

Concernant le fonctionnement général de la chaîne CLHP, il peut être résumé selon la **Figure 33**.



Figure 33 : Schéma de fonctionnement d'une chaîne CLHP

Successives au dégazeur permettant d'éliminer l'air des solvants, les pompes sont un élément indispensable de la chaîne CLHP. Elles vont permettre de forcer le passage de la phase mobile à travers la phase stationnaire selon un débit imposé et stable, quelle que soit la viscosité des phases mises en circuit. Il en résulte une pression élevée, d'où l'appellation originelle de cette technique d'analyse comme « Chromatographie Liquide Haute Pression ».

L'injecteur va avoir pour rôle de prélever et de mettre en tête de colonne l'échantillon à analyser selon un volume précis, imposé par l'utilisateur.

Enfin, le détecteur a pour but d'exciter les molécules éluées par la phase mobile de la phase stationnaire en sortie de colonne selon une longueur d'onde ou un ensemble d'absorbances définies. Dans le cas d'un détecteur spectrophotométrique, il est basé sur la loi de Beer-Lambert selon laquelle :

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} l C$$

où A_{λ} représente l'absorbance de la phase mobile en sortie de colonne à la longueur d'onde λ (nm), ε_{λ} le coefficient d'extinction molaire de la phase mobile ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), l le trajet optique effectué pour la mesure de la solution (cm) et C la concentration molaire ($mol \cdot L^{-1}$).

Le signal récolté est ensuite traité *via* une plateforme informatique équipée du logiciel adapté.

2.1.2. CLHP-PI : équipement

L'appareillage de la CLHP analytique est constitué d'un module de contrôle automatique des pompes Waters 600E, d'un injecteur automatique Waters Wisp 717 et d'un détecteur à barrette diode Waters 996.

Le logiciel Millennium a été utilisé pour l'acquisition et l'analyse des données et profils chromatographiques (Choisnard *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 1996b).

L'ensemble des profils chromatographiques a été obtenu avec une colonne Vydac de type C₄ (250 x 4.6 mm avec un diamètre interne de 3 mm).

Les phases mobiles utilisées étaient de l'eau ultrapure/ acide trifluoroacétique (TFA) (1000:1 ; v/v) pour l'éluant A et de l'acétonitrile/ eau ultrapure/ TFA (600:400:1 ; v/v/v) pour l'éluant B, dégazées par le biais d'un dégazeur en ligne avant leur introduction dans le circuit de l'appareillage.

2.1.3. Protocole d'analyse

Avant leur analyse, les échantillons ont été filtrés grâce à des filtres en polyfluorure de vinylidène (PVDF) (0.20 µm) afin d'éliminer toute particule éventuelle. L'absorbance des échantillons est scannée pour des longueurs d'onde allant de 200 à 390 nm avec une fréquence de relevé d'un spectre par seconde à une résolution de 1.2 nm.

Le volume d'injection a été de 10 µL pour les hydrolysats complets et de 100 µL pour les fractions récupérées après séparation par électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration.

Le débit a été fixé à 0.6 mL.min⁻¹. Le programme d'élution utilisé était de 100% (v/v) de A pendant 5 min, puis une augmentation de 0 à 67% (v/v) de B pendant 30 min et, pour finir, de 67 à 87% (v/v) de B durant les 35 minutes suivantes.

Le nettoyage de la colonne a consisté en un passage de 100% (v/v) de B durant 5 min et un rééquilibrage correspondant à un passage de 100% (v/v) de l'éluant A durant 20 min.

2.1.4. Comparaison spectrale et estimation de la pureté d'un pic

L'identification préliminaire des peptides à partir de l'hydrolysate pepsique de l'hémoglobine bovine a été effectuée par comparaison des spectres UV, comme cela a pu être précédemment décrit pour l'identification des hémorphines (Choisnard *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 1996c; Zhao *et al.*, 1995).

Le spectre du peptide standard a été enregistré dans la librairie numérique du logiciel Millennium. Deux analyses mathématiques sont ensuite effectuées. D'une part, la pureté du pic est estimée et d'autre part, une comparaison des spectres UV entre le peptide standard et le peptide présent au sein du pic est réalisée.

i) Concernant la comparaison spectrale, deux paramètres sont exprimés.

Le premier était le *Match Angle* (MA), ou « angle de rencontre ». Il représentait la mesure de la différence des allures spectrales entre le peptide standard et le peptide à identifier. Le MA s'échelonne de 0 à 90 degrés. Plus cette valeur était faible, plus les spectres étaient assimilés comme similaires. Au contraire, des valeurs s'approchant de 90 degrés indiquaient de grandes différences entre les peptides d'un point de vue spectral. La seconde mesure s'effectuait au niveau du paramètre *Match Threshold* (MT), ou « seuil de rencontre ». Ce dernier indiquait la sensibilité de la méthode de mesure, en la quantifiant par un angle pouvant aller de 0 à 180 degrés. Plus la valeur était élevée, plus la méthode s'avérait être sensible.

Ainsi, si le MA était supérieur au MT, cela pouvait indiquer que les deux spectres étaient différents. En revanche, si le MA était inférieur au MT, il y avait de fortes chances que les deux spectres comparés étaient similaires, voire les mêmes (Zhao *et al.*, 1995). Par conséquent, des spectres identiques peuvent permettre d'identifier des peptides attendus.

ii) En plus de la comparaison spectrale, une seconde mesure est réalisée afin d'estimer la pureté d'un pic à partir du profil chromatographique. Pour cela, deux paramètres sont également exprimés.

Le *Purity Angle* (PA), ou « angle de pureté », représentait l'homogénéité spectrale relative au sein d'un pic. Il pouvait avoir des valeurs s'étendant de 0 à 90 degrés, où 0 degré indiquait une parfaite homogénéité spectrale. Le *Purity Threshold* (PT), ou « seuil de pureté », prenait en compte le bruit de fond, les concentrations élevées éventuelles des échantillons, l'erreur photométrique et/ ou de solvant... Ces différents critères pouvaient causer des valeurs de PA supérieures à ce qu'elles étaient réellement.

Au final, si le PA était inférieur au PT, les spectres mesurés pouvaient être considérés comme homogènes en tenant compte des interférences inhérentes à la méthode. En aucun cas,

les paramètres PA et PT ne permettaient de statuer sur la pureté chimique du pic, mais en offraient déjà une bonne estimation.

Pour chaque mesure, les plus faibles valeurs de chacun des paramètres ont été recherchées, respectant comme suit : MA < MT ; PA < PT. De cette manière, le dosage d'un peptide d'intérêt s'effectuait de la façon la plus reproductible possible entre différents échantillons, tout en évitant l'inclusion d'autres composés ou peptides dans les mesures (Dubois *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 1996c).

2.1.5. Quantification de l' α 137-141

Dans le cas d'un détecteur spectrophotométrique tel qu'ici employé, la simple lecture de l'absorbance ne permettait pas d'évaluer les concentrations de peptides obtenus à un temps de rétention donné. Régie par la loi de Beer-Lambert, l'intensité de l'absorption dépend en effet des coefficients d'extinction molaire ϵ_λ des composés présents dans la phase mobile qui, de principe, n'absorbe que très peu dans l'UV et le visible. Il est donc nécessaire d'établir une méthode de dosage adaptée au peptide d'intérêt étudié.

Une gamme étalon a été réalisée par injection d' α 137-141 à des concentrations allant de 0 à 1 mg.mL⁻¹ (**Figure 34**). Les aires sous les pics ont été prises à partir des profils chromatographiques à 215 nm et respectant les paramètres décrits précédemment (cf. §2.1.4.). De la sorte, une relation linéaire ($r^2 = 0.999$) a été établie entre la concentration d' α 137-141 et l'aire du pic du peptide d'intérêt au sein des hydrolysats.

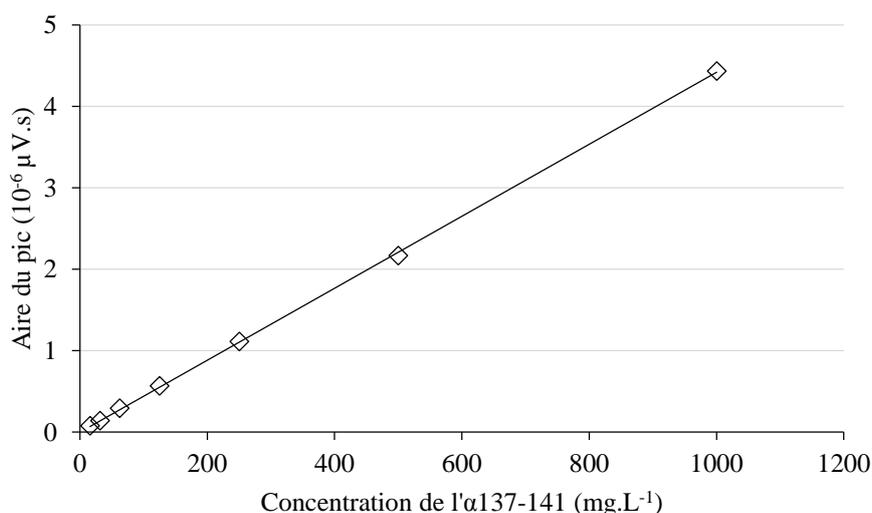


Figure 34 : Gamme étalon de l' α 137-141 par dosage en CLHP-PI

L'équation qui en résultait est la suivante :

$$C_{\alpha 137-141} = 4419.6 \times A_{\alpha 137-141}$$

où $C_{\alpha 137-141}$ est la concentration d' $\alpha 137-141$ présente dans l'échantillon (exprimée en mg.L^{-1}) et $A_{\alpha 137-141}$ étant l'aire du pic ($\mu\text{V.s}$).

De plus, l'injection du standard a permis d'estimer l'élution de l' $\alpha 137-141$ à un temps de rétention d'environ 4 min dans les conditions d'élution décrites (cf. §2.1.3.).

2.2. Analyse des peptides par spectrométrie de masse

2.2.1. Généralités de l'analyse par spectrométrie de masse

Pour un échantillon donné, la spectrométrie de masse a pour but de déterminer les masses des espèces atomiques ou moléculaires présentes dans l'échantillon étudié. Par suite, il est également possible de déterminer quelles sont leurs compositions en acides aminés, dans le cas d'un peptide par exemple.

Le principe d'un spectromètre de masse est résumé en **Figure 35**.



Figure 35 : Schéma de fonctionnement général d'un spectromètre de masse

Pour ces analyses, une très faible quantité de l'échantillon est généralement nécessaire, de l'ordre de quelques μL . La première étape consiste à le transformer en ions, c'est-à-dire à faire passer les molécules de l'échantillon de leur état naturel à la forme d'ions gazeux. Il s'agit de l'étape d'ionisation, réalisée dans la source de l'appareil.

Afin d'accroître leur énergie cinétique, ces ions sont ensuite immédiatement accélérés, par le biais d'un champ électrique et/ ou magnétique dans une enceinte sous vide.

Les forces induites permettent alors de séparer les ions selon leur rapport masse/charge (m/z) au sein de l'analyseur.

Une fois filtrés selon leur m/z et grâce à leur énergie cinétique acquise, les ions vont venir frapper le capteur d'un détecteur, dont le signal résultant est proportionnel aux charges des ions reçus.

Enfin, ces signaux sont transmis à l'ordinateur muni du logiciel adapté afin de traiter le signal et de le transcrire en spectre de masse.

2.2.2. Identification des peptides par MALDI-TOF

L'acquisition et l'analyse des résultats par MALDI-TOF ont été réalisées avec la précieuse aide du Dr Gabrielle Châtaigné, Ingénieure de recherche au laboratoire ProBioGEM.

Le MALDI-TOF (ou *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight*) est une technique offrant les avantages d'être rapide et de tolérer la présence de nombreux sels ou tampons. Elle possède aussi l'atout de provoquer très peu de fragmentations. En revanche, elle se trouve peu sensible pour la recherche de molécules possédant un m/z inférieur à 500. Ceci est principalement dû aux ions produits par la décomposition de la matrice.

Le MALDI-TOF a ici été utilisé pour identifier des masses peptidiques à partir de la récolte d'un pic donné en CLHP. Il avait donc pour objectif principal de confirmer la présence d'un peptide suspecté et de vérifier si ce dernier était pur ou non.

2.2.2.1. Principe du MALDI-TOF

Afin de permettre une ionisation optimale des échantillons à analyser, ces derniers sont mélangés à une matrice adaptée. Elle est ajoutée de manière très majoritaire, évitant ainsi que les composés recherchés ne se complexent ou s'agrègent entre eux. Ceci favorise également leur isolement et donc leur analyse (Karas *et al.*, 1990). L'échantillon est ensuite déposé sur une cible, support métallique chimiquement neutre par rapport à l'échantillon (Kusmann *et al.*, 1997).

L'intérêt de cette matrice est d'absorber l'énergie transmise par le laser, provoquant alors son expansion sous forme gazeuse. De ce fait, les composés présents dans l'échantillon se trouvent entraînés (ou désorbés) et ionisés sous la forme $[M+nH]^{n+}$, où n est généralement égal à 1 (Karas *et al.*, 1988), tel que cela est représenté en **Figure 36**. Cette étape se déroule dans la source du spectromètre de masse, appelée « MALDI ».

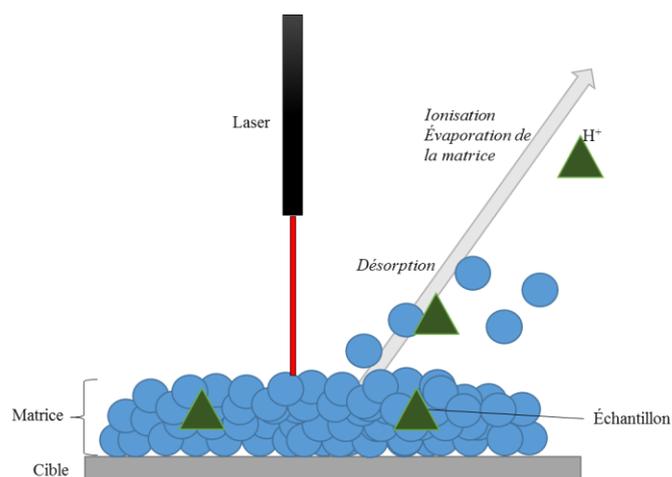


Figure 36 : Principe de l'ionisation des composés à analyser en MALDI

Les ions ainsi formés sont accélérés suite à l'application d'un champ électrique et vont traverser un analyseur en temps de vol (d'où le terme « *Time Of Flight* » ou « TOF »), séparant les ions en fonction de leur énergie cinétique.

Ils aboutissent finalement dans un détecteur en mode réflecteur, permettant une résolution accrue en comparaison d'un mode linéaire. Le temps de vol est alors converti en m/z .

2.2.2.2. Équipement, logiciel utilisé et protocole

L'appareillage était un spectromètre de masse UltraFlex II MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Allemagne), équipé d'un laser Smartbeam™.

Les données sont acquises en mode réflectron positif, pour une gamme de masses allant de 500 à 6000 Da (m/z). Pour chaque spot, un total de 1000 spectres est compilé avec une fréquence laser de 100 Hz.

Le logiciel FlexImaging™ (Bruker Daltonics, Bremen, Allemagne) a été utilisé pour enregistrer les données. Pour la calibration spectrale de l'appareil, une solution constituée d'un mélange de peptides possédant des masses m/z entre 500 et 3500 Da a été utilisée.

L'emploi de deux matrices a été nécessaire. La première était une solution de cyano-4-hydroxycinamique acide (HCCA) (10 mg.mL^{-1}) dissoute dans un mélange d'eau ultrapure (30%, v/v) et d'acétonitrile (70%, v/v) avec 0.1% (v/v) de TFA. La seconde correspondait à de l'acide sinapinique (10 mg.mL^{-1}) préparé dans une solution d'eau ultrapure (25%, v/v) et d'acétonitrile (75%, v/v) avec 0.1% (v/v) de TFA.

Le dépôt des échantillons sur la cible a été effectué selon la méthode de la couche mince (Kusmann *et al.*, 1997; Vorm *et al.*, 1994; Xiang *et al.*, 1994). 1 μL de la matrice était ajouté à 1 μL de chaque échantillon, puis les deux étaient déposés sur la cible, avant d'être séchés. Sur chaque cible, 1000 tirs laser sont compilés afin de fournir le spectre final. Le logiciel a permis de détecter une masse correspondante à chacun des pics en mode positif. La précision des masses données était de 0.01%.

Pour l'analyse des données, le logiciel FlexAnalysis™ (Bruker Daltonics, Bremen, Allemagne) a été utilisé.

2.2.3. Identification des peptides par LC-MS/MS

L'acquisition des spectres de masse en LC-MS/MS a été réalisée au sein du Centre Universitaire de Mesures et d'Analyse (C.U.M.A.) de la faculté de pharmacie de Lille II, avec les précieuses collaborations des Pr Jean-François Goossens et Dr Mostafa Kouach.

Le couplage entre la CLHP et la spectrométrie de masse offrait l'avantage de permettre la complémentarité du spectre UV établi en CLHP avec les masses des composés correspondant pour chaque point du chromatogramme.

2.2.3.1. Principe de la LC-MS/MS

Contrairement à la technique du MALDI-TOF, l'échantillon est injecté de manière automatique grâce au couplage entre la CLHP et le spectromètre de masse. La technique ici employée est l'*electro-spray-ion* (ou ESI) dont le principe général est résumé en **Figure 37**.

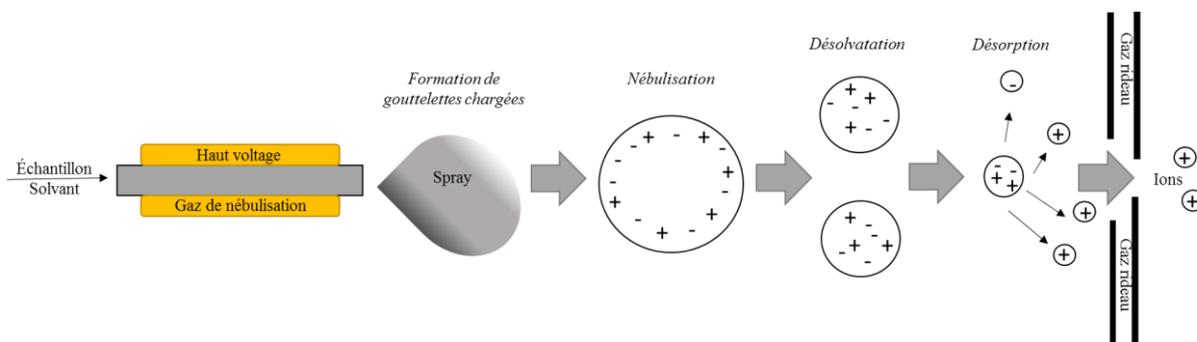


Figure 37 : Schéma du fonctionnement général d'une source ElectroSpray/ IonSpray

La source va permettre d'ioniser les molécules contenues au sein de l'échantillon à analyser. Le spray est obtenu en appliquant un champ électrique de haut voltage (1 à 6 KV généralement) à pression atmosphérique sur la phase mobile, composée de l'échantillon et du solvant pour un temps donné de l'analyse et s'écoulant au sein d'un capillaire. Cette dernière accumule alors les charges à sa surface formant un ensemble de fines gouttes qui, à l'aide d'un gaz de nébulisation, permettent la formation d'un spray. Ensuite, les fines gouttes deviennent par fission de plus en plus petites grâce à un flux d'azote chauffé. Ceci entraîne la désolvation des gouttelettes formant alors des ions désolvatés.

L'analyseur qui fait suite à la source est de type triple quadripôle, donnant la dénomination de « spectromètre de masse en tandem ». Il permet, par le biais de deux des quadripôles, de déterminer les différents m/z présents dans l'échantillon et, par le biais d'un troisième, de déterminer la composition du peptide analysé en le fragmentant. En effet, un peptide donné aura un m/z précis dans le premier quadripôle, déterminant de l'ion parent. Dans le second, ou « cellule de collision », l'ion parent sera fragmenté en des ions de plus petites tailles le constituant. Ces ions fragments seront alors analysés dans le troisième quadripôle et leurs différents m/z seront déterminés.

2.2.3.2. Équipement, logiciels utilisés et protocole

Les analyses en LC-MS/MS ont été effectuées sur un UFLC-XR (Shimadzu) couplé à un QTRAP[®] 5500 MS/MS triple quadripôle associé à un spectromètre linéaire *ion trap mass* (AB Sciex, Foster City, CA, USA) équipé d'une source Turbo VTM ion.

Les analyses ont été réalisées en mode d'ionisation positive en utilisant un *IonSpray* de 5500 V. Le gaz de nébulisation a été l'air et le gaz rideau de l'azote à un débit de 30 psi. La source Turbo VTM a été utilisée à 550°C avec l'air comme gaz auxiliaire à 50 psi.

Le logiciel Analyst 1.5.2 a été utilisé pour le contrôle des appareils et l'acquisition des données.

L'ensemble des analyses en LC-MS/MS a été réalisé avec la même colonne Vydac de type C₄ utilisée pour les analyses en CLHP standard, décrites précédemment (cf. §2.1.3.).

Le TFA interagissant fortement avec l'ionisation proposée en ESI-MS/MS, les solvants ont été modifiés au niveau de leur composition pour permettre la bonne identification des peptides présents au sein des échantillons. Ainsi, les phases mobiles étaient de l'eau ultrapure/

AF (1000:1 ; v/v) pour l'éluant A et de l'acétonitrile/ eau ultrapure/ AF (600:400:1 ; v/v/v) pour l'éluant B.

Avant leur analyse, les échantillons ont été filtrés grâce à des filtres en PVDF (0.20 μm). Les volumes d'injection ont été de 5 μL pour les hydrolysats complets et de 50 μL pour les fractions récupérées après fractionnement par EDUF.

Le débit utilisé a été de 0.6 mL.min⁻¹. Le programme d'élution était de 100% (v/v) de A pendant 5 min afin d'éliminer les sels de l'analyse, puis une augmentation de 0 à 67% (v/v) de B pendant 25 min.

Pour l'analyse des résultats, les logiciels BioAnalyst™ 1.5.1 (ABSciex, Darmstadt, Allemagne) et Peaks® 7 (Waterloo, Canada) ont été utilisés.

Chapitre 3

*Production du peptide actif
 $\alpha_{137-141}$ au cours de l'hydrolyse
pepsique de l'hémoglobine
et du cruor bovins*

Chapitre 3 :

Production du peptide actif α 137-141 au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine et du cruor bovins

La première partie du projet s'est portée sur la production enzymatique d'un peptide actif d'intérêt, l' α 137-141. La démarche expérimentale proposée s'est articulée autour de la conception d'un procédé d'obtention simple, peu énergivore et permettant l'obtention de peptides actifs en quantité suffisante afin d'envisager, par suite, une exploitation à plus large échelle.

L'axe premier a consisté ici à étudier la production peptidique au sein du modèle protéique qu'est l'hémoglobine bovine purifiée. D'une manière successive et comparative, l'étude s'est portée sur le co-produit des abattoirs, le cruor bovin. Les mécanismes enzymatiques impliqués ont également été décrits et l'ensemble des peptides présents au sein des hydrolysats ont été identifiés.

Afin de vérifier l'obtention de peptides actifs en quantité suffisante pour permettre leur potentielle valorisation à terme, l'influence de l'augmentation de la concentration initiale en substrat sur la production peptidique a ensuite été étudiée.

3.1. Matériels et méthodes spécifiques : étude de la production pepsique du peptide actif α 137-141

3.1.1. Dosage de l'hémoglobine bovine en solution et préparation de la solution-mère

15 g de l'hémoglobine bovine purifiée ou de cruor bovin sont ajoutés à 100 mL d'eau ultrapure. Ils sont ensuite centrifugés à 4000 min⁻¹ pendant 30 min. Le surnageant a alors servi de base à la préparation de l'hydrolysate et a été dosé.

Le dosage de l'hémoglobine bovine en solution s'est effectué selon la méthode de Drabkin (Crosby *et al.*, 1954).

50 μ L de l'échantillon sont ajoutés à 12.5 mL du réactif durant 10 min à température ambiante. L'absorbance est ensuite lue à une longueur d'onde de 546 nm par un

spectrophotomètre UV (Ultrospec 110 pro, Amersham Biosciences, France) et reportée dans l'équation suivante, sachant qu'une solution standard d'hémoglobine à 14.7% (p/v) donnait une absorbance de 0.4 à 546 nm :

$$C = 14.7 \times \frac{Abs}{0.4}$$

où C représente la concentration en hémoglobine bovine dans la solution-mère (g.100 mL⁻¹) et Abs l'absorbance à 546 nm de l'échantillon dosé.

À partir de la concentration C de la solution-mère, des solutions d'hémoglobine bovine purifiée ou de cruor bovin sont préparées par dilution à des concentrations précises en hémoglobine C_{HB} : 1, 2, 5 et 8% (p/v).

Il est à noter que pour l'ensemble des expériences réalisées, l'hémoglobine bovine purifiée à une C_{HB} de 1% (p/v) a servi de base de travail et de référentiel comparatif.

3.1.2. Dosage de l'activité enzymatique de la pepsine en solution

Afin de garantir la bonne reproductibilité des hydrolysats obtenus, l'activité enzymatique de la pepsine est dosée régulièrement, selon un protocole établi par le fournisseur Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Pour cela, 56 mg de pepsine porcine (EC 3.4.23.1, 3200 - 4500 UI.mg⁻¹ de protéine) sont solubilisés dans 20 mL de tampon acide acétique/ acétate de sodium (0.1 M, pH 3.5). Cette solution mère est ensuite diluée au 200^{ème} par ajout d'eau ultrapure.

Une solution d'hémoglobine à 2% (p/v) est préparée de manière concomitante, à partir d'une solution mère d'hémoglobine de concentration C . De cette dernière, est prélevé un volume V correspondant à une masse de 5 g d'hémoglobine. À ce volume V est ajoutée une solution de 80 g d'urée dans un volume égal à $(80 - V)$ mL d'eau ultrapure. La solution totale est ensuite incubée à 37°C durant une heure, puis, 50 mL de tampon HCl/ KCl (0.25 M, pH 2) y sont ajoutés. Le pH est rectifié à 2 à l'aide d'HCl concentré. Le volume final a ensuite été ajusté à 250 mL avec de l'eau ultrapure.

La réaction d'hydrolyse s'est effectuée à 37°C durant 10 min, avec un rapport entre la solution de pepsine et d'hémoglobine à 2% (p/v) équivalant à 1/5 (v/v). Elle est arrêtée par addition de 10 mL d'acide trichloroacétique (TCA) à 5% (p/v).

Après refroidissement, les solutions sont centrifugées à 4000 min⁻¹ durant 15 min, puis filtrées sur acétate de cellulose (0.45 µm) et diluées au millième. L'absorbance du surnageant

est ensuite lue à 280 nm. Le témoin de ce dosage d'activité enzymatique est réalisé en ajoutant, de manière successive, 10 mL de TCA à 5% (p/v), 1 mL de la solution de pepsine et 5 mL de la solution d'hémoglobine à 2% (p/v) préparée.

L'absorbance lue est ensuite reportée dans l'équation suivante :

$$\text{Activité enzymatique} = 2.10^4 \times \Delta Abs \times \frac{\text{Volume de la solution}}{\text{Masse de pepsine pesée}}$$

où ΔAbs correspond à la différence entre l'absorbance à 280 nm de l'échantillon hydrolysé et l'absorbance de l'échantillon non-hydrolysé et où l'activité enzymatique est exprimée en UA.mg⁻¹ de pepsine, le volume de la solution en mL et la masse de pepsine en mg.

3.1.3. Préparation des hydrolysats peptidiques

La solution-mère comportait l'hémoglobine sous sa forme native. Pour la dénaturer tout en évitant l'addition de dénaturant chimique, l'hydrolyse est réalisée à pH 3.5 dans un tampon d'acétate de sodium et d'acide acétique (0.5 M) (Dubois *et al.*, 2005).

L'hémoglobine bovine est digérée par la pepsine porcine, préparée dans un tampon d'acétate de sodium et d'acide acétique à pH 3.5 (0.1 M), avec un ratio enzyme/substrat de 1/11 (mole/mole) à une température de 23°C.

Les échantillons ont été prélevés pour des temps d'hydrolyse de 0, 1, 2.5, 5, 10, 15, 30 min, et de 1, 2, 3, 10 et 24 h, correspondant à une large gamme de degrés d'hydrolyse.

La réaction est stoppée par addition de NaOH (5 M) afin de porter l'échantillon à un pH compris entre 9 et 10, permettant à la fois d'inactiver de manière irréversible l'enzyme, mais également d'éviter toute éventuelle hydrolyse basique. Les échantillons sont ensuite conservés à -20°C.

3.1.4. Détermination du degré d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine

Le degré d'hydrolyse (DH) se définit comme étant le ratio entre le nombre de liaisons peptidiques clivées par une enzyme et le nombre de liaisons totales du substrat (protéine), soit l'équation :

$$DH = 100 \times \frac{h}{h_0}$$

où DH est le degré d'hydrolyse (%), h est le nombre de liaisons peptidiques hydrolysées sur le substrat et h_0 est le nombre de liaisons peptidiques totales du substrat protéique.

Le DH peut être quantifié par la technique de l'*ortho*-phthaldialdéhyde (OPA), adaptée de Church *et al.* (1983) et Spellman *et al.* (2003). Afin de déterminer le nombre de liaisons hydrolysées h , l'équation suivante est proposée :

$$h = \frac{\Delta Abs. M. FD}{\varepsilon. C_{HB}}$$

où ΔAbs correspond à la différence entre l'absorbance à 340 nm de l'échantillon hydrolysé et l'absorbance de l'échantillon non-hydrolysé, M est la masse molaire de la protéine (pour l'hémoglobine bovine : 64500 g.mol⁻¹), FD est le facteur de dilution de l'échantillon, ε le coefficient d'extinction molaire du réactif OPA à 340 nm (6000 mol⁻¹.cm⁻¹ selon Church *et al.* (1985) et C_{HB} la concentration en hémoglobine bovine.

Le réactif est préparé au moins une heure avant son emploi et est stocké à l'abri de la lumière. Pour un volume final ajusté à 50 mL, sa composition a été de 25 mL de solution de tétraborate de sodium (0.1 M), 5 mL de SDS à 10% (p/v), 10 µL de β -mercaptoéthanol et de 80 mg d'OPA dissouts dans 1 mL de méthanol. La linéarité du réactif est vérifiée par dosage de la L-leucine.

50 µL d'échantillon à doser sont ajoutés à 1 mL de réactif. L'absorbance est lue à 340 nm après une incubation de 2 min à température ambiante.

3.1.5. Détail des calculs de production du peptide actif $\alpha 137-141$

Le rendement de production de l' $\alpha 137-141$ ($R_{\alpha 137-141}$) se calcule comme suit :

$$R_{\alpha 137-141} = \frac{C_{\alpha 137-141}}{C_{\alpha 137-141}max} \times 100$$

où $C_{\alpha 137-141}$ est la concentration en $\alpha 137-141$ mesurée en CLHP-PI pour un DH et une C_{HB} donnés et $C_{\alpha 137-141}max$ étant la concentration en $\alpha 137-141$ théorique maximale pouvant être obtenue pour une C_{HB} donnée.

3.2. Mécanisme réactionnel de l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine bovine par la pepsine porcine

3.2.1. Relation entre temps et degré d'hydrolyse

Dans les conditions d'hydrolyse appliquées (23°C, pH 3.5) et à une C_{HB} de 1% (p/v), le degré d'hydrolyse ne suivait pas une relation linéaire avec le temps, ce qui est illustré par la **Figure 38**.

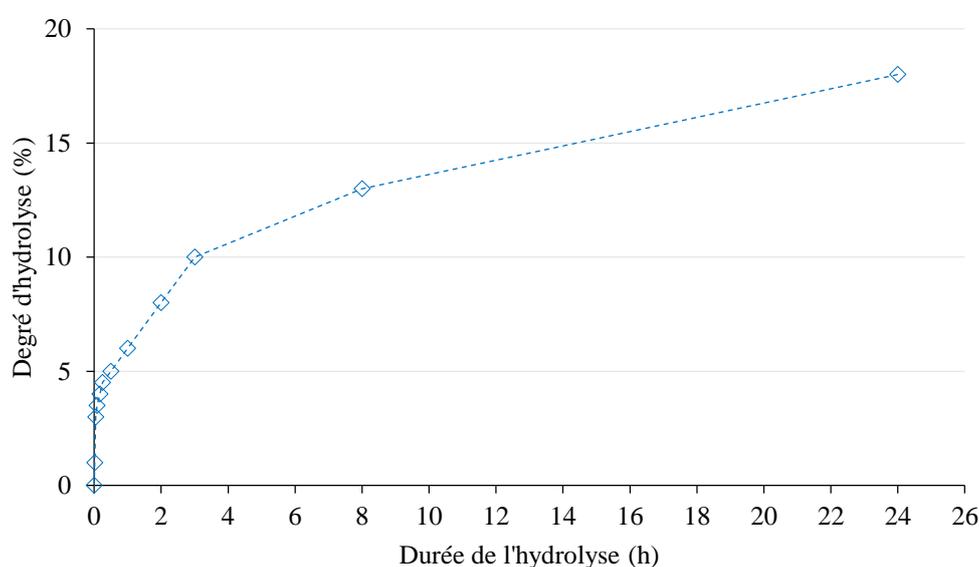


Figure 38 : Évolution du degré d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine purifiée au cours de son hydrolyse par la pepsine porcine (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11, C_{HB} = 1%, p/v)

Comme observé, le degré d'hydrolyse était de 1, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 8, 10, 13 et 18% si le temps d'hydrolyse était de 1, 2.5, 5, 10, 15, 30 min, 1, 2, 3, 10 et 24 h, respectivement.

3.2.2. Mécanisme enzymatique mis en jeu

Dans les conditions d'hydrolyse ici réalisées (23°C, pH 3.5) et à une C_{HB} égale à 1% (p/v), l'hémoglobine purifiée était sous forme dénaturée (Dubois *et al.*, 2005). L'accessibilité des chaînes polypeptidiques constituant les sous-unités de la protéine native se trouvait donc accrue pour l'enzyme. Ceci privilégiait un mécanisme de type « zipper », décrit pour la

première fois par Linderstrom-Lang (1952), au détriment d'un mécanisme de type « *one by one* », observé pour des pH plus élevés et en absence de dénaturants chimiques tels que l'urée (Dubois *et al.*, 2005). Ce dernier permettait l'obtention de l'ensemble des peptides dans des conditions données à partir du substrat. Une mole d'enzyme y dégradait alors une mole de substrat à la fois (Linderstrom-Lang, 1952). De ce fait, tout au long de la protéolyse, les concentrations en peptides augmentaient d'une manière proportionnelle et limitante par rapport au temps. En revanche, les peptides étaient tous présents de manière qualitativement identique quelle que soit la durée de l'hydrolyse.

L'intérêt principal de se placer dans des conditions permettant un mécanisme *zipper* résidait dans le fait de pouvoir influencer la population peptidique totale, tant d'un point de vue qualitatif (nombre et variété de peptides présents dans l'hydrolysate) que d'un point de vue quantitatif (concentrations relatives des peptides entre eux). Ainsi, la maîtrise préliminaire de l'obtention de plusieurs DH était particulièrement intéressante dans le cadre d'un projet de séparation d'un peptide donné. En effet, à chaque DH correspondait une population de peptides spécifique dont les concentrations entre eux étaient relatives et variables. Par exemple, il pouvait donc être déterminé des environnements peptidiques où la séparation d'un peptide donné serait préférentielle.

De manière synthétique, le mécanisme *zipper* permettait donc d'hydrolyser les sous-unités de l'hémoglobine bovine rapidement en des peptides de plus faibles masses moléculaires. Ces derniers sont appelés « peptides intermédiaires ». À leur tour, ils étaient eux-mêmes digérés en des peptides plus courts, jusqu'à donner des peptides dits « finaux » qui s'accumulaient tout au long de la réaction d'hydrolyse. Pour l'hémoglobine bovine purifiée à une C_{HB} de 1% (p/v), ceci est présenté en **Figure 39**.

Également, il a été précédemment décrit que les faibles DH permettaient la plus importante accumulation de peptides à activité antimicrobienne (Dubois *et al.*, 2005 ; Nedjar-Arroume *et al.*, 2006 ; Catiau *et al.*, 2011b). Il s'agissait notamment de peptides intermédiaires de séquence supérieure à vingt acides aminés (Nicolas *et al.*, 1995), organisée en structures secondaires (Powers *et al.*, 2003).

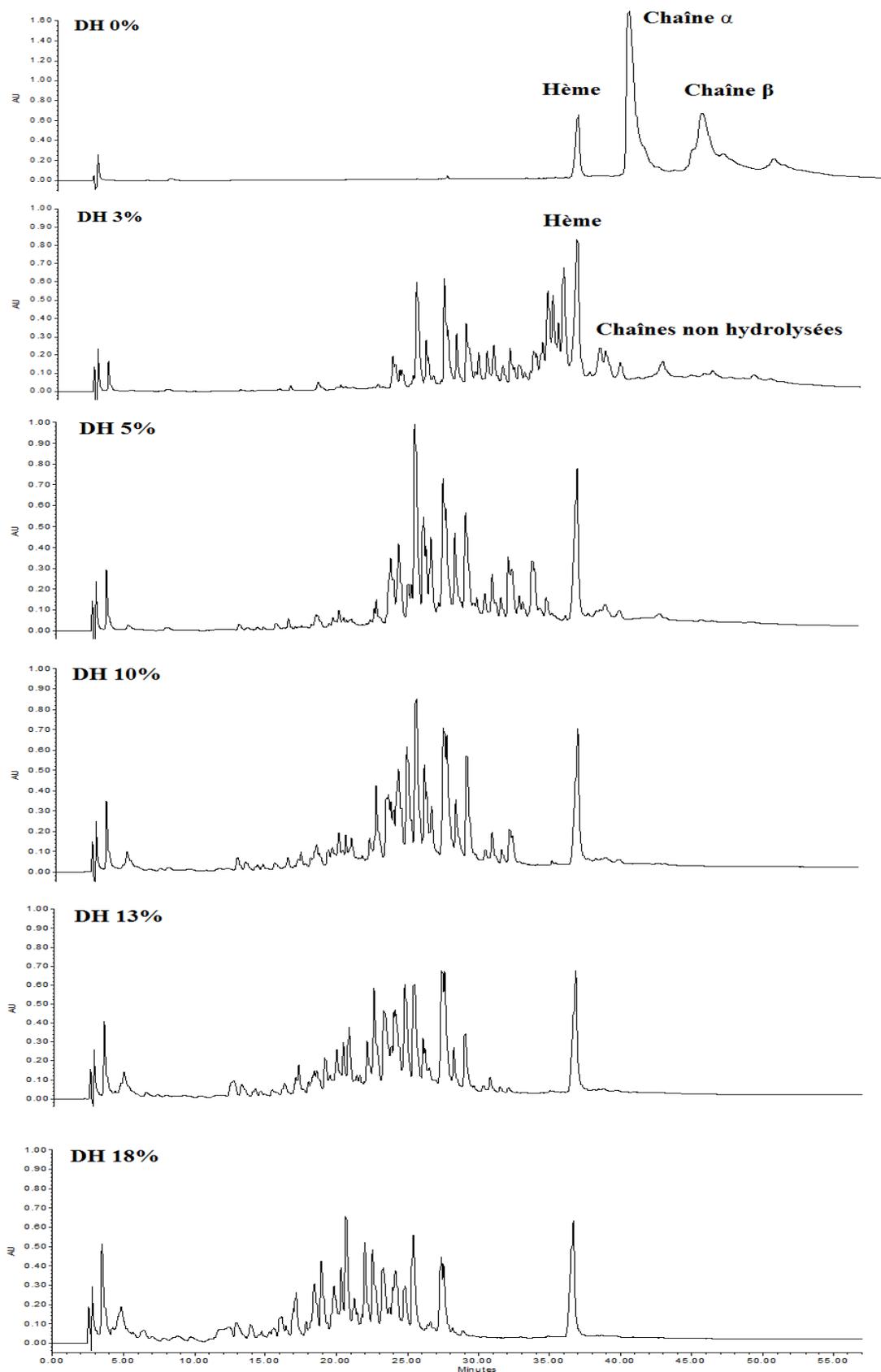


Figure 39 : Profils chromatographiques d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine purifiée à 215 nm par CLHP-PI, analysés par colonne de type C₄ (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11, C_{HB} = 1%, p/v)

3.3. Obtention du peptide actif α 137-141 au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine et du cruor bovins

3.3.1. Obtention enzymatique du peptide actif α 137-141

La **Figure 41** présente les chromatogrammes obtenus pour des temps d'hydrolyse identiques d'une part avec l'hémoglobine bovine purifiée modèle, d'autre part avec le cruor bovin, tous deux pour une C_{HB} de 1% (p/v). Il peut être remarqué de prime abord que les chromatogrammes sont similaires à un DH donné. Ce premier élément a permis de confirmer que les cinétiques d'obtention des peptides à partir de l'hémoglobine purifiée modèle et du cruor bovins étaient soumises aux mêmes mécanismes réactionnels. L'accessibilité de l'enzyme pour son substrat restait donc sensiblement la même au sein de l'hémoglobine bovine purifiée et du cruor. Ceci peut être expliqué par la minorité des autres composés présents au sein de ce dernier, constitué à plus de 95% d'hémoglobine bovine.

La première fraction comportait le peptide α 137-141. Ce dernier était présent au sein de tous les DH étudiés. Deux autres fractions ont ici été identifiées et représentaient les peptides α 133-141 et α 107-141, connus pour être les précurseurs principaux de l' α 137-141 (Catiau *et al.*, 2011b). L'hydrolyse pepsique des précurseurs aboutissant à la production de l' α 137-141 peut être schématisée comme exposé en **Figure 40**.

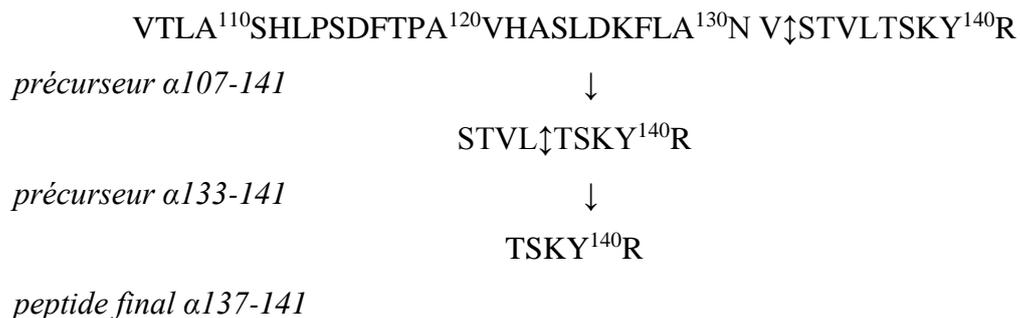
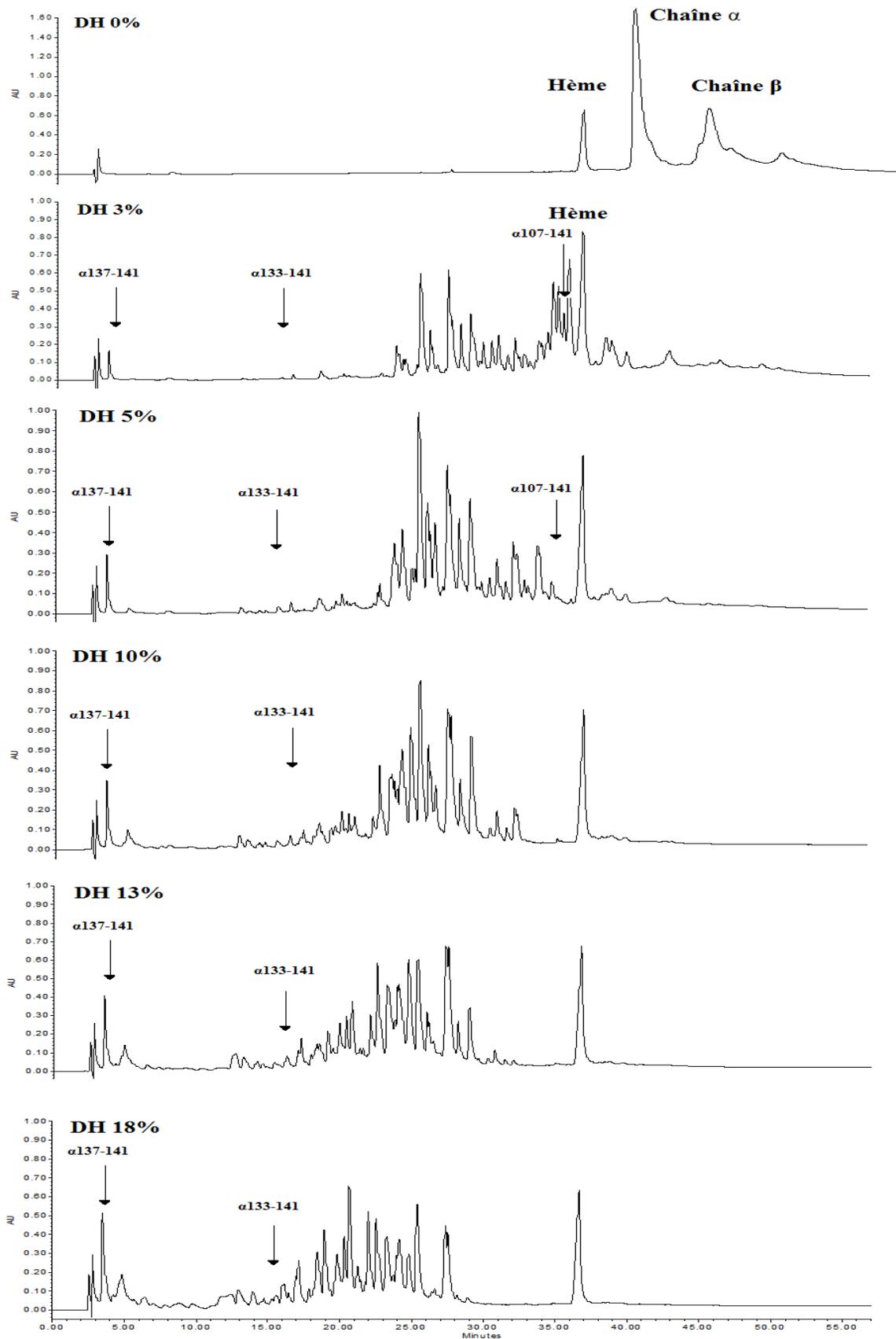
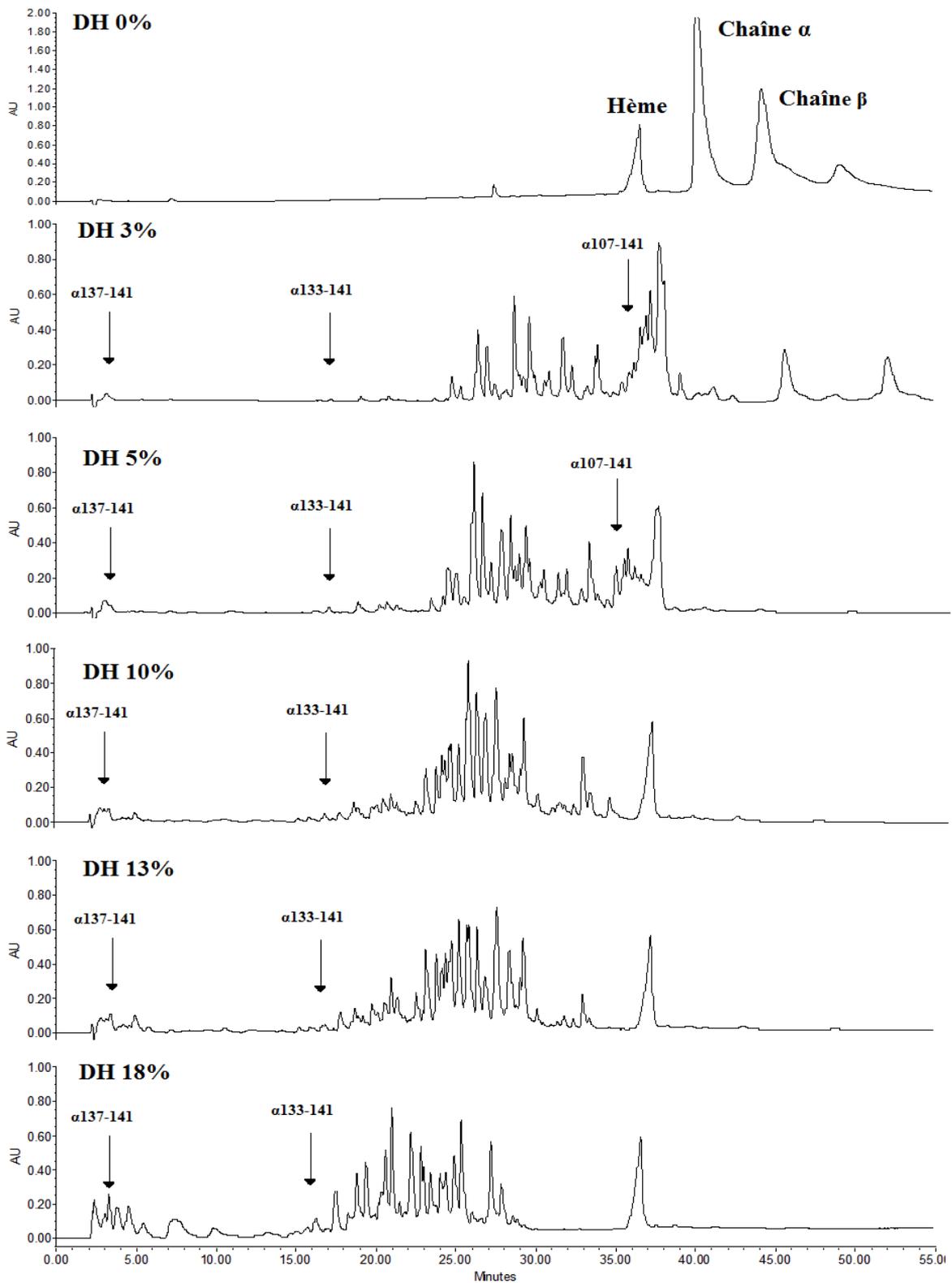


Figure 40 : Représentation schématique de l'hydrolyse pepsique du peptide α 107-141 (Catiau *et al.*, 2011b)



(a : hémoglobine bovine purifiée)



(b : cruor bovin)

Figure 41 : Profils chromatographiques d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine purifiée comparée au cruor bovin à 215 nm par CLHP-PI, analysés par colonne de type C₄ (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11, C_{HB} = 1%, p/v)
 (a) hémoglobine bovine purifiée ; (b) cruor bovin

Au sein du cruor bovin, les précurseurs de l' α 137-141 ont montré la même cinétique d'apparition qu'au sein de l'hémoglobine purifiée. Étant un peptide dit intermédiaire, l' α 107-141 est rapidement hydrolysé et n'était plus présent à partir d'un DH de 10%. De plus, l' α 107-141 a donné un autre peptide : l' α 133-141. Ce dernier apparaissait précocement durant l'hydrolyse, dès le relevé à un DH de 1%. Sa concentration augmentait alors jusqu'à un DH de 10%, puis diminuait ensuite, ce qui était en accord avec les travaux de Dubois *et al.* (2005) pour l'hémoglobine bovine modèle.

Le peptide α 137-141, quant à lui, apparaissait dès le début de l'hydrolyse et sa concentration augmentait tout au cours de la protéolyse. Il s'accumulait donc, signifiant ainsi qu'il s'agissait là d'un peptide dit « final », n'étant pas hydrolysé en d'autres peptides plus courts dans les conditions d'hydrolyse ici utilisées (23°C ; pH 3.5 ; C_{HB} de 1%, p/v). Au sein du cruor bovin, ceci a confirmé ce qui avait été décrit précédemment par Lignot *et al.* (1999) pour l'hémoglobine bovine purifiée.

3.3.2. Identification du peptide actif α 137-141

L'identification du peptide α 137-141 a été réalisée avec le logiciel Millennium dont l'utilisation est couplée à la CLHP avec détecteur à barrette diode. Différents paramètres sont alors considérés : le temps de rétention du peptide, son spectre en temps réel et l'estimation de la pureté du pic, tous trois décrits en détails précédemment (cf. §2.1). Cette méthode a déjà été employée pour l'identification et la quantification de quatre hémorphines, β 31-40, β 32-40, β 31-38 et β 32-38, (Zhao *et al.*, 1996c; Zhao *et al.*, 1995) et l' α 1-23 qui est également un peptide antimicrobien (Choisnard *et al.*, 2002).

Pour ce faire, le peptide α 137-141 synthétique a été au préalable enregistré au sein de la librairie spectrale du logiciel, servant ainsi de référence du point de vue de l'identification. Son temps de rétention a ainsi été pris en compte, se situant à environ 4 min. Au niveau analytique, les spectres des peptides contenus au sein de l'hydrolysats ont été comparés à celui du peptide synthétique. À l'aide des quatre paramètres décrits (MA, MT, PA et PT) et le temps de rétention (cf. §2.1.4.), le pic à 4 min au sein des hydrolysats est alors identifié comme étant le peptide α 137-141.

De plus, une analyse employant la dérivée seconde du spectre du peptide autorisait l'estimation de la présence ou de l'absence d'acide aminé aromatique au sein du pic (Zhao *et al.*, 1995). Dans le cas présent, la présence d'une tyrosine était évaluée, ce qui est en accord

avec la séquence du peptide α 137-141 (Catiau *et al.*, 2011b). Le maxima spécifique à 288.1 nm indique la présence de cet acide aminé. D'un point de vue comparatif, la **Figure 42** montre les spectres en dérivée seconde du peptide standard et de celui présent au sein du cruor, après purification par CLHP-PI. Leur excellente similitude permettait ainsi d'identifier le pic à un temps de rétention de 4 min au sein de l'hydrolysate comme étant l' α 137-141.

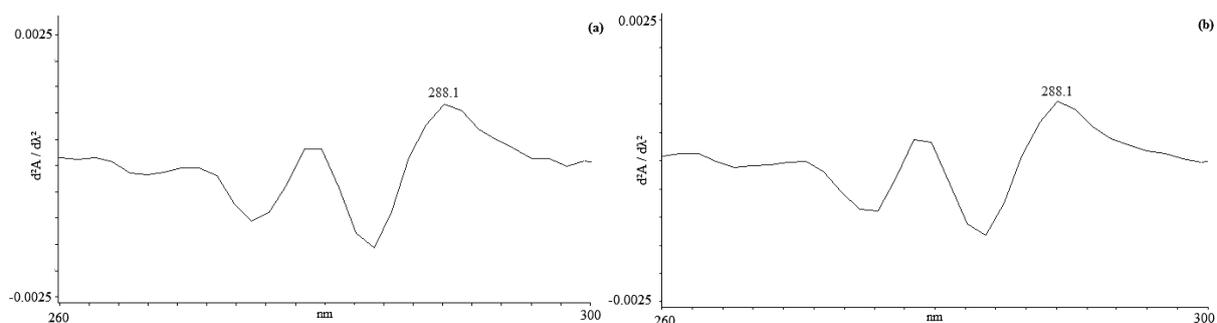


Figure 42 : Comparaison des spectres en dérivée seconde entre (a) le peptide α 137-141 standard et (b) le peptide α 137-141 issu de l'hydrolyse du cruor bovin purifié par CLHP-PI

3.3.3. Caractérisation du peptide actif α 137-141

Afin de confirmer la pureté du pic d' α 137-141 durant l'élution, le standard de l' α 137-141 et celui provenant du cruor ont été analysés par MALDI-TOF. Le spectre est présenté en **Figure 43**.

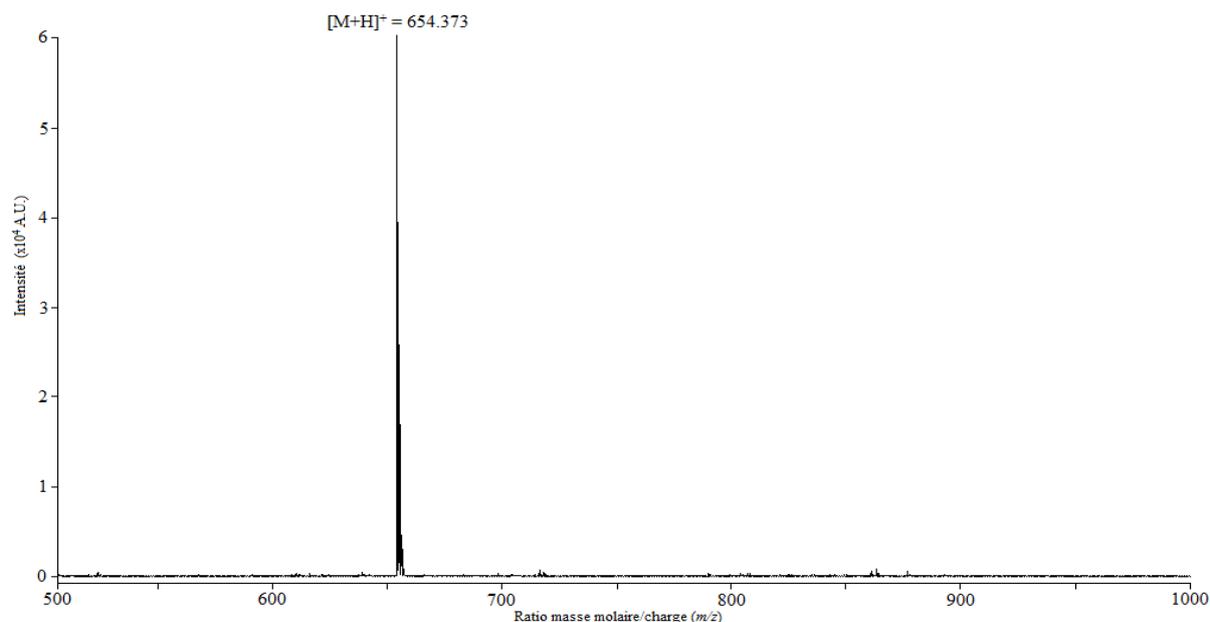


Figure 43 : Spectre MALDI-TOF de la fraction suspectée de contenir le peptide α 137-141 au sein de l'hydrolysate de cruor bovin, isolée par CLHP-PI avec une colonne de type C_4

En accord avec la masse isotopique de l' α 137-141 (653.35 Da estimés par Peptidemass – Expasy.org), il est alors démontré que l' α 137-141 purifié par CLHP à partir du cruor est pur. En effet, une seule masse moléculaire est obtenue, 654.37 m/z , correspondant à une valeur de $[M+H]^+$.

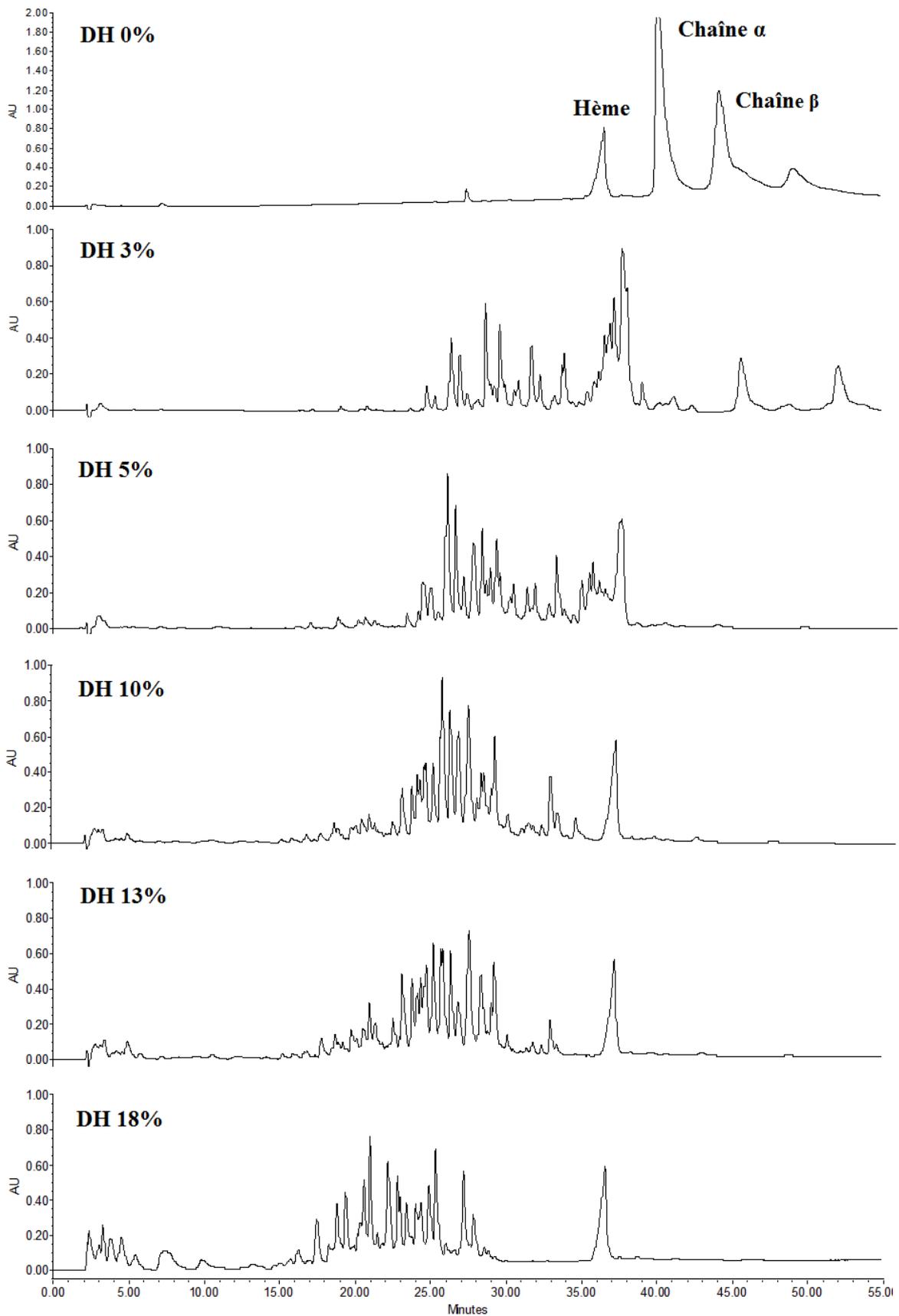
Ce résultat a donc confirmé la première approche, mathématique, effectuée par le logiciel Millennium.

3.3.4. Effet de l'augmentation de la concentration initiale en hémoglobine bovine sur l'obtention enzymatique du peptide actif α 137-141

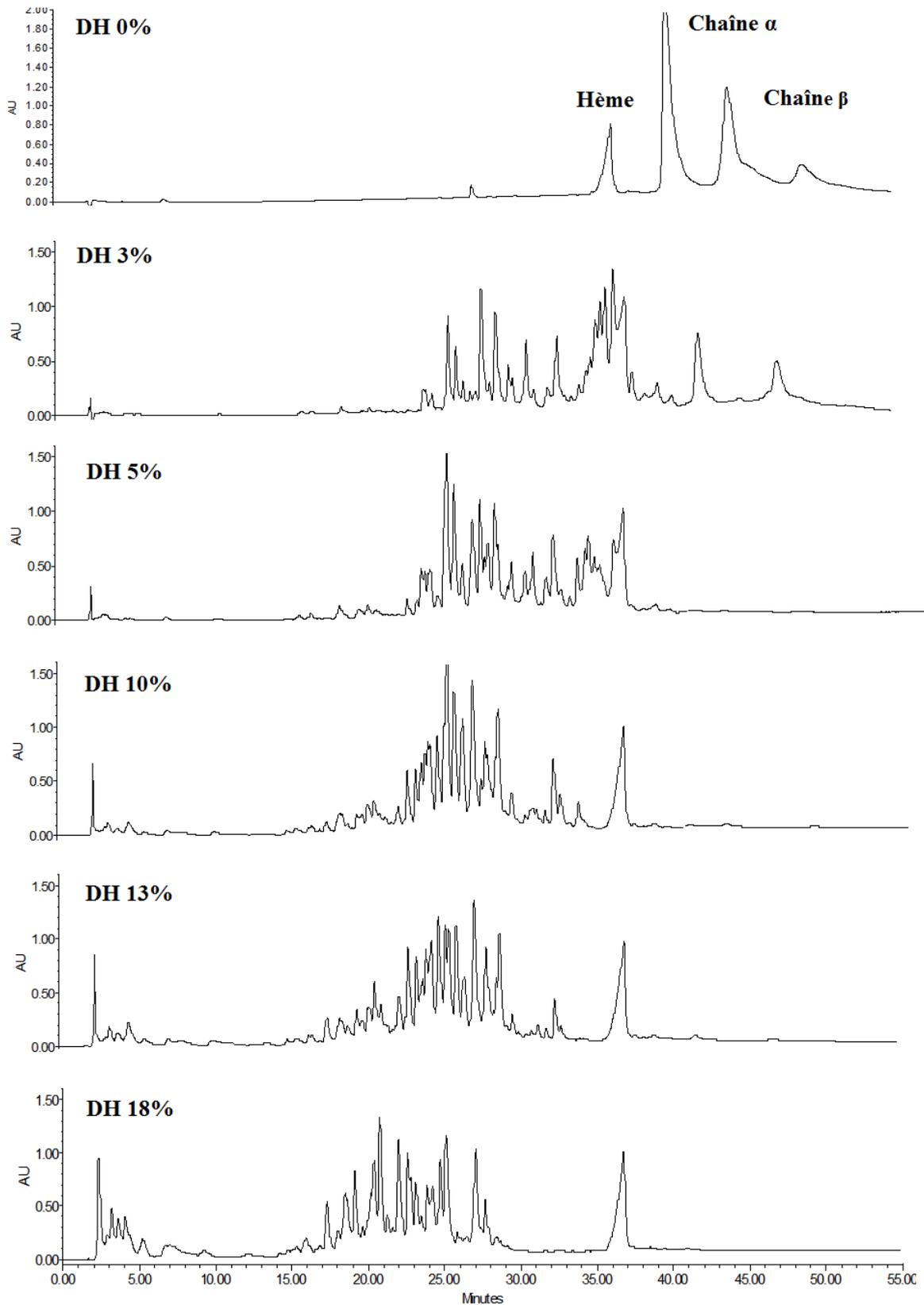
Le pic d' α 137-141 étant pur, le dosage de la production de ce peptide au cours de l'hydrolyse pouvait donc se réaliser par CLHP, tout en respectant les paramètres précédemment définis (cf. §2.1). Le dosage a été réalisé pour toutes les C_{HB} étudiées à partir du cruor (1, 2, 5 et 8%, p/v) et pour tous les DH (de 0 à 18%).

Les analyses en CLHP-PI indiquaient que l'identification du peptide n'était pas impactée par l'augmentation de la C_{HB} . Pour tous les DH et toutes les C_{HB} testées, PA restait inférieur à PT et MA était plus faible que MT, estimant non seulement la bonne pureté du pic mais également la grande similitude entre le spectre du peptide synthétique et celui au sein de l'hydrolysate.

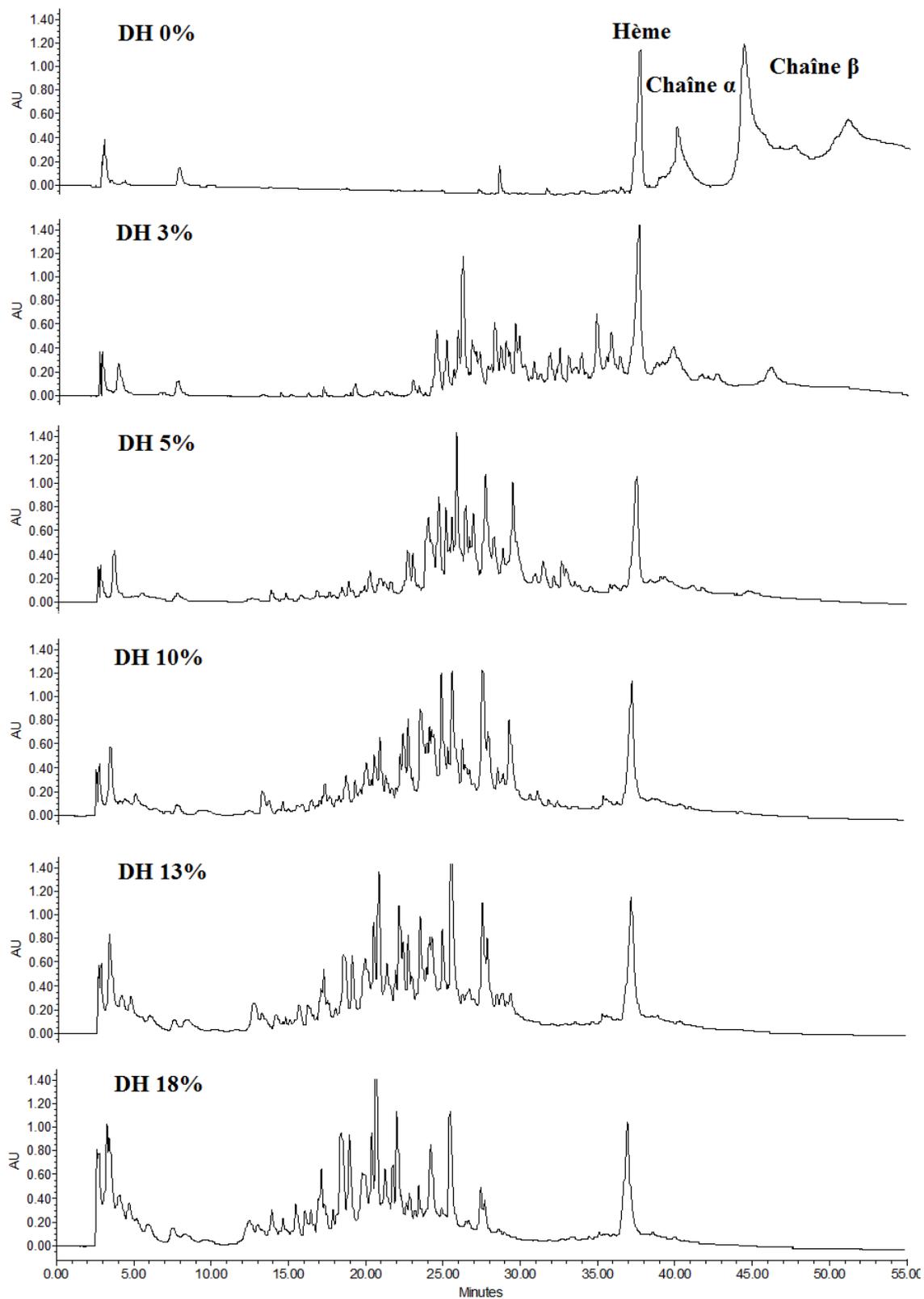
Afin d'évaluer la production du peptide à plus grande échelle, il était nécessaire d'augmenter la C_{HB} et de vérifier la production du peptide à des concentrations initiales en substrat suffisamment importantes afin de permettre une valorisation rapide et conséquente du co-produit. Toutefois, une C_{HB} supérieure à 8% (p/v) pouvait être problématique car dans ce cas, le milieu initial n'était plus homogène si la solubilisation de l'hémoglobine ou du cruor s'effectuait sans ajout de sel, c'est-à-dire simplement en eau. Également, l'augmentation de la concentration initiale en hémoglobine a permis de confirmer la capacité de la pepsine utilisée à hydrolyser à hautes concentrations en substrat. Les profils chromatographiques pour toutes les C_{HB} testées sont présentées en **Figure 44**. Il est alors constaté que le mécanisme d'hydrolyse, de type *zipper* restait identique quelle que soit la concentration en hémoglobine bovine initialement utilisée.



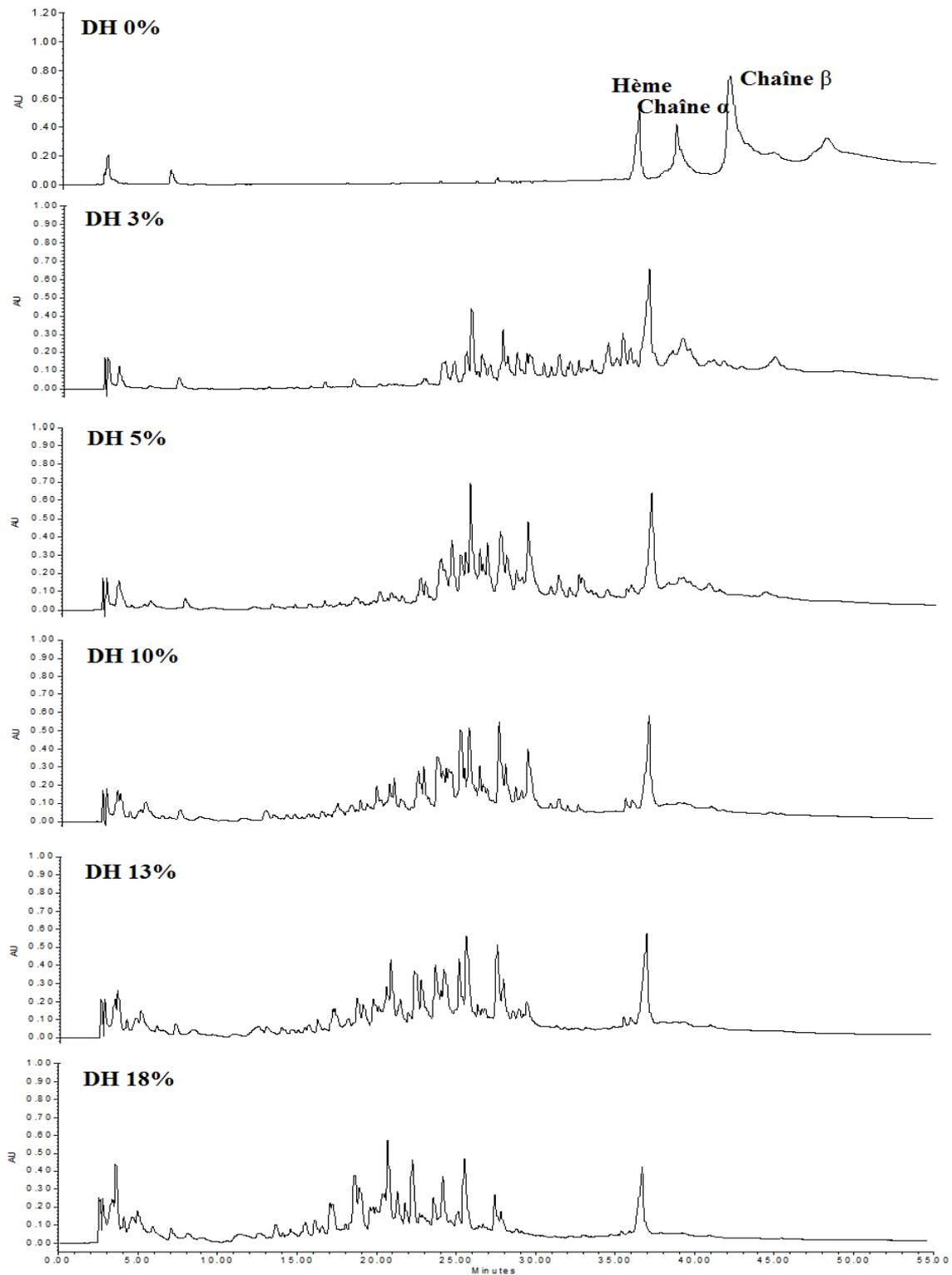
(a : cruor à une C_{HB} de 1%, p/v)



(b : cruor à une C_{HB} de 2%, p/v)



(c : cruor à une C_{HB} de 5%, p/v)



(d : cruor à une C_{HB} de 8%, p/v)

Figure 44 : Profils chromatographiques d'hydrolyses du cruor bovin à 215 nm par CLHP-PI, analysés par colonne de type C4 pour différentes concentrations initiales en hémoglobine bovine (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11)
 (a) 1%, (b) 2%, (c) 5% dilué par 3, (d) 8% dilué par 8

3.4. Quantification de la production du peptide actif α 137-141

La **Figure 45** présente la cinétique d'apparition du peptide α 137-141 en fonction du DH et des différentes C_{HB} testées. Le **Tableau 7** récapitule l'ensemble des données.

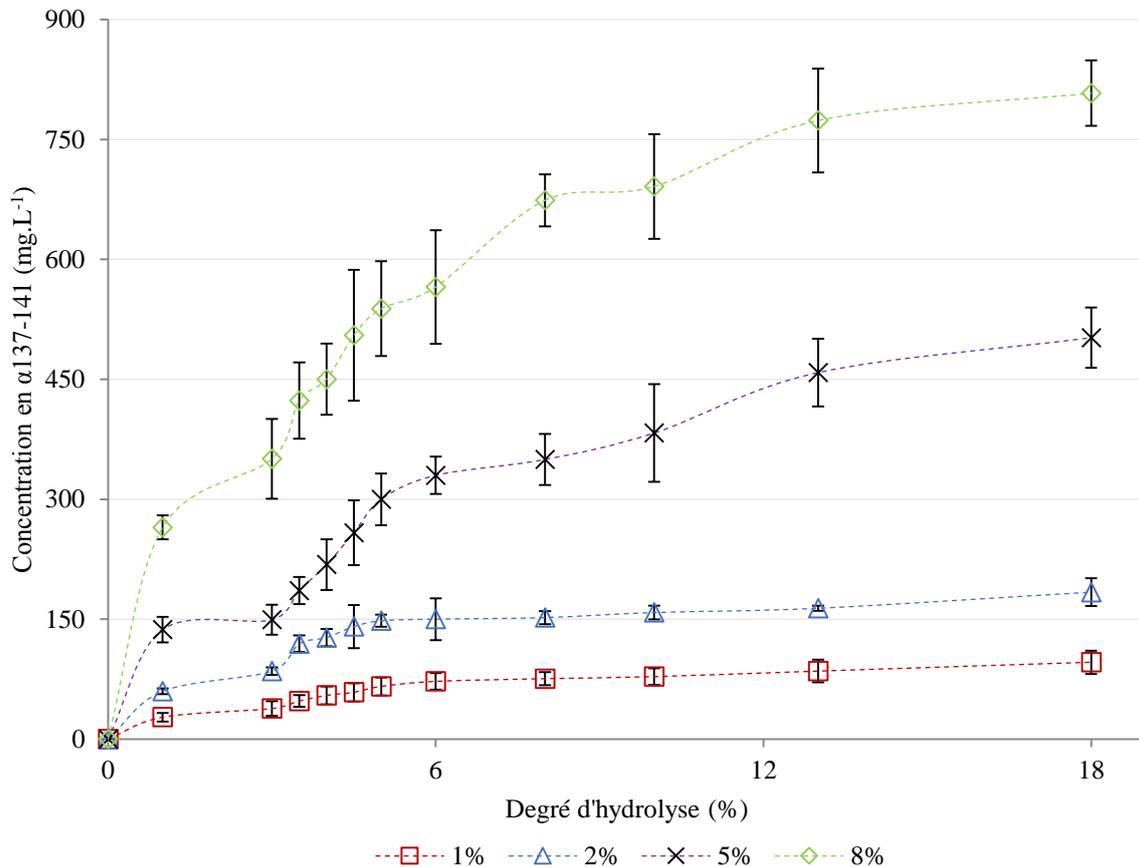


Figure 45 : Cinétique d'apparition du peptide α 137-141 au cours de l'hydrolyse pepsique du cruor bovin à différentes concentrations en hémoglobine bovine (p/v) (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11)

À une C_{HB} de 1% (p/v) et un DH de 18%, la $C_{\alpha 137-141}$ était de $96.27 \pm 14.58 \text{ mg.L}^{-1}$. En doublant la C_{HB} initiale à 2% (p/v), la $C_{\alpha 137-141}$ a également été augmentée d'un facteur 2 pour atteindre une concentration finale de $183.87 \pm 17.36 \text{ mg.L}^{-1}$. Avec une C_{HB} de 5% (p/v), l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine contenue dans le cruor a permis de récolter une concentration finale en α 137-141 égale à $502.13 \pm 37.81 \text{ mg.L}^{-1}$, ce qui équivalait à une concentration cinq fois supérieure environ à celle obtenue à 1% (p/v). Finalement, l'hydrolyse avec une C_{HB} égale à 8% (p/v) a été réalisée et a permis de produire environ huit fois plus

d' α 137-141 qu'à 1% (p/v), soit une $C_{\alpha 137-141}$ de $807.95 \pm 41.03 \text{ mg.L}^{-1}$ pour une durée d'hydrolyse de 24 heures.

Tableau 7 : Concentrations du peptide α 137-141 (mg.L^{-1}) au cours de l'hydrolyse du cruor bovin à différentes concentrations en hémoglobine bovine (p/v) (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11)

Degré d'hydrolyse (%)	Concentration 1%	en hémoglobine 2%	bovine 5%	(p/v) 8%
0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1	27.50 ± 5.45	59.85 ± 3.65	137.01 ± 15.99	264.87 ± 14.95
3	38.28 ± 9.19	85.11 ± 4.69	149.36 ± 18.64	350.65 ± 49.97
3.5	47.70 ± 7.32	119.26 ± 10.38	185.85 ± 17.03	423.36 ± 47.71
4	54.78 ± 11.09	127.07 ± 10.85	218.27 ± 31.78	450.23 ± 44.60
4.5	58.68 ± 11.42	140.86 ± 26.83	258.09 ± 40.49	505.14 ± 81.93
5	65.95 ± 11.21	148.10 ± 7.65	299.88 ± 32.30	538.39 ± 39.28
6	72.33 ± 10.30	150.12 ± 26.12	329.98 ± 23.29	565.45 ± 71.26
8	75.66 ± 8.08	152.12 ± 8.24	349.85 ± 31.85	673.87 ± 32.73
10	78.25 ± 10.48	158.38 ± 8.65	382.89 ± 61.11	691.38 ± 65.47
13	85.15 ± 14.17	163.73 ± 3.36	458.46 ± 42.38	773.75 ± 64.74
18	96.27 ± 14.58	183.87 ± 17.36	502.13 ± 37.81	807.95 ± 41.03

En conséquence, il a donc été observé que la quantité d' α 137-141 générée au cours de l'hydrolyse évoluait de manière proportionnelle avec la C_{HB} . De plus, il a été déterminé que l'enzyme conservait les mêmes mécanismes d'hydrolyse pour toutes les concentrations testées. En effet, quelle que soit la C_{HB} testée, l'allure de la cinétique restait similaire. Après un DH de 10%, la production de l' α 137-141 ralentissait, puis, tendait vers un plateau. Ce résultat confirmait à nouveau que l' α 137-141 est un peptide final dans ces conditions d'hydrolyse (Lignot *et al.*, 1999).

Afin de compléter ces données, le rendement de production de l' α 137-141 a été évalué durant l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine. La **Figure 46** présente les rendements de production de l' α 137-141 pour toutes les C_{HB} testées. Il a été constaté qu'il n'y a pas de différence significative entre les différentes C_{HB} pour un même DH.

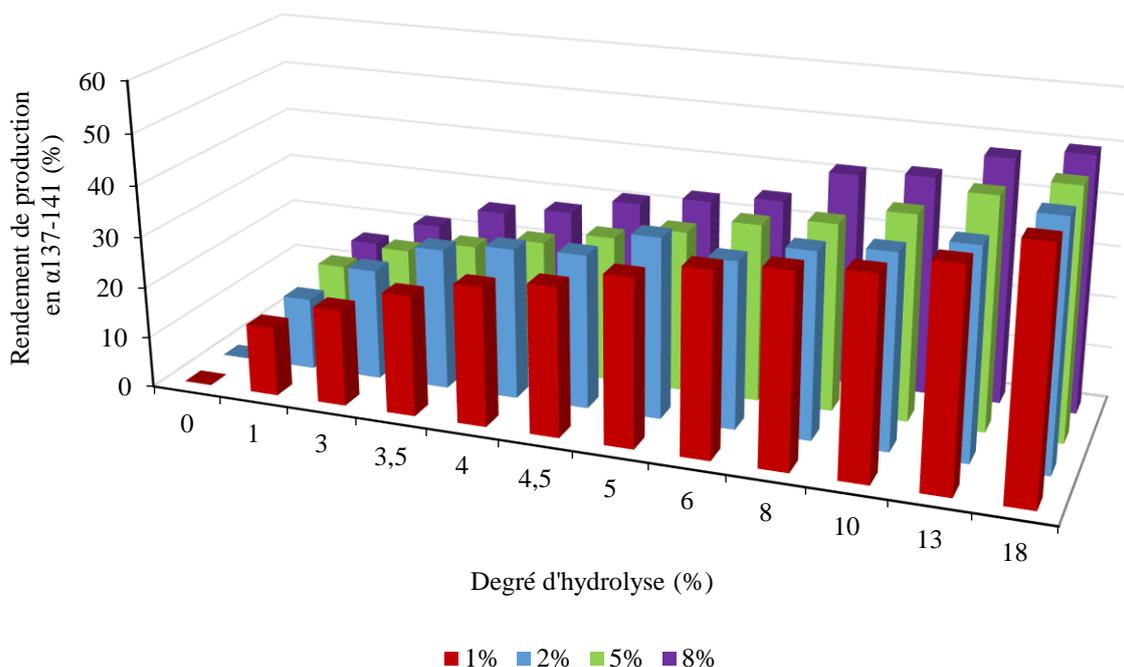


Figure 46 : Rendements de production de l' α 137-141 au cours de l'hydrolyse pepsique du cruor bovin à différentes concentrations (p/v) (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11)

À un DH final de 18%, la production moyenne d' α 137-141 était aux environs de 50% ($48.54 \pm 1.13\%$), d'après la formule proposée (cf. §3.1.5.). Ceci pouvait être justifié par la génération des peptides au cours de l'hydrolyse entrant en compétition comme nouveaux substrats au niveau du site actif de l'enzyme, ralentissant la vitesse d'hydrolyse (Jr *et al.*, 2004; Saadi *et al.*, 2015). Ainsi, comme précédemment observé, la production de l' α 137-141 a rapidement progressé, corrélant la tendance vers le plateau observé à partir d'un DH de 10%, soit une durée d'hydrolyse équivalente à 3 heures dans ces conditions.

En considérant comme maximale la production d' α 137-141 à 24 heures, soit un DH de 18%, il pouvait être estimé que $29.65 \pm 2.37\%$ de l' α 137-141 finalement produits à 24 heures l'ont été au bout de seulement 1 min d'hydrolyse (soit un DH de 1%). De même, à 30 min d'hydrolyse (soit un DH de 5%), $67.18 \pm 4.14\%$ du peptide finalement générés sont déjà générés.

L'ensemble de ces données pourrait permettre une réflexion sur la mise en œuvre d'un procédé, notamment en terme de rentabilité vis à vis de la valorisation d'un peptide donné.

3.5. Sélection et caractérisation des hydrolysats peptidiques pour la séparation sélective de l' α 137-141

3.5.1. Sélection des hydrolysats peptidiques

L'ensemble des données précédentes suggérait que la séparation préférentielle d'un peptide donné au sein d'un hydrolysats d'une grande complexité et diversité physico-chimiques peptidiques pouvait être influencée par le DH de la protéine. Ainsi, le peptide d'intérêt se séparerait avec une plus grande pureté ou une plus grande concentration dans certains environnements peptidiques, que ce soit en termes de nombre de peptides ou de masses moléculaires présentes.

Pour la suite de l'étude, il convenait donc de sélectionner plusieurs hydrolysats qui possédaient des populations peptidiques suffisamment variées. Du fait du mécanisme d'hydrolyse de type *zipper* mis en avant et de la présence relativement précoce de l' α 137-141 au cours de la réaction de protéolyse, cinq hydrolysats ont pu être sélectionnés : ceux possédant les DH de 3, 5, 10, 13 et 18%, correspondant à des durées d'hydrolyse de 2.5 et 30 min, et de 3, 10 et 24 heures.

Il est à noter que les identifications suivantes restaient valables pour les deux substrats étudiés (hémoglobine bovine purifiée et cruor bovin) et quelle que soit la C_{HB} testée. En effet, il a été précédemment démontré que la sélectivité réactionnelle de l'enzyme était identique au sein du modèle protéique de l'hémoglobine bovine purifiée et du co-produit des abattoirs, le cruor, et ce, pour toutes les C_{HB} étudiées (de 1 à 8%, p/v). Ainsi, pour une même C_{HB} , les populations peptidiques générées pour l'hémoglobine bovine purifiée et le cruor étaient similaires.

3.5.2. Identification des peptides au sein des hydrolysats sélectionnés

Les hydrolysats sélectionnés ont été analysés par LC-MS/MS, selon le protocole décrit dans le Chapitre 2, consacré aux techniques d'analyse peptidique. De manière synthétique, le **Tableau 8** présente une vue globale de l'ensemble des résultats obtenus.

Conformément au mécanisme *zipper* identifié, il est bien observé que le nombre total de peptides au sein de l'hydrolysats augmentait avec l'avancée du DH. Ainsi, à un DH de 3%, 78

peptides au total ont été référencés, contre 162 à un DH de 18%. De manière consécutive, la répartition des peptides selon leur masse molaire n'était pas identique selon le DH étudié. En effet, les peptides intermédiaires de grandes masses molaires (> 2000 Da) ont été davantage présents pour des faibles DH. 6 séquences ont ainsi pu être identifiées à un DH de 3% et ont progressivement été clivées. 2 en sont encore dénombrées à un DH de 13%, puis aucune à un DH de 18%. Au cours de l'hydrolyse, ils ont été clivés en des peptides plus courts, d'une masse molaire comprise entre 1501 et 2000 Da, et dont le nombre augmentait jusqu'à un DH de 13% : 17 peptides à un DH de 3%, 19 à un DH de 13% puis 14 à un DH de 18%. Selon le mécanisme établi, le nombre de peptides de faible masse molaire a également augmenté tout au long de la réaction d'hydrolyse. Un unique peptide a été identifié pour une masse molaire inférieure à 500 Da à un DH de 3% et 11 l'ont été à un DH 18%. Concernant la gamme de masses comprises entre 501 et 1000 Da, l'évolution a été la plus remarquable, passant de 28 peptides à un DH de 3% à 110 pour un DH de 18%.

Tableau 8 : Répartition des masses molaires (Da) des peptides d'hydrolysats d'hémoglobine bovine ou du cruor bovin à différents degrés d'hydrolyse et évolution du nombre total de peptides générés au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine porcine (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11)

DH (%)		3	5	10	13	18
Gammes de masses moléculaires (Da)	< 500	1	8	9	11	11
	501 to 1000	28	43	75	91	110
	1001 to 1500	26	29	27	32	27
	1501 to 2000	17	16	19	19	14
	> 2001	6	5	2	2	0
Total		78	101	132	155	162

Globalement, l'avancement du degré d'hydrolyse engendrait une augmentation du nombre de séquences peptidiques identifiées, notamment en ce qui concernaient les peptides dont les masses étaient comprises entre 0 et 1000 Da. L'ensemble des données de l'identification peptidique est disponible dans les tableaux suivants. Le **Tableau 9** recense les peptides identifiés au sein de l'hydrolysats à un DH de 3%, le **Tableau 10** pour le DH de 5%, le **Tableau 11** pour le DH de 10%, le **Tableau 12** pour le DH de 13% et le **Tableau 13** pour le DH de 18%.

Tableau 9 : Séquences peptidiques identifiées au sein de l'hydrolysats d'hémoglobine bovine à un DH de 3% (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11)

Position	Séquence	Masse moléculaire (Da)	pHi
β85-89	AALSE	489	1,00
β9-13	AVTAF	507	5,50
α102-106	SHSLL	555	7,54
α6-11	KA AVTA	560	9,91
β121-125	FTPVL	575	3,38
β85-90	AALSEL	602	0,92
α24-29	YGAEAL	622	0,92
α137-141	TSKYR	653	10,5
β32-36	VVYPW	662	5,50
α101-106	LSHSLL	668	7,81
α100-106	LLSHSL	668	7,81
α136-141	LTSKYR	766	10,47
β31-36	LVVYPW	775	3,54
α100-106	LLSHSLL	781	7,81
α99-105	KLLSHSL	796	9,91
β41-47	FESFGDL	813	0,63
α129-136	LANVSTVL	815	5,50
α85-91	DLHAHKL	832	7,98
β35-40	PWTQRF	833	11,29
α92-98	RVDPVNF	845	6,25
α135-141	VLTSKYR	866	10,46
β102-109	FKLLGNVL	903	8,88
α99-106	KLLSHSLL	910	9,91
β129-137	FQKVVAGVA	918	9,88
β3-11	TAEKAAVT	918	4,15
α125-132	LDKFLANV	919	6,63
α30-36	ERMFLSF	928	6,86
α134-141	TVLTSKYR	967	10,40
β138-145	NALAHRYH	980	9,41
α66-74	LTKAVEHLD	1025	5,17
β137-145	ANALAHRYH	1052	9,90
α133-141	STVLTSKYR	1054	10,41
α90-98	KLRVDPVNF	1087	9,90
α125-134	LDKFLANVST	1107	6,63
α99-108	KLLSHSLLVT	1110	9,91
β3-13	TAEKAAVTAF	1137	4,15
β1-11	MLTAEKAAVT	1163	4,15
α97-106	NFKLLSHSLL	1171	9,17
β32-40	VVYPWTQRF	1195	9,81
β85-95	AALSELHCDKL	1199	5,17
α126-136	DKFLANVSTVL	1206	6,66

(suite **Tableau 9**)

Position	Séquence	Masse moléculaire (Da)	pH_i
β135-145	GVANALAHRYH	1208	9,83
β1-12	MLTAEKAAVTA	1234	4,15
α81-91	SESDLHAHKL	1249	6,05
α131-141	NVSTVLTSKYR	1267	10,39
β31-40	LVVYPWTQRF	1308	9,83
α2-14	LSAADKGNVKAAW	1330	9,93
α130-141	ANVSTVLTSKYR	1338	10,5
β133-145	VAGVANALAHRYH	1378	9,81
β1-13	MLTAEKAAVTAF	1381	4,15
α36-46	FPTTKTYFPFH	1385	8,88
α87-98	HAHKL RVDPVNF	1432	9,87
α129-141	LANVSTVLTSKYR	1451	10,47
α35-46	SFPTTKTYFPFH	1472	9,50
α67-80	TKAVEHLDDLPGAL	1478	4,16
α70-83	VEHLDDLPGALSEL	1507	3,42
α110-124	ASHLPSDFTP AVHAS	1536	6,04
α34-46	LSFPTTKTYFPFH	1585	9,74
α75-89	HLDDLKGTFAALSEL	1630	4,16
β111-126	ASHLPSDFTP AVHASL	1649	6,48
α69-83	FSNGMKHLDDLKGT	1709	7,55
β34-47	FLSFPTTKTYFPFH	1732	8,88
β130-145	QKVVAGVANALAHRYH	1733	10,40
β93-107	RVDPVNFKLLSHSL	1737	9,83
β110-125	VVVLARNFGKEFTPVL	1788	10,08
α67-83	TKAVEHLDDLPGALSEL	1807	3,93
β14-30	WGKVKVDEVGGEALGRL	1812	6,91
α107-124	VTLASHLPSDFTP AVHAS	1849	6,04
β129-145	FQKVVAGVANALAHRYH	1880	10,41
α66-83	LTKAVEHLDDLPGALSEL	1920	3,93
α107-125	VTLASHLPSDFTP AVHASL	1962	6,48
β128-145	DFQKVVAGVANALAHRYH	1995	8,88
α110-128	ASHLPSDFTP AVHASLDKF	2039	6,48
α81-98	SESDLHAHKL RVDPVNF	2076	6,06
α107-126	VTLASHLPSDFTP AVHASLD	2077	4,87
α1-23	VLSAADKGNVKAAWGKVGGAEE	2235	9,79
β65-84	KVLDSFSNGMKHLDDLKGT	2251	7,58
α107-141	VTLASHLPSDFTP AVHASLDKFLANVSTVLTSKYR	3787	9,64

Tableau 10 : Séquences peptidiques identifiées au sein de l'hydrolysate d'hémoglobine bovine à un DH de 5% (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11)

Position	Séquence	Masse moléculaire (Da)	pH _i
β82-84	GTF	323	5,50
α95-97	PVN	328	5,50
α27-29	EAL	332	3,81
α29-31	LER	416	6,86
α41-43	TYF	429	5,50
α37-40	PTTK	445	10,57
β92-95	CDKL	478	5,92
β85-89	AALSE	489	1,00
β9-13	AVTAF	507	5,50
α22-26	AEYGA	509	0,91
α102-106	SHSLL	555	7,54
β85-90	AALSEL	602	0,92
α129-134	LANVST	603	5,50
α79-84	ALSELS	618	1,01
α24-29	YGAEAL	622	0,92
α54-59	QVKGHG	624	9,84
α58-64	HGAKVAA	652	9,88
α137-141	TSKYR	653	10,50
α81-86	SESDL	662	0,63
β32-36	VVYPW	663	5,50
α122-127	HASLDK	668	7,56
α101-106	LSHSL	668	7,81
β45-51	GDLSTAD	677	0,73
α123-128	ASLDKF	679	6,69
α99-104	KLLSHS	683	9,91
β1-6	MLTAE	692	0,85
α119-125	PAVHASL	693	8,26
α129-135	LANVSTV	702	3,65
α130-136	ANVSTVL	702	3,70
β7-13	KAAVTAF	706	9,91
β103-109	KLLGNVL	755	9,91
α136-141	LTSKYR	766	10,47
α100-106	LLSHSL	781	7,81
α99-105	KLLSHSL	796	9,91
β41-47	FESFGDL	813	0,63
α129-136	LANVSTVL	815	5,50
β35-40	PWTQRF	833	11,29
α92-98	RVDPVNF	845	6,25
β103-110	KLLGNVLV	855	9,91
α135-141	VLTSKYR	866	10,46
α126-133	DKFLANVS	892	6,66
β7-14	KAAVTAFW	893	9,91

(suite **Tableau 10**)

Position	Séquence	Masse moléculaire (Da)	pH_i
β102-109	FKLLGNVL	903	8,88
α66-73	LTKAVEHL	910	7,80
α99-106	KLLSHSLL	910	9,91
α74-82	DDLPGALSE	915	0,59
β129-137	FQKVVAGVA	918	9,88
β130-139	QKVVAGVANA	956	9,83
α134-141	TVLTSKYR	967	10,40
β138-145	NALAHRYH	980	9,41
β34-40	YPWTQRF	996	9,57
α99-107	KLLSHSLLV	1009	9,91
β137-145	ANALAHRYH	1052	9,90
α133-141	STVLSKYR	1054	10,41
α98-106	FKLLSHSLL	1057	9,06
α119-128	PAVHASLDKF	1084	8,15
β3-13	TAEKAAVTAF	1137	4,15
α56-67	KGHGAKVAAALT	1153	10,69
β70-79	FSNGMKHLDD	1162	5,04
β1-11	MLTAEKAAVT	1163	4,15
α72-82	HLDDLPGALSE	1166	3,54
α118-128	TPAVHASLDKF	1185	7,50
α117-128	FTPAVHASLDKF	1185	7,56
β32-40	VVYPWTQRF	1195	9,81
α34-43	LSFPTTKTYF	1204	9,74
α126-136	DKFLANVSTVL	1206	6,66
β135-145	GVANALAHRYH	1208	9,83
β1-12	MLTAEKAAVTA	1234	4,15
α37-46	PTTKTYFPHF	1238	10,09
β114-124	ARNFGKEFTPV	1247	8,88
β2-13	LTAEKAAVTAF	1250	4,15
β31-40	LVVYPWTQRF	1308	9,83
α110-122	ASHLPSDFTPAVH	1378	6,48
β114-125	ARNFGKEFTPVL	1378	8,88
β1-13	MLTAEKAAVTAF	1381	4,15
α36-46	FPTTKTYFPHF	1385	8,88
α87-98	HAHKLRVDPVNF	1432	9,87
α129-141	LANVSTVLSKYR	1451	10,47
α35-46	SFPTTKTYFPHF	1472	9,50
β14-27	WGKVKVDEVGGEAL	1486	4,32
α70-83	VEHLDDLPGALSEL	1507	3,42
α34-46	LSFPTTKTYFPHF	1585	9,74
β96-109	HVDPENFKLLGNVL	1594	5,17
α110-125	ASHLPSDFTPAVHASL	1649	6,48
β70-84	FSNGMKHLDDLKGTG	1709	7,55

(suite **Tableau 10**)

Position	Séquence	Masse moléculaire (Da)	pH_i
α 33-46	FLSFPTTKTYFPHF	1732	8,88
β 130-145	QKVVAGVANALAHRYH	1733	10,40
α 84-98	SDLHAHKLRVDPVNF	1747	7,70
α 109-125	LASHLPSDFTPAVHASL	1762	6,48
α 67-83	TKAVEHLDDLPGALSEL	1807	3,93
β 14-30	WGKVKVDEVGGEALGRL	1812	6,91
α 83-98	LSDLHAHKLRVDPVNF	1860	7,95
β 129-135	FQKVVAGVANALAHRYH	1880	10,41
α 66-83	LTKAVEHLDDLPGALSEL	1920	3,93
α 107-125	VTLASHLPSDFTPAVHASL	1962	6,48
β 128-145	DFQKVVAGVANALAHRYH	1995	8,88
α 110-128	ASHLPSDFTPAVHASLDKF	2039	6,48
α 64-83	AALTKAVEHLDDLPGALSEL	2062	3,93
α 60-80	AKVAAALTKAVEHLDDLPGAL	2102	5,23
β 126-145	QADFQKVVAGVANALAHRYH	2194	9,47
α 107-141	VTLASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVSTVLTSKYR	3787	9,64

Tableau 11 : Séquences peptidiques identifiées au sein de l'hydrolysate d'hémoglobine bovine à un DH de 10% (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11)

Position	Séquence	Masse moléculaire (Da)	pH _i
β82-84	GTF	323	3,70
α95-97	PVN	328	5,50
β25-27	EAL	332	3,81
α29-31	LER	416	6,86
α41-43	TYF	429	5,50
α37-40	PTTK	445	10,57
β92-95	CDKL	478	5,92
β85-89	AALSE	489	1,00
α130-134	ANVST	490	3,76
β9-13	AVTAF	507	5,50
α24-28	YGAEA	509	0,91
β105-109	LGNVL	514	3,63
β123-127	PVLQA	526	4,07
α84-88	SDLHA	541	4,87
β109-113	LVVVL	541	3,63
β130-134	QKVVA	543	9,83
α81-85	SELS	549	0,81
α101-105	LSHSL	555	7,81
α102-106	SHSLL	555	7,54
β7-12	KA AVTA	559	9,91
β2-6	LTAEE	561	0,85
β45-50	GDLSTA	562	0,69
β1-5	MLTAE	563	1,00
β121-145	FTPVL	575	3,38
α130-135	ANVSTV	589	3,72
β85-90	AALSEL	602	0,92
α24-29	YGAEAL	622	0,92
β103-108	KLLGNV	642	9,91
α137-141	TSKYR	653	10,50
α66-71	LTKAVE	659	6,85
α81-86	SESDL	662	0,63
β32-36	VVYPW	663	5,50
β42-47	ESFGDL	666	0,63
α100-105	LLSHSL	668	7,81
α101-106	LSHSL	668	7,81
α122-127	HASLDK	668	7,56
β45-51	GDLSTAD	677	0,73
α123-128	ASLDKF	679	6,69
β141-145	AHRYH	682	9,90
α99-104	KLLSHS	683	9,91
α47-53	DLSHGSA	685	4,87
β129-134	FQKVVA	690	9,88

(suite Tableau 11)

Position	Séquence	Masse moléculaire (Da)	pH _i
α119-125	PAVHASL	693	8,26
α74-80	DDLPGAL	699	0,54
α130-136	ANVSTVL	702	3,70
α129-135	LANVSTV	702	3,65
β7-13	KAAVTAF	706	9,91
α42-45	YFPHF	709	7,52
β24-30	GEALGRL	714	6,86
β103-109	KLLGNVL	755	9,91
β2-8	LTAEKA	760	4,15
β32-37	VVYPWT	763	3,61
α136-141	LTSKYR	766	10,47
β130-137	QKVVAGVA	770	9,83
α100-106	LLSHSL	781	7,81
β140-145	LAHRYH	795	9,83
α67-73	TKAVEHL	796	7,50
α99-105	KLLSHSL	796	9,91
α41-46	TYFPHF	810	7,48
β41-47	FESFGDL	813	0,63
α129-136	LANVSTVL	815	5,50
β114-120	ARNFGKE	820	10,18
β103-110	KLLGNVLV	855	9,91
β96-102	HVDPENF	856	3,92
α135-141	VLTSKYR	866	10,46
β74-80	MKHLDDL	870	5,04
β22-30	VGGEALGRL	870	6,84
β1-8	MLTAEKA	891	4,15
β7-14	KAAVTAFW	893	9,91
α34-41	LSFPTTKT	893	10,12
β102-109	FKLLGNVL	903	8,88
α66-73	LTKAVEHL	910	7,80
α99-106	KLLSHSL	910	9,91
α74-82	DDLPGALSE	915	0,59
β129-137	FQKVVAGVA	918	9,88
β3-11	TAEKAAVT	918	4,15
β73-81	HLDDLPGAL	949	3,71
α129-138	QKVVAGVANA	956	9,83
β14-21	WGKVKVDE	960	6,79
β95-102	LHVDPENF	969	3,92
β138-145	NALAHRYH	980	9,41
α65-73	ALTKAVEHL	981	7,86
β3-12	TAEKAAVTA	990	4,15
β34-40	YPWTQRF	996	9,57
β2-11	LTAEKAAVT	1032	4,15

(suite Tableau 11)

Position	Séquence	Masse moléculaire (Da)	pH _i
β137-145	ANALAHRYH	1052	9,90
α64-73	AALTKAVEHL	1052	7,86
α133-141	STVLTSKYR	1054	10,41
β2-12	LTAEKAAVTA	1103	4,15
β129-139	FQKVVAGVANA	1103	9,88
β20-30	DEVGGEALGRL	1115	3,69
β3-13	TAEKAAVTAF	1137	4,15
β70-79	FSNGMKHLDD	1162	5,04
β73-83	HLDDLPGALSE	1166	3,54
α70-80	VEHLDDLPGAL	1178	3,54
α117-128	FTPAVHASLDFK	1185	7,56
β32-40	VVYPWTQRF	1195	9,81
α34-43	LSFPTTKTYF	1204	9,74
β135-145	GVANALAHRYH	1208	9,83
β1-12	MLTAEKAAVTA	1234	4,15
β114-124	ARNFGKEFTPV	1265	10,18
α87-97	HAHKLRVDPVN	1285	9,87
β31-40	LVVYPWTQRF	1308	9,83
β14-26	WGKVKVDEVGGEA	1373	4,32
α110-122	ASHLPSDFTPAVH	1378	6,48
β133-145	VAGVANALAHRYH	1378	9,81
β114-125	ARNFGKEFTPVL	1378	8,88
α87-98	HAHKLRVDPVNF	1432	9,87
α110-123	ASHLPSDFTPAVHA	1449	6,04
α67-80	TKAVEHLDDLPGAL	1478	4,16
β14-26	WGKVKVDEVGGEAL	1486	4,32
α70-83	VEHLDDLPGALSEL	1507	3,42
α34-46	LSFPTTKTYFPHF	1585	9,74
α66-80	LTKAVEHLDDLPGAL	1591	4,16
α110-125	ASHLPSDFTPAVHASL	1649	6,48
α65-80	ALTKAVEHLDDLPGAL	1662	4,16
β70-84	FSNGMKHLDDLKGT	1709	7,55
α33-46	FLSFPTTKTYFPHF	1732	8,88
α47-64	DLSHGSAQVKGHGAKVAA	1732	9,97
α64-80	AALTKAVEHLDDLPGAL	1733	4,16
β130-145	QKVVAGVANALAHRYH	1733	10,40
α84-98	SDLHAHKLRVDPVNF	1747	7,70
α47-65	DLSHGSAQVKGHGAKVAAA	1803	9,97
α67-83	TKAVEHLDDLPGALSEL	1807	3,93
β14-30	WGKVKVDEVGGEALGRL	1812	6,91
β15-32	GKVKVDEVGGEALGRLLV	1838	7,02
α47-66	DLSHGSAQVKGHGAKVAAAL	1916	9,97
α107-125	VTLASHLPSDFTPAVHASL	1962	6,48

(suite Tableau 11)

Position	Séquence	Masse moléculaire (Da)	pH_i
α 65-83	ALTKAVEHLDDLPGALSEL	1991	3,93
β 128-145	DFQKVVAGVANALAHRYH	1995	8,88
β 12-30	AFWGKVKVDEVGGEALGRL	2030	7,07
β 126-145	QADFQKVVAGVANALAHRYH	2194	9,47

Tableau 12 : Séquences peptidiques identifiées au sein de l'hydrolysate d'hémoglobine bovine à un DH de 13% (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11)

Position	Séquence	Masse moléculaire (Da)	pH _i
β82-84	GTF	323	3,70
α95-97	PVN	328	5,50
β25-27	EAL	332	3,81
α29-31	LER	416	6,86
α41-43	TYF	429	5,50
α37-40	PTTK	445	10,57
β92-95	CDKL	478	5,92
β7-11	KAAVT	488	9,91
β85-89	AALSE	489	1,00
α130-134	ANVST	490	3,76
β45-49	GDLST	491	0,75
β9-13	AVTAF	507	5,50
α24-28	YGAEA	509	0,91
β105-109	LGNVL	514	3,63
β109-113	LVVVL	541	3,63
β130-134	QKVVA	543	9,83
β22-27	VGGEAL	544	0,92
β4-8	AEEKA	546	4,15
α101-105	LSHSL	555	7,81
α102-106	SHSLL	555	7,54
β7-12	KAAVTA	559	9,91
β2-6	LTAAE	561	0,85
β80-84	LKGTF	564	10,12
α69-73	AVEHL	567	5,10
β121-125	FTPVL	575	3,38
β102-106	FKLLG	576	9,88
β58-62	KVKAH	581	10,69
α130-135	ANVSTV	589	3,72
α129-134	LANVST	603	5,50
α124-128	SLDKF	608	6,38
α24-29	YGAEAL	622	0,92
α131-136	NVSTVL	631	3,21
β131-137	KVVAGVA	642	9,91
β3-8	TAAEKA	647	4,15
α137-141	TSKYR	653	10,50
α81-86	SELSDL	662	0,63
β32-36	VVYPW	663	5,50
β42-47	ESFGDL	666	0,63
β102-107	LSHSLL	668	7,81
α122-127	HASLDK	668	7,56
α117-122	FTPAVH	670	7,56

(suite **Tableau 12**)

Position	Séquence	Masse moléculaire (Da)	pH_i
α 44-50	GDLSTAD	677	0,73
β 124-129	ASLDKF	679	6,69
α 99-104	KLLSHS	684	9,91
α 47-53	DLSHGSA	685	4,87
β 129-134	FQKVVA	690	9,88
β 1-6	MLTAE	692	0,85
α 119-125	PAVHASL	693	8,26
α 74-80	DDLPGAL	699	0,54
α 130-136	ANVSTVL	702	3,70
α 129-135	LANVSTV	702	3,65
β 7-13	KAAVTAF	706	9,91
β 96-101	HVDPEN	709	3,92
α 42-46	YFPHF	709	7,52
α 65-71	ALTKAVE	730	6,91
β 5-11	EEKAAVT	746	4,15
α 24-30	YGAEALE	751	0,85
β 103-109	KLLGNVL	755	9,91
β 2-8	LTAEKA	760	4,15
β 32-37	VVYPWT	763	3,61
α 136-141	LTSKYR	766	10,47
β 130-137	QKVVAGVA	770	9,83
β 23-30	GGEALGRL	771	6,86
β 121-127	FTPVLQA	774	3,38
α 100-106	LLSHSL	781	7,81
β 102-108	FKLLGNV	789	9,88
α 118-125	TPAVHASL	794	7,50
β 140-145	LAHRYH	795	9,83
α 67-73	TKAVEHL	796	7,50
α 99-105	KLLSHSL	796	9,91
α 41-46	TYFPHF	810	7,48
β 41-47	FESFGDL	813	0,63
α 47-54	DLSHGSAQ	813	4,87
α 129-136	LANVSTVL	815	5,50
β 114-120	ARNFGKE	820	10,18
β 6-13	EKAAVTAF	835	6,85
β 96-102	HVDPENF	856	3,92
α 135-141	VLTSKYR	866	10,46
β 139-145	ALAHRYH	866	9,90
β 22-30	VGGEALGRL	870	6,84
β 111-118	ASHLPSDF	872	4,87
α 30-36	LVVYPWT	876	3,63
β 103-110	KLLGNVLV	883	9,91
β 1-8	MLTAEKA	891	4,15

(suite **Tableau 12**)

Position	Séquence	Masse moléculaire (Da)	pH_i
β7-14	KAAVTAFW	893	9,91
α34-41	LSFPTTKT	893	10,12
β102-109	FKLLGNVL	903	8,88
α66-73	LTKAVEHL	910	7,80
α99-106	KLLSHSLL	910	9,91
α74-82	DDLPGALSE	915	0,59
β129-137	FQKVVAGVA	918	9,88
β3-11	TAEKAAVT	918	4,15
β105-113	LGNVLVVVL	925	3,63
α117-125	FTPAVHASL	941	7,56
α72-80	HLDDLPGAL	949	3,71
β130-139	QKVVAGVANA	956	9,83
β14-21	WGKVKVDE	960	6,79
β95-102	LHVDPENF	969	3,92
β138-145	NALAHRYH	980	9,41
α65-73	ALTKAVEHL	981	7,86
β3-12	LTAEKAAVTA	990	4,15
β34-40	YPWTQRF	996	9,57
β102-110	FKLLGNVLV	1002	9,88
α99-107	KLLSHSLLV	1009	9,91
β137-145	ANALAHRYH	1052	9,90
α64-73	AALTKAVEHL	1052	7,86
α133-141	STVLTSKYR	1054	10,41
β93-101	DKLHVDPEN	1066	4,16
β129-139	FQKVVAGVANA	1103	9,88
β20-30	DEVGGEALGRL	1115	3,69
β3-13	TAEKAAVTAF	1137	4,15
β70-79	FSNGMKHLDD	1162	5,04
β14-24	WGKVKVDEVGG	1173	6,79
α70-80	VEHLDDLPGAL	1178	3,54
α117-128	FTPAVHASLDKF	1185	7,56
β32-40	VVYPWTQRF	1195	9,81
α34-43	LSFPTTKTYF	1204	9,74
β135-145	GVANALAHRYH	1208	9,83
α37-46	PTTKTYFPHF	1238	10,09
β70-80	FSNGMKHLDDL	1276	5,04
β134-145	AGVANALAHRYH	1279	9,90
α87-97	HAHKLRVDPVN	1285	9,87
β74-84	MKHLDDLKGTGTF	1304	7,55
β31-40	LVVYPWTQRF	1308	9,83
β115-125	RNFGKEFTPVL	1308	9,82
β32-41	VVYPWTQRFF	1342	9,81
β14-46	WGKVKVDEVGGEA	1373	4,32

(suite Tableau 12)

Position	Séquence	Masse moléculaire (Da)	pH _i
α110-122	ASHLPSDFTPAVH	1378	6,48
β114-125	ARNFGKEFTPVL	1378	8,88
α36-46	FPTTKTYFPHF	1385	8,88
α87-98	HAHKLRVDPVNF	1432	9,87
α110-123	ASHLPSDFTPAVHA	1449	6,04
α35-46	SFPTTKTYFPHF	1472	9,50
β14-27	WGKVKVDEVGGEAL	1486	4,32
β126-140	QADFQKVVAGVANAL	1530	6,35
α34-46	LSFPTTKTYFPHF	1585	9,74
α66-80	LTKAVEHLDDLPGAL	1591	4,16
α110-125	ASHLPSDFTPAVHASL	1649	6,04
α65-80	ALTKAVEHLDDLPGAL	1662	4,16
α47-63	DLSHGSAQVKGHGAKVA	1662	9,97
α67-82	TKAVEHLDDLPGALSE	1694	3,93
β70-84	FSNGMKHLDDLKGTG	1709	7,55
α33-46	FLSFPTTKTYFPHF	1732	8,88
α64-80	AALTKAVEHLDDLPGAL	1733	4,16
β130-145	QKVVAGVANALAHRYH	1733	10,40
α84-98	SDLHAHKLRVDPVNF	1747	7,70
α47-65	DLSHGSAQVKGHGAKVAAA	1803	9,97
β14-30	WGKVKVDEVGGEALGRL	1812	6,91
α65-82	ALTKAVEHLDDLPGALSE	1878	3,93
β129-145	FQKVVAGVANALAHRYH	1880	10,41
α47-66	DLSHGSAQVKGHGAKVAAAL	1916	9,97
α107-125	VTLASHLPSDFTPAVHASL	1962	6,04
β128-145	DFQKVVAGVANALAHRYH	1995	8,88
β126-145	QADFQKVVAGVANALAHRYH	2194	9,47
α1-23	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAE	2235	9,79

Tableau 13 : Séquences peptidiques identifiées au sein de l'hydrolysate d'hémoglobine bovine à un DH de 18% (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11)

Position	Séquence	Masse moléculaire (Da)	pH _i
β82-84	GTF	323	3,70
α95-97	PVN	328	5,50
β25-27	EAL	332	3,81
α29-31	LER	416	6,86
α41-43	TYF	429	5,50
α37-40	PTTK	445	10,57
β92-95	CDKL	478	5,92
β7-11	KAAVT	488	9,91
β85-89	AALSE	489	1,00
α130-134	ANVST	490	3,76
β45-49	GDLST	491	0,75
β9-13	AVTAF	507	5,50
α24-28	YGAEA	509	0,91
β105-109	LGNVL	514	3,63
β109-113	LVVVL	541	3,63
β135-140	GVANAL	543	3,63
β130-134	QKVVA	543	9,83
β22-27	VGGEAL	544	0,92
β4-8	AEEKA	546	4,15
α81-85	SELSL	549	0,63
α101-105	LSHSL	555	7,81
α102-106	SHSLL	555	7,54
β7-12	KAAVTA	559	9,91
β2-6	LTAEEL	561	0,85
β80-84	LKGTF	564	10,12
α69-73	AVEHL	567	5,10
α77-82	PGALSE	572	1,00
β121-125	FTPVL	575	3,38
β102-106	FKLLG	576	9,88
β58-62	KVKAH	581	10,69
α130-135	ANVSTV	589	3,72
β130-135	QKVVAG	600	9,83
α129-134	LANVST	603	5,50
α124-128	SLDKF	608	6,38
α24-29	YGAEAL	622	0,92
α131-136	NVSTVL	631	3,21
β103-108	KLLGNV	642	9,91
β131-137	KVVAGVA	642	9,91
β3-8	TAEELK	647	4,15
α137-141	TSKYR	653	10,40
α66-71	LTKAVE	659	6,85

(suite Tableau 13)

Position	Séquence	Masse moléculaire (Da)	pH _i
α81-86	SELSDL	662	0,63
β32-36	VVYPW	663	5,50
β42-47	ESFGDL	666	0,63
α100-105	LLSHSL	668	7,81
α101-106	LSHSL	668	7,81
α122-127	HASLDK	668	7,56
α117-122	FTPAVH	670	7,56
β20-26	DEVGGEA	675	0,57
β45-51	GDLSTAD	677	0,73
α123-128	ASLDKF	679	6,69
β79-84	DLKGTF	679	6,66
α99-104	KLLSHS	683	9,91
α47-53	DLSHGSA	685	4,87
β6-12	EKAAVTA	688	6,85
β129-134	FQKVVA	690	9,88
β1-4	MLTAE	692	0,85
α119-125	PAVHASL	693	8,26
α68-73	KAVEHL	695	7,60
α74-80	DDLPGAL	699	0,54
α130-136	ANVSTVL	702	3,70
α129-135	LANVSTV	702	3,65
β7-13	KAAVTAF	706	9,91
α42-46	YFPHF	709	7,52
β117-122	FGKEFT	727	6,61
α65-71	ALTKAVE	730	6,91
β129-135	FQKVVAG	747	9,88
α24-30	YGAEALE	751	0,85
β103-109	KLLGNVL	755	9,91
α38-43	TTKTYF	759	9,45
β2-8	LTAEKA	760	4,15
β32-37	VVYPWT	763	3,61
α136-141	LTSKYR	766	10,47
β130-137	QKVVAGVA	770	9,83
β23-30	GGEALGRL	771	6,86
β121-127	FTPVLQA	774	3,38
α100-106	LLSHSL	781	7,81
β20-27	DEVGGEAL	788	0,58
β102-108	FKLLGNV	789	9,88
α118-125	TPAVHASL	794	7,50
β140-145	LAHRYH	795	9,83
α67-73	TKAVEHL	796	7,50
α99-105	KLLSHSL	796	9,91
β128-134	DFQKVVA	805	6,66

(suite **Tableau 13**)

Position	Séquence	Masse moléculaire (Da)	pH_i
α41-46	TYFPHF	810	7,48
β41-47	FESFGDL	813	0,63
α47-54	DLSHGSAQ	813	4,87
α129-136	LANVSTVL	815	5,50
β4-11	AEEKAAVT	817	4,15
β1-7	MLTAE EK	820	4,15
β114-120	ARNFGKE	820	10,18
β95-101	LHVDPEN	822	3,92
β131-139	KVVAGVANA	827	9,91
β6-13	EKAAVTAF	835	6,85
α92-98	RVDPVNF	845	6,25
β42-49	ESFGDLST	854	0,69
β103-110	KLLGNVLV	855	9,91
α37-43	PTTKTYF	856	10,09
α135-141	VLTSKYR	866	10,46
β74-80	MKHLDDL	870	5,04
β22-30	VGGEALGRL	870	6,84
α110-117	ASHLPSDF	872	4,87
β31-37	LVVYPWT	876	3,63
β1-8	MLTAE EKA	891	4,15
β7-14	KA AVTAFW	893	9,91
α34-41	LSFPTTKT	893	10,12
β102-109	FKLLGNVL	903	8,88
α66-73	LTKAVEHL	910	7,80
α99-106	KLLSHSLL	910	9,91
α74-82	DDLPGALSE	915	0,59
β3-11	TAE EKA AVT	918	4,15
β105-113	LGNVLVVVL	925	3,63
α40-46	KTYFPHF	938	9,55
α117-125	FTP AVHASL	941	7,56
α72-80	HLDDLPGAL	949	3,71
β130-139	QKVVAGVANA	956	9,83
β14-21	WGKVKVDE	960	6,79
β95-102	LHVDPENF	969	3,92
β138-145	NALAHRYH	980	9,41
β3-12	TAE EKA AVTA	990	4,15
β34-40	YPWTQRF	996	9,57
β102-110	FKLLGNVLV	1002	9,88
β32-39	VVYPWTQR	1048	9,81
α133-141	STVLTSKYR	1054	10,41
α5-14	ADKGNVKA AW	1059	9,99
α89-97	HKLRVDPVN	1077	9,87
α54-65	QVKGHGAKVAAA	1136	10,69

(suite **Tableau 13**)

Position	Séquence	Masse moléculaire (Da)	pH_i
α38-46	TTKTYFPHF	1141	9,45
α12-23	AAWGKVGGHAAE	1153	7,86
β70-79	FSNGMKHLDD	1162	5,04
α70-80	VEHLDDLPGAL	1178	3,54
α117-128	FTPAVHASLDKF	1185	7,56
β32-40	VVYPWTQRF	1195	9,81
β135-145	GVANALAHRYH	1208	9,83
α56-66	KGHGAKVAAAL	1022	10,69
α37-46	PTTKTYFPHF	1238	10,09
α54-66	QVKGHGAKVAAAL	1249	10,69
β20-31	DEVGGEALGRLL	1228	3,69
α87-97	HAHKLRVDPVN	1285	9,87
β74-84	MKHLDDLKGTf	1304	7,55
β31-40	LVVYPWTQRF	1308	9,83
β128-140	DFQKVAVGVANAL	1331	6,66
β32-41	VVYPWTQRFF	1342	9,81
β114-125	ARNFGKEFTPVL	1378	8,88
α70-82	VEHLDDLPGALSE	1394	3,42
α87-98	HAHKLRVDPVNF	1432	9,87
β70-82	FSNGMKHLDDLKG	1461	7,55
β14-27	WGKVKVDEVGGEAL	1486	4,32
α110-124	ASHLPSDFTPAVHAS	1536	6,04
α110-125	ASHLPSDFTPAVHASL	1649	6,04
α67-82	TKAVEHLDDLPGALSE	1694	3,93
β70-84	FSNGMKHLDDLKGTf	1709	7,55
α33-46	FLSFPTTKTYFPHF	1732	8,88
α47-64	DLSHGSAQVKGHGAKVAA	1733	9,97
β130-145	QKVAVGVANALAHRYH	1733	10,4
α47-67	DLSHGSAQVKGHGAKVAAA	1803	9,97
α59-76	GAKVAAALTKAVEHLDDL	1821	5,23
β53-69	VMNPNKVKAHGKKVLDS	1864	10,70
β68-84	DSFSNGMKHLDDLKGTf	1911	5,13
α47-66	DLSHGSAQVKGHGAKVAAAL	1916	9,97
β52-69	AVMNNPKVKAHGKKVLDS	1935	10,71
α107-125	VTLASHLPSDFTPAVHASL	1962	6,48

Conclusions

Les études de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine ont démontré que le procédé enzymatique impliquait les mêmes mécanismes réactionnels au sein du cruor, co-produit des abattoirs. Les conditions d'hydrolyse (23°C, pH 3.5) ont permis l'obtention de l' α 137-141 dans des quantités importantes pour permettre une valorisation significative d'un point de vue industriel. De plus, en termes de productivité, les hydrolyses ont pu se dérouler à haute concentration initiale en substrat, permettant de traiter le co-produit de manière plus rapide et plus efficace en un même laps de temps.

Concernant le peptide d'intérêt, l' α 137-141, il a ainsi été démontré que sa production était proportionnelle à la concentration initiale en hémoglobine bovine. Son obtention a été réalisée de manière identique, tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif, au sein de l'hémoglobine bovine purifiée modèle qu'au sein du co-produit des abattoirs, le cruor. Également, il était à noter qu'au bout de 24 heures, $807.95 \pm 41.03 \text{ mg.L}^{-1}$ pouvaient être produits à une concentration initiale en hémoglobine bovine au sein du cruor de 8% (p/v). Le fait le plus marquant restait que plus de 65% de cette production étaient réalisés en seulement 30 min d'hydrolyse.

Il est également impératif de noter que les différents DH ont permis l'obtention de populations peptidiques différentes. D'une manière générale, plus le DH a été élevé, plus la population peptidique a été de faible masse moléculaire et a tendu vers des peptides moins hydrophobes. En revanche, le nombre de peptides a été, quant à lui, plus conséquent au fur et à mesure de l'avancée du DH.

La suite du projet consistait désormais à étudier la séparation sélective du peptide d'intérêt, l' α 137-141, par électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration (EDUF). Pour cela, dans un premier temps, cinq degrés d'hydrolyse offrant des populations peptidiques différentes, tant en termes de nombre de peptides que de masses moléculaires rencontrées, ont été sélectionnés : les DH 3, 5, 10, 13 et 18%, correspondant respectivement à des temps d'hydrolyse de 2.5 et 30 min, puis 3, 10 et 24 heures. Ceci a pour objectif de déterminer de manière préliminaire l'influence de la population peptidique sur le transport sélectif d'un peptide donné.

Production scientifique

Articles

Les résultats présentés tout au long de ce chapitre ont fait l'objet de la majeure partie d'une publication :

R. Przybylski, L. Firdaous, G. Châtaigné, P. Dhulster, N. Nedjar (2016). "Production of an antimicrobial peptide derived from slaughterhouse by-product and its potential application on meat as preservative". *Food Chemistry*, 211, 306-313.

Les connaissances et techniques développées au cours de ce travail ont aussi permis la participation à une publication :

A. Mokni, A. Sila, R. Przybylski, N. Nedjar-Arroume, I. Makhlof, C. Blecker, H. Attia, P. Dhulster, A. Bougatef, S. Besbes (2015). "Characterisation of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein concentrate". *Journal of Functional Foods*, 62, 516-525.

Poster

R. Przybylski, L. Firdaous, G. Chataigné, P. Dhulster, N. Nedjar-Arroume (Juin 2014). "Production of neokyotorphin, an antimicrobial peptide, from cruor, a bovine blood by-product". *4th International Symposium on Antimicrobial Peptide*, LORIENT, FRANCE.

Chapitre 4

*Séparation sélective du peptide
actif α 137-141 par électrodialyse
avec membrane d'ultrafiltration*

Chapitre 4 :

Séparation sélective du peptide actif α 137-141 par électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration (EDUF)

À la suite de la sélection de cinq hydrolysats d'hémoglobine et de cruor bovins possédant des degrés d'hydrolyse différents, le projet s'est basé sur la séparation sélective du peptide d'intérêt, le peptide antimicrobien α 137-141, dont la production par hydrolyse enzymatique a été étudiée au cours du Chapitre 3. Le procédé séparatif sélectionné a été l'électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration ou « EDUF ».

Les objectifs de ce chapitre ont été dans un premier temps de déterminer quel était le degré d'hydrolyse (DH) le plus approprié à séparer préférentiellement le peptide d'intérêt.

Dans la perspective d'obtenir le peptide actif avec une pureté maximale afin d'obtenir l'activité antimicrobienne la plus efficace possible, l'étude de l'influence du pH de travail a été réalisée avec le DH le plus adapté à la migration de l' α 137-141.

En dernier lieu et dans un souci d'améliorer la productivité du procédé, l'augmentation de la concentration en peptides au sein de la solution d'alimentation a été effectuée et son influence sur la séparation sélective de l' α 137-141 étudiée.

4.1. Matériels et méthodes spécifiques : équipement de l'électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration et protocoles d'étude

4.1.1. Décoloration des hydrolysats d'hémoglobine et de cruor bovins

La décoloration s'effectuait sur un hydrolysat dont la réaction a été stoppée par élévation du pH à une valeur de 9. Sous agitation (60 min⁻¹), le pH de l'hydrolysat est abaissé lentement à une valeur de 4.7 par le biais d'HCl (2 M) apporté dans le milieu par une pompe péristaltique afin de conserver un débit constant (2 mL.min⁻¹).

Après un temps de repos de 24 heures, l'hydrolysat est centrifugé (30 min à 4000 min⁻¹). Le surnageant est ensuite récolté, constituant l'hydrolysat décoloré.

4.1.2. Pilote d'électrodialyse

Le pilote d'électrodialyse a été conçu au laboratoire. Il comportait une cellule d'électrodialyse de type MicroFlow (Electrocell AB, Täby, Suède) possédant une surface membranaire effective de transfert de 10 cm² (**Figure 47**).

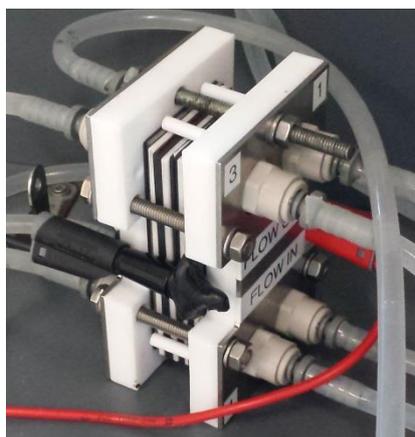


Figure 47 : Photographie de la cellule d'électrodialyse utilisée

La configuration utilisée est la configuration dite « cationique », permettant la récupération des composés chargés positivement. Un schéma de l'installation expérimentale est proposé en **Figure 48**.

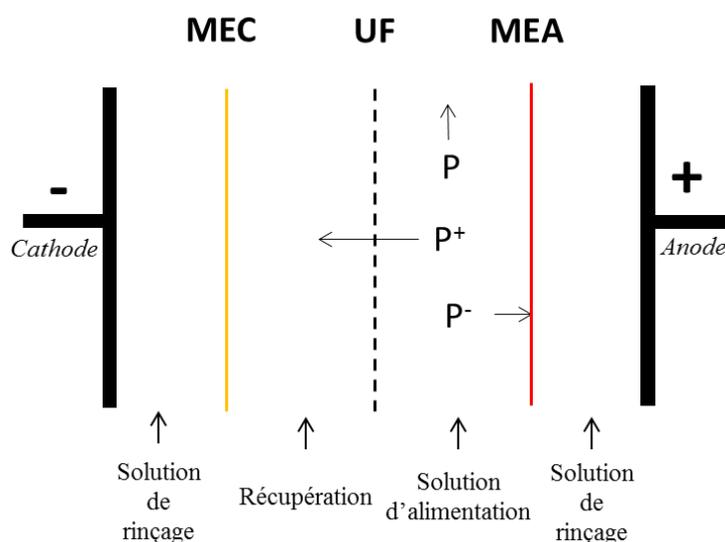


Figure 48 : Schéma de la configuration cationique de l'électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration utilisée
(MEC : membrane échangeuse de cations ; MEA : membrane échangeuse d'anions ;
UF : membrane d'ultrafiltration ; P : peptides)

Quatre compartiments sont délimités par l'empilement des membranes au sein de la cellule. Deux d'entre eux contenaient une solution d'électrolytes de Na_2SO_4 (20 g.L^{-1}). Leur rôle était d'éviter l'oxydation des électrodes due à la différence de potentiel imposée entre l'anode et la cathode. De part et d'autre de la membrane d'ultrafiltration, se situaient les compartiments de récupération (côté cathode) et contenant la solution d'alimentation (côté anode). Le compartiment de récupération était le compartiment au sein duquel migraient les composés cationiques. Il contenait initialement une solution de KCl (2 g.L^{-1}). La solution d'alimentation était représentée par l'hydrolysate décoloré. Chacun des compartiments est connecté à un réservoir extérieur à la cellule d'électrodialyse. Il assurait la recirculation des solutions après leur passage au sein de la cellule par le biais de pompes centrifuges (Iwaki, Marcoussis, France). Le débit de circulation des solutions était contrôlé de manière indépendante pour chacun des compartiments grâce à des débitmètres (Kobold Instrumentation, Cergy-Pontoise, France).

La différence de potentiel entre anode et cathode est effectuée grâce à un générateur HQ Power PS3003, allant d'un voltage de 0 à 30 V (Xantrex, Burnaby, Canada).

Concernant les membranes, celle d'ultrafiltration utilisée était composée de polyethersulfone (PES) et dotée d'un seuil de coupure de 10 KDa (HFK-131, Koch, France). La membrane échangeuse de cations était une Neosepta CMX-SB et l'échangeuse d'anions une AMX-SB (fournies par Eurodia, Pertuis, France).

4.1.3. Protocole d'étude de l'influence du degré d'hydrolyse

Tous les compartiments contenaient 500 mL de solution (Na_2SO_4 , KCl ou hydrolysate) en début de traitement.

La tension électrique choisie était de 20 V et a été maintenue constante tout au long de l'expérience. Elle permettait un champ électrique de 9 V.cm^{-1} au sein du système.

Les débits imposés aux solutions ont été de 12 L.h^{-1} pour les solutions d'électrolytes à proximité des électrodes et de 18 L.h^{-1} pour les compartiments de récupération et de solution d'alimentation.

Des relevés ont été effectués régulièrement. Ils concernaient un prélèvement d'échantillons des compartiments du KCl (récupération) et de l'hydrolysate (alimentation) pour des analyses ultérieures en CLHP-PI et en spectrométrie de masse, permettant d'une part de doser les concentrations en peptides d'intérêt et totaux, et d'autre part d'identifier les peptides

présents. Les pH et conductivités ont également été relevés au sein de ces compartiments. Enfin, l'intensité du courant électrique et le voltage ont aussi été notés.

Pour les cinq hydrolysats sélectionnés, chaque traitement d'EDUF a été réalisé en triplicata. Pour chaque nouveau DH testé, l'ensemble des membranes au sein de la cellule a été changé.

4.1.4. Protocole d'étude de l'influence du pH et de l'influence de la concentration en peptides au sein de la solution d'alimentation

Le protocole utilisé était identique à celui décrit précédemment (§4.1.3.).

Lors de l'étude de l'influence du pH, ce dernier a été maintenu constant tout au long de l'expérience dans les compartiments de récupération et de la solution d'alimentation à des valeurs de 4.7, de 6.5 et de 9 par fin ajout de HCl et de NaOH (0.1 M).

Ensuite, l'influence de la concentration de l'hydrolysat a été étudiée avec le maintien du pH ayant permis d'obtenir la plus haute teneur en α 137-141 au sein de la solution de récupération. Pour cela, des hydrolysats initiaux de cruor à des C_{HB} de 2, 5 puis 8% (p/v) ont été utilisés comme solution d'alimentation.

4.1.5. Protocole de nettoyage

Après chaque expérience, un protocole de nettoyage a été appliqué. Son intérêt résidait dans le fait d'ôter tout éventuel dépôt au sein de l'appareillage (Firdaous *et al.*, 2009). De manière successive, de l'eau (5 min), une solution de NaOH (0.1 M, 30 min), de l'eau (5 min) et une solution d'HCl (0.1 M, 30 min) ont circulé dans le système. Enfin, le pH neutre au sein des compartiments était récupéré par rinçages successifs à l'eau ultrapure.

4.1.6. Détails des calculs

Les taux de déminéralisation présentés dans cette partie ont été calculés de la manière suivante :

$$\text{Taux de déminéralisation} = \frac{\text{Conductivité}_t}{\text{Conductivité}_0} \times 100$$

où le *taux de déminéralisation* s'exprime en pourcents (%), la *Conductivité_t* est la conductivité mesurée (en mS.cm⁻¹) dans un compartiment donné à un instant donné *t* de l'expérience et la *Conductivité₀* est la conductivité mesurée (en mS.cm⁻¹) en début d'expérience au sein du même compartiment.

La pureté (ou teneur) en α137-141 est donnée par la relation suivante :

$$\text{Teneur}_{\alpha 137-141} = \frac{\text{Aire}_{\alpha 137-141}}{\text{Aire}_{\text{peptides totaux}}} \times 100$$

où les aires (exprimées en μV.S) sont mesurées en CLHP, selon les méthodes décrites dans le Chapitre 2, au sein d'un même échantillon analysé.

Le facteur d'enrichissement en α137-141, quant à lui, est exprimé selon la relation suivante :

$$\text{Facteur d'enrichissement} = \frac{\text{Teneur}_{\alpha 137-141 \text{compartiment de récupération}}}{\text{Teneur}_{\alpha 137-141 \text{hydrolysat initial}}}$$

où les teneurs en α137-141 sont calculées selon la relation précédemment donnée.

4.2. Décoloration des hydrolysats peptidiques

Les hydrolysats d'hémoglobine ou de cruor bovin dont la réaction enzymatique a été stoppée à un DH donné ne pouvaient être traités par EDUF tels quels. En effet, il a été reporté que la présence de l'hème avait une influence majeure sur le transfert peptidique observé lors du procédé séparatif (Vanhoute *et al.*, 2010). Son haut poids moléculaire et son caractère hydrophobe entraînaient des interactions hème-peptides, formant des agrégats qui s'accumulaient au niveau de la membrane d'ultrafiltration, provoquant par suite un colmatage membranaire (Lebrun *et al.*, 1998).

De plus, la présence de l'hème, responsable de la couleur rouge des hydrolysats, rendait difficile la valorisation des produits en étant issus. Également, l'hème influait sur le goût en apportant une forte amertume au produit fini.

Différentes techniques de décoloration ont déjà été abordées. La première d'entre elles faisait intervenir une précipitation de l'hème par l'utilisation de solvants organiques acidifiés tels que l'acétonitrile et l'éthanol (Tybor *et al.*, 1973). Des systèmes d'adsorption sur colonne de l'hème ont également été développés, comme par exemple sur des groupements de type carboxy-methyl-cellulose (Autio *et al.*, 1984) ou d'oxyde d'aluminium (Piot *et al.*, 1986). L'élévation de la température afin d'extraire l'hème de l'hémoglobine a elle aussi été testée (Regnier, 1983). Un couplage entre la température et l'utilisation de solvants organiques a même été envisagé (Ontiveros *et al.*, 2014). Enfin, l'emploi de procédés membranaires a également été étudié afin de retirer l'hème de l'hydrolysat (Dhulster *et al.*, 2002; Lebrun *et al.*, 1998).

Cependant, il convenait au sein de la démarche générale d'employer une technique ne faisant pas intervenir d'étapes intermédiaires lourdes de purification. Ces dernières auraient été non seulement consommatrices de temps, mais auraient aussi été irrémédiablement associées à une certaine perte de contenu peptidique de l'hydrolysat. Également, au sein d'une démarche souhaitant minimiser son impact environnemental, les utilisations de solvants organiques ou de fortes températures étaient également à proscrire.

Il a donc été préféré une technique biochimique simple et rapide consistant en un abaissement lent du pH de l'hydrolysat dont la réaction a été stoppée à un DH donné. Le pH, aux alentours de 9, est amené à 4.7 par ajout d'HCl (2 M) apporté au sein du milieu sous agitation lente (60 min^{-1}) par une pompe péristaltique à un débit de $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. En revanche, il a été crucial de ne pas effectuer un saut de pH, allant directement de 9 à 4.7. En effet, cette façon de procéder provoquait la formation d'agrégats peptides-peptides et peptides-hème et permettait de récupérer peu de peptides en solution. De plus, la décoloration s'avérait alors incomplète.

La précipitation de l'hème par abaissement du pH peut être expliquée par les ruptures des liaisons entre l'hème de l'hémoglobine et les chaînes peptidiques lorsque le pH diminue. L'hème stabilise les chaînes α et β par plusieurs liaisons hydrophobes, par le biais de résidus apolaires. L'abaissement du pH provoque une dénaturation acide de l'hémoglobine menant à la dissociation du tétramère en dimères α - β par une rupture progressive des liaisons hème-peptides (Boys *et al.*, 2007a; Boys *et al.*, 2007b; Griffith *et al.*, 2003). La dissociation est d'autant plus facile que les peptides liés à l'hème sont de faible masse moléculaire. Ceci peut expliquer

pourquoi, y compris sous forme dénaturée, l'hémoglobine non-hydrolysée ne peut être décolorée efficacement ou sans perte massive de ses chaînes.

La technique a été adoptée pour l'ensemble des DH testés. Elle a permis de maintenir les peptides en solution, tout en éliminant l'hème présent au sein des hydrolysats pour les DH de 3, 5, 10, 13 et 18%. Ces résultats sont présentés en **Figure 49**.

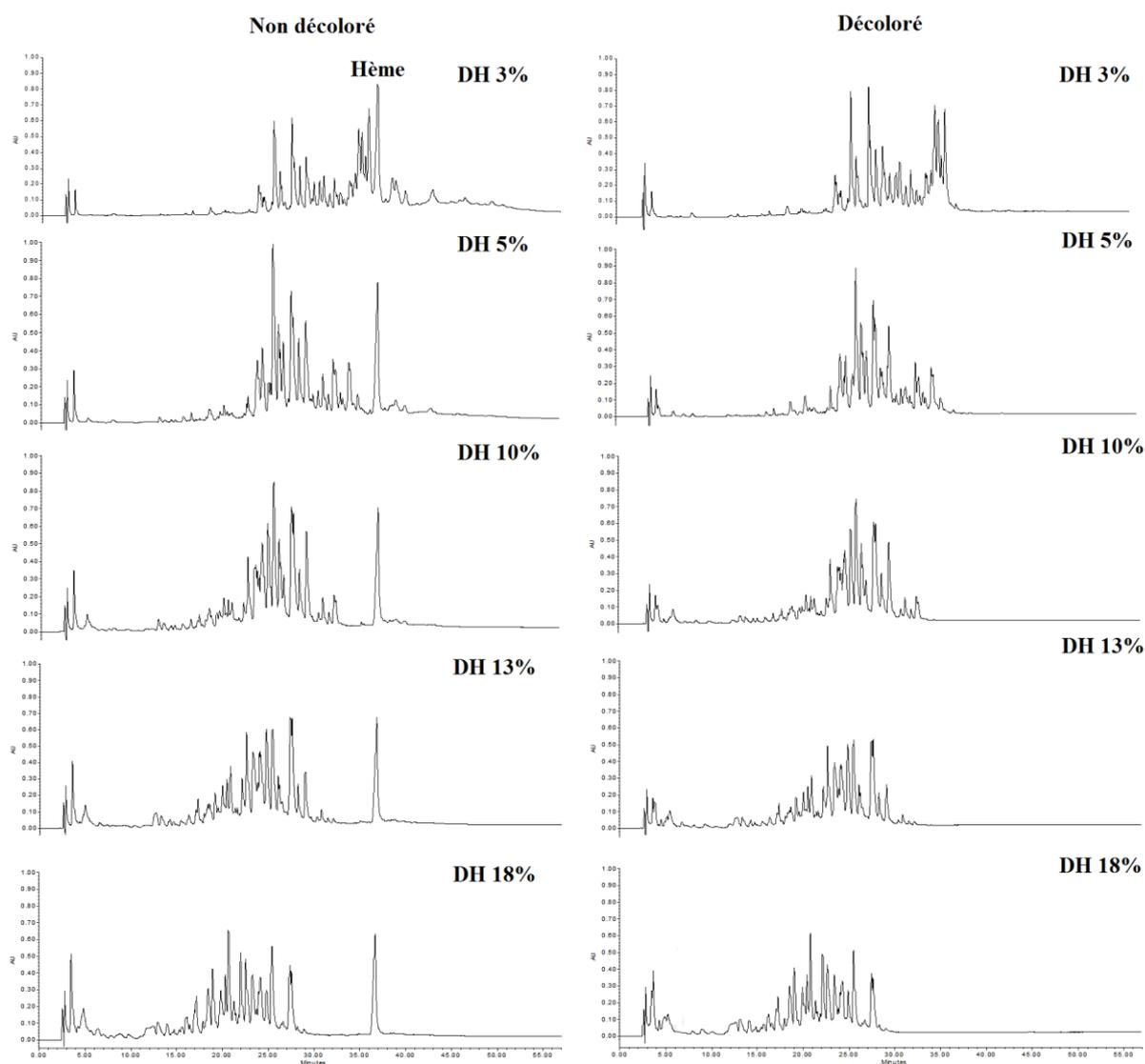


Figure 49 : Comparaisons des profils chromatographiques entre hydrolysats complets et hydrolysats décolorés à différents DH

4.3. Étude de l'influence du degré d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine sur la séparation sélective du peptide actif α 137-141

4.3.1. Étude des paramètres électrodialytiques

4.3.1.1. Conductivité et pH

Concernant le compartiment d'alimentation, la conductivité n'a pas évolué de manière significative tout au long de l'EDUF, quel que soit le DH testé (**Figure 50**). En effet, les conductivités de la solution d'alimentation sont passées de $7.63 \pm 0.45 \text{ mS.cm}^{-1}$ à $7.26 \pm 0.24 \text{ mS.cm}^{-1}$ pour le DH de 3%, de 7.58 ± 0.16 à $10.16 \pm 0.46 \text{ mS.cm}^{-1}$ pour le DH de 5%, de $10.73 \pm 0.67 \text{ mS.cm}^{-1}$ à $11.44 \pm 0.80 \text{ mS.cm}^{-1}$ pour le DH de 10%, de $10.26 \pm 1.29 \text{ mS.cm}^{-1}$ à $9.88 \pm 0.94 \text{ mS.cm}^{-1}$ pour le DH de 13% et de 8.57 ± 1.11 à $8.92 \pm 0.22 \text{ mS.cm}^{-1}$ pour le DH de 18%.

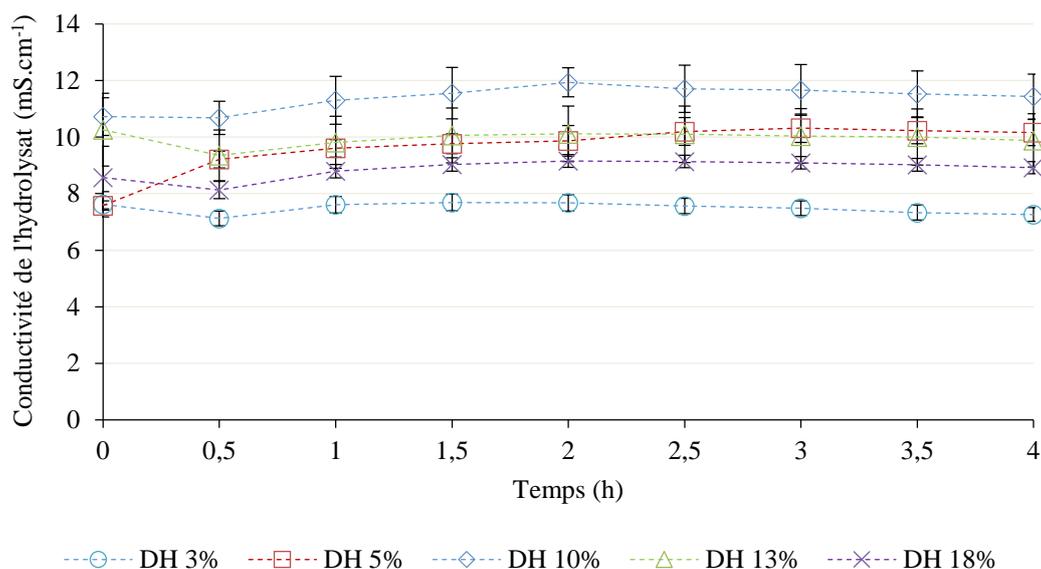


Figure 50 : Évolution des conductivités au sein du compartiment de l'hydrolysat d'hémoglobine bovine (1%, p/v) au cours de l'EDUF

Dû au pouvoir tampon des peptides et à la concentration protéique de l'hydrolysat utilisée de 1% (p/v), le pH n'évoluait pas de manière significative au sein du compartiment d'alimentation et conservait une valeur moyenne proche de celle de l'hydrolysat décoloré pour toute la durée de l'expérience, à savoir 4.7.

À l’opposé, la conductivité au sein du compartiment de récupération diminuait tout au long de l’EDUF, quel que soit le DH testé (**Figure 51**).

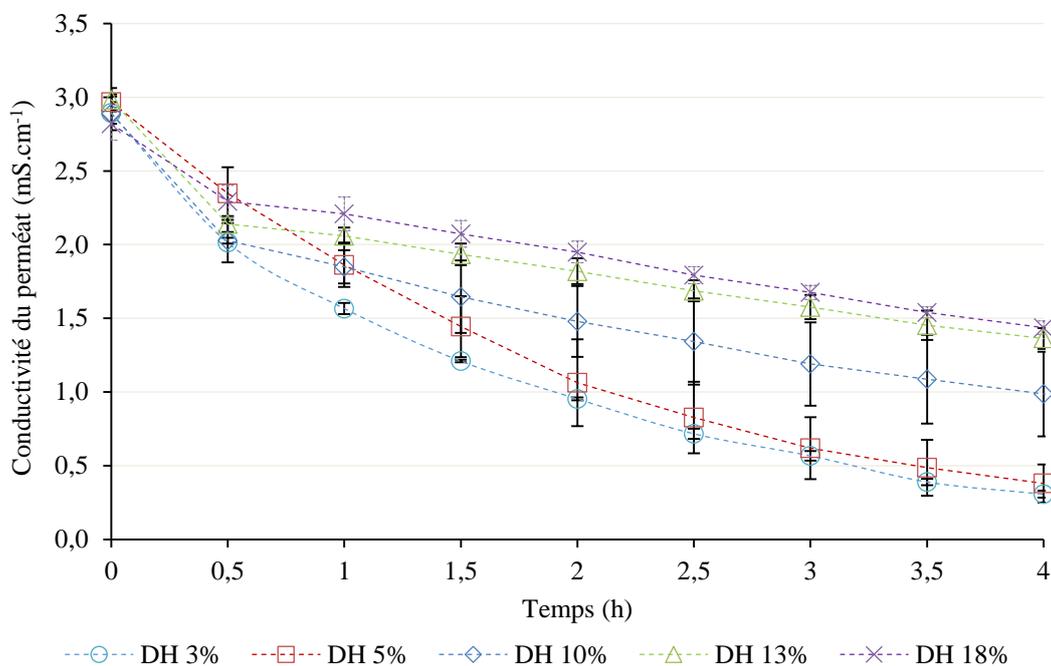


Figure 51 : Évolution des conductivités au sein de la solution de récupération selon la séparation de différents degrés d'hydrolyse d'hémoglobine bovine (1%, p/v) par EDUF

Il est tout d’abord à noter que la baisse de la conductivité au sein du compartiment de récupération était en accord avec la configuration de cellule d’électrodialyse utilisée. En effet, les ions K^+ ont migré de la solution de KCl vers la cathode, en passant au travers de la membrane échangeuse de cations. Quant à eux, les ions Cl^- ont migré de la solution de récupération des peptides vers l’anode, au travers des membranes d’ultrafiltration et celle échangeuse d’anions, ce qui est représenté de manière schématique en **Figure 52**.

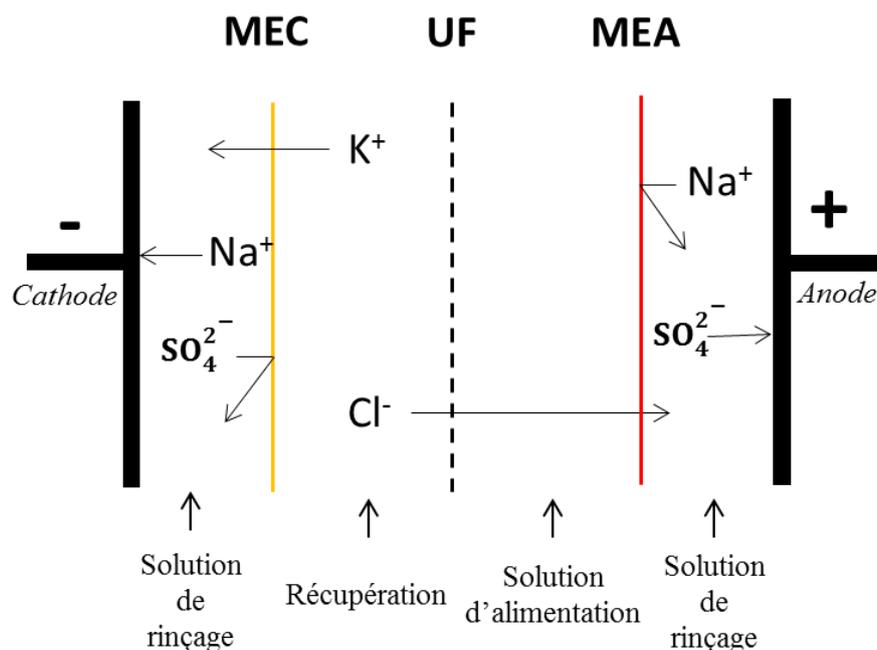


Figure 52 : Représentation schématique de la migration ionique de la solution de récupération au cours de l'EDUF en configuration cationique

Pour l'ensemble des DH testés, le compartiment de récupération contenait initialement une solution de KCl à 2 g.L^{-1} d'où une conductivité initiale dans le compartiment de récupération identique pour chacun des DH testés, soit environ 3 mS.cm^{-1} . Cependant, l'évolution durant les 4 heures d'électrodialyse et la conductivité finale étaient différentes selon le DH testé, ce qui est observable en Figure 51. D'une manière globale, il pouvait être constaté que la conductivité diminuait davantage avec un DH faible qu'avec un DH élevé. Ceci équivalait à dire que le taux de déminéralisation de la solution de KCl était d'autant plus important avec un DH faible plutôt qu'avec un DH élevé en fonction du temps. Par conséquent, les taux de déminéralisation les plus élevés ont été observés pour les hydrolysats à des DH de 3 et 5% avec des taux de 89.40 ± 0.83 et de $87.25 \pm 4.09\%$, respectivement. Quant aux hydrolysats de DH de 18%, ils présentaient le plus faible taux de déminéralisation à 4 heures d'EDUF, soit $49.00 \pm 2.01\%$, proche de celui constaté pour le DH de 13% ($54.32 \pm 1.68\%$). Le DH de 10% se situait de manière intermédiaire, avec un taux de déminéralisation de $66.63 \pm 11.02\%$.

De plus, pour l'ensemble des DH testés, la déminéralisation s'est effectuée en deux étapes. La première, rapide, était suivie d'une seconde phase, plus lente. Également, cette seconde phase n'apparaissait pas au même temps de traitement d'électrodialyse selon le DH testé. En effet, pour les DH de 10, 13 et 18%, la conductivité au sein du compartiment de récupération diminuait rapidement durant les 30 premières minutes avec une pente moyenne de

-1.48 mS.cm⁻¹.h⁻¹. Elle passait alors de 2.89 ± 0.07 mS.cm⁻¹ à 2.03 ± 0.02 mS.cm⁻¹ pour le DH de 10%, de 2.98 ± 0.08 mS.cm⁻¹ à 2.14 ± 0.05 mS.cm⁻¹ pour le DH de 13% et de 2.82 ± 0.11 mS.cm⁻¹ à 2.29 ± 0.11 mS.cm⁻¹ pour le DH de 18% en seulement 30 min. Ensuite, la conductivité diminuait plus doucement avec une pente moyenne de déminéralisation de -0.26 mS.cm⁻¹.h⁻¹ durant les 3h30 suivantes d'expérience. Les conductivités au sein de la solution de récupération passaient ainsi de 2.03 ± 0.02 mS.cm⁻¹ à 0.99 ± 0.29 mS.cm⁻¹ pour le DH de 10%, de 2.14 ± 0.05 mS.cm⁻¹ à 1.36 ± 0.07 mS.cm⁻¹ pour le DH de 13% et de 2.29 ± 0.11 mS.cm⁻¹ à 1.44 ± 0.04 mS.cm⁻¹ pour le DH de 18%, entre 30 min et 4 heures d'électrodialyse. Pour les DH faibles, de 3 et de 5%, la seconde étape de déminéralisation commençait respectivement après 1 heure et 30 min d'expérience, avec des pentes moyennes respectives de -0.48 et de -0.56 mS.cm⁻¹.h⁻¹. La conductivité au sein du compartiment de récupération pour le DH de 3% diminuait ainsi de 2.89 ± 0.07 mS.cm⁻¹ à 1.57 ± 0.04 mS.cm⁻¹ en 1 heure, puis jusqu'à 0.31 ± 0.02 mS.cm⁻¹ aux 4 heures d'expérience. Quant à lui, le DH de 5% observait une diminution de sa conductivité de 2.97 ± 0.05 mS.cm⁻¹ à 2.35 ± 0.18 mS.cm⁻¹ durant la première demi-heure d'expérience, pour atteindre une valeur de 0.38 ± 0.13 mS.cm⁻¹ au terme des 4 heures d'électrodialyse.

L'évolution de la baisse de conductivité au sein du compartiment de récupération en deux étapes était due au fait que la densité de courant limite était atteinte et dépassée durant l'expérience, ce qui a été précédemment décrit à plusieurs reprises (Doyen *et al.*, 2014; Firdaus *et al.*, 2009; Labbé *et al.*, 2006). Ce phénomène est provoqué par la densité de courant, élevée au sein du système. Le flux ionique augmente alors plus rapidement à l'interface solution/membrane jusqu'à ce que la concentration en contre-ions devienne nulle, décrivant ainsi la valeur de densité de courant limite (Strathmann, 1981). Au-delà de celle-ci, la quantité de contre-ions pouvant transporter le courant électrique au travers des membranes échangeuses d'ions est insuffisante, ce qui donne lieu à la dissociation des molécules d'eau H₂O en H⁺ et OH⁻, phénomène également nommé autoprotolyse de l'eau. Ceci a principalement lieu du côté hydrolysate de la membrane échangeuse d'anions et sur le côté solution de KCl de la membrane échangeuse de cations (Labbé *et al.*, 2006; Tanaka, 2002).

Au sein de la configuration cationique de la cellule d'électrodialyse utilisée et compte-tenu de la forte déminéralisation au sein du compartiment de récupération, le phénomène de dissociation de l'eau a principalement eu lieu au niveau de l'interface de la membrane échangeuse de cations avec la solution de récupération. En effet, le pH de l'hydrolysate est resté stable tout au long des expériences (environ 4.7), ce qui n'a pas été le cas de la solution de KCl pour l'ensemble des DH étudiés (**Figure 53**).

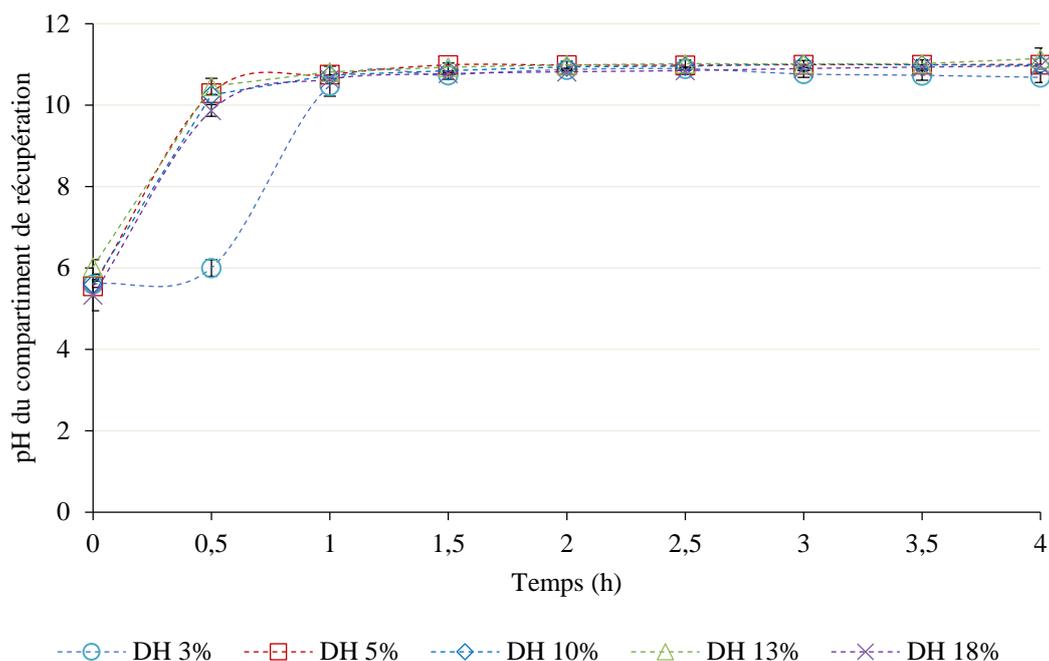


Figure 53 : Évolution du pH au sein du compartiment de récupération selon la séparation de différents degrés d'hydrolyse d'hémoglobine bovine (1%, p/v) par EDUF

L'apparition des ions OH^- à l'interface de la membrane échangeuse de cations au sein du compartiment de récupération a provoqué une rapide augmentation du pH au sein du compartiment de récupération. Après 30 min, pour les DH égaux ou supérieurs à 5%, le pH a augmenté à des valeurs supérieures à 10 pour une valeur initiale d'environ 5.5, correspondant au pH initial d'une solution de KCl à 2 g.L^{-1} . Toutefois, pour le DH de 3% uniquement, le pH a atteint une valeur supérieure à 10 après 1 heure d'électrodialyse au lieu de 30 min. Ceci était en accord avec les résultats précédemment trouvés pour l'apparition de la seconde phase de déminéralisation.

Plus précisément, de par la production d'ions OH^- au sein du compartiment de récupération, le pH de la solution de KCl a augmenté. De plus, la création d'espèces ioniques aurait dû également provoquer une augmentation de sa conductivité, ce qui n'a pas été le cas ici (**Figure 51**). En fait, les OH^- générés au sein du compartiment de récupération ont compensé la migration des K^+ et des Cl^- le quittant respectivement pour la solution d'électrolytes et l'hydrolysate. Ceci est expliqué par la mobilité électrophorétique des OH^- ($20.5 \times 10^{-8} \text{ m}^2.\text{V}^{-1}.\text{S}^{-1}$), très largement supérieure à celles des Cl^- ($7.95 \times 10^{-8} \text{ m}^2.\text{V}^{-1}.\text{S}^{-1}$) et des K^+ ($7.61 \times 10^{-8} \text{ m}^2.\text{V}^{-1}.\text{S}^{-1}$) (Bazinet et Castagné, 2011; Labbé et Bazinet, 2006). De ce fait, la génération des OH^- a permis de baisser la vitesse de déminéralisation due à la migration des K^+ et des Cl^- lors de la seconde phase, comme schématisé en **Figure 54**.

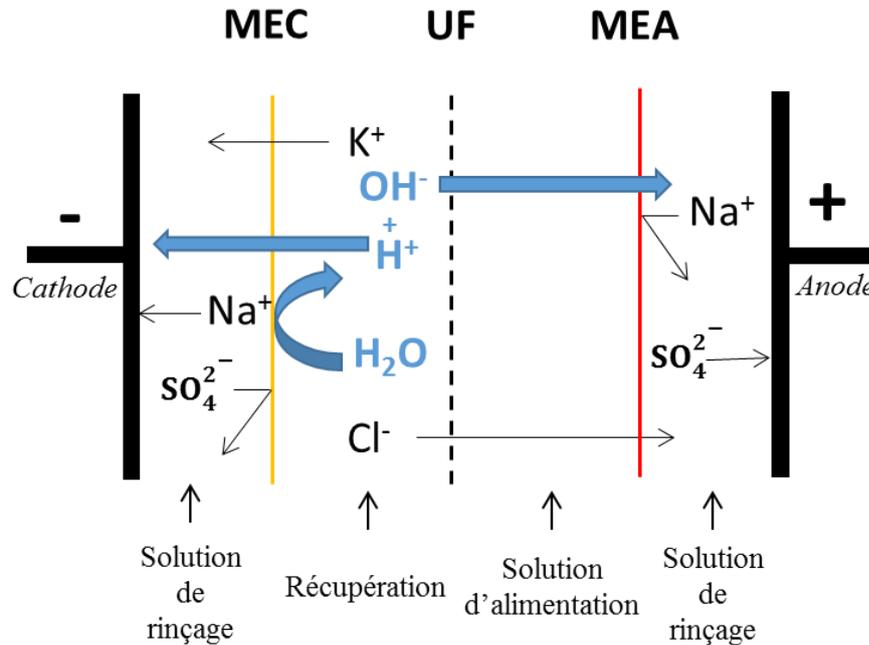


Figure 54 : Représentation schématique de la migration ionique après dépassement de la densité de courant limite au sein de la solution de récupération au cours de l'EDUF en configuration cationique

Par conséquent, ceci a permis d'expliquer la diminution plus importante de la conductivité au sein du compartiment de récupération avec le DH de 3%, en comparaison des autres DH testés. À ce faible DH, la densité de courant limite est retardée (apparition à 1 heure), retardant également la dissociation des molécules d'eau. À un degré moindre, ceci s'appliquait aussi au DH de 5%, puisque la diminution de pente n'était constatée qu'après une première phase de déminéralisation de 30 min, et non de manière si rapide durant les 30 premières minutes comme observé pour les DH de 10, 13 et 18%.

Le temps différent d'apparition de la densité de courant limite selon les DH pourrait être expliqué par la diversité de la population peptidique et/ou le colmatage membranaire. En effet, l'élévation du DH a permis de générer davantage de peptides capables de migrer du compartiment d'alimentation vers celui de récupération, de par le fait qu'ils étaient de masses moléculaires plus faibles, facilitant ainsi leur potentiel migratoire. Ainsi, la migration ionique à partir du compartiment de récupération s'effectuerait moins rapidement du fait que les peptides côté hydrolysate de la membrane d'ultrafiltration seraient en compétition avec la migration des ions en contre-sens (c'est-à-dire provenant de la solution de KCl). De plus, la présence d'une population plus nombreuse de petits peptides à DH élevés augmenterait la probabilité d'interaction peptides-peptides ou peptides-membrane que ce soit avec les membranes échangeuses d'ions ou la membrane d'ultrafiltration.

L'étude de ces premiers résultats, concernant les paramètres de conductivité et de pH, a démontré que le DH influait sur la migration ionique. Ils ont donc montré que la plus forte migration ionique s'effectuait à des DH faibles, comme ceux de 3 ou de 5%.

4.3.1.2. Intensité du courant et résistance apparente du système

Avec l'application d'un voltage constant tout au long de la durée de l'électrodialyse (fixé à 20 V), l'intensité du courant électrique diminuait tout au long des quatre heures de traitement (**Figure 55**).

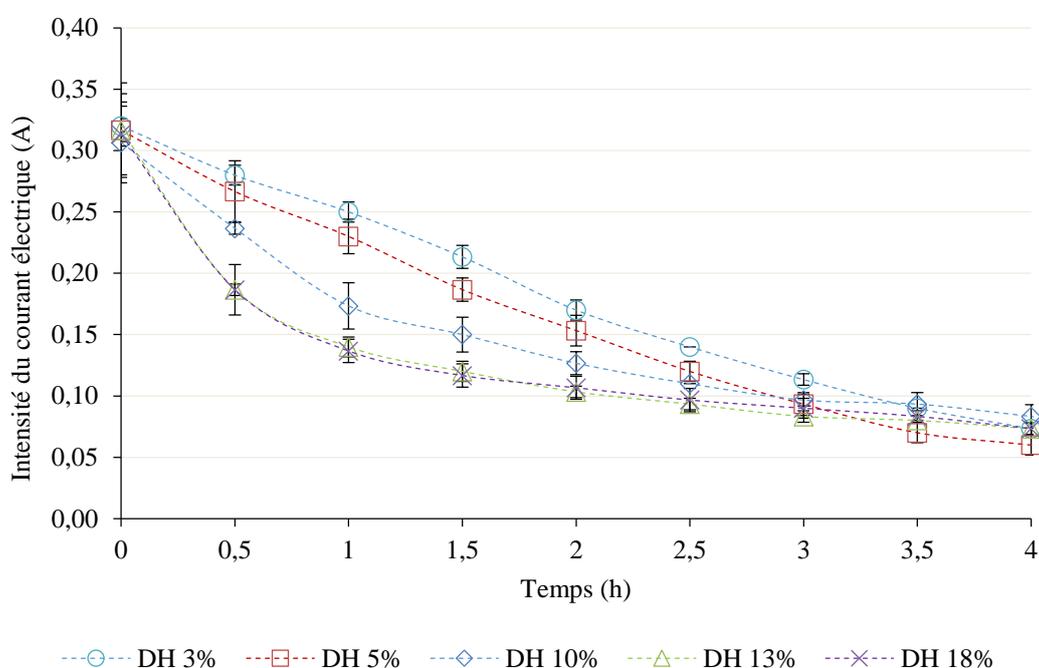


Figure 55 : Évolution de l'intensité du courant électrique au sein de la cellule d'EDUF lors de la séparation de différents degrés d'hydrolyse d'hémoglobine bovine (1%, p/v)

Conformément à la loi d'Ohm, pour laquelle :

$$U = R.I$$

où U étant la tension électrique appliquée (V), R la résistance du système (Ω) et I l'intensité du système (A), la résistance du système augmentait tout au long de la durée de l'expérience. Si les résistances du système étaient similaires en début d'expérience pour tous les DH testés (environ 64.5 Ω) et en fin d'expérience (environ 250 Ω), l'intensité du courant électrique diminuait plus rapidement pour les hauts DH. Des résistances de $142.86 \pm 10.20 \Omega$ ont été

observées pour les DH de 13 et 18% après 1 heure de traitement. Pour les DH de 3 et 5%, des valeurs de $80.00 \pm 3.20 \Omega$ et de $86.96 \pm 3.78 \Omega$ ont été enregistrées pour le même temps, soit des valeurs jusqu'à 1.8 fois inférieures. Ces résultats ont confirmé les résultats précédents obtenus pour l'étude de la conductivité au sein du KCl et ont permis ainsi de conclure sur l'apparition du phénomène d'autoprotolyse de l'eau.

Due à l'augmentation de la résistance apparente du système au sein de la cellule d'EDUF, la densité de courant limite a été atteinte de manière plus précoce avec un DH avancé, produisant ainsi de manière plus rapide les ions OH^- du côté solution KCl de la membrane échangeuse de cations. Ces résultats pourraient également montrer l'avancement de l'encrassement des membranes au cours du temps. En effet, comme mentionné précédemment, la population peptidique était plus nombreuse et de plus petite taille à DH élevés. Par ailleurs, avec un DH élevé, davantage de peptides étaient capables de migrer vers le compartiment de récupération. Ainsi, la population peptidique qui interagissait avec le côté hydrolysate de la membrane d'ultrafiltration était plus importante. Par conséquent, la résistance apparente du système augmentait plus rapidement au cours de l'EDUF lors de la séparation d'un hydrolysate à DH élevé plutôt qu'à DH faible. Par ailleurs, il a été reporté que des interactions de type peptide-peptide pouvaient affecter les capacités de transfert de la membrane (Lebrun *et al.*, 1998). De plus, en accord avec de précédents travaux (Roblet *et al.*, 2013), la membrane d'ultrafiltration en polyethersulfone a acquis des charges négatives à sa surface, dû principalement au pH mesuré au sein de la solution de KCl (supérieur à 10) et à la configuration cationique utilisée de la cellule d'EDUF. Ceci pourrait également expliquer l'augmentation de la résistance du système à DH élevés, du fait d'interactions électrostatiques entre peptides chargés positivement et membrane chargée négativement (Gourley *et al.*, 1995; Gourley *et al.*, 1998; Roblet *et al.*, 2013).

4.3.2. Influence du degré d'hydrolyse sur la migration peptidique totale

La **Figure 56** présente les profils chromatographiques des solutions de récupération après 4 heures d'EDUF selon les cinq DH testés.

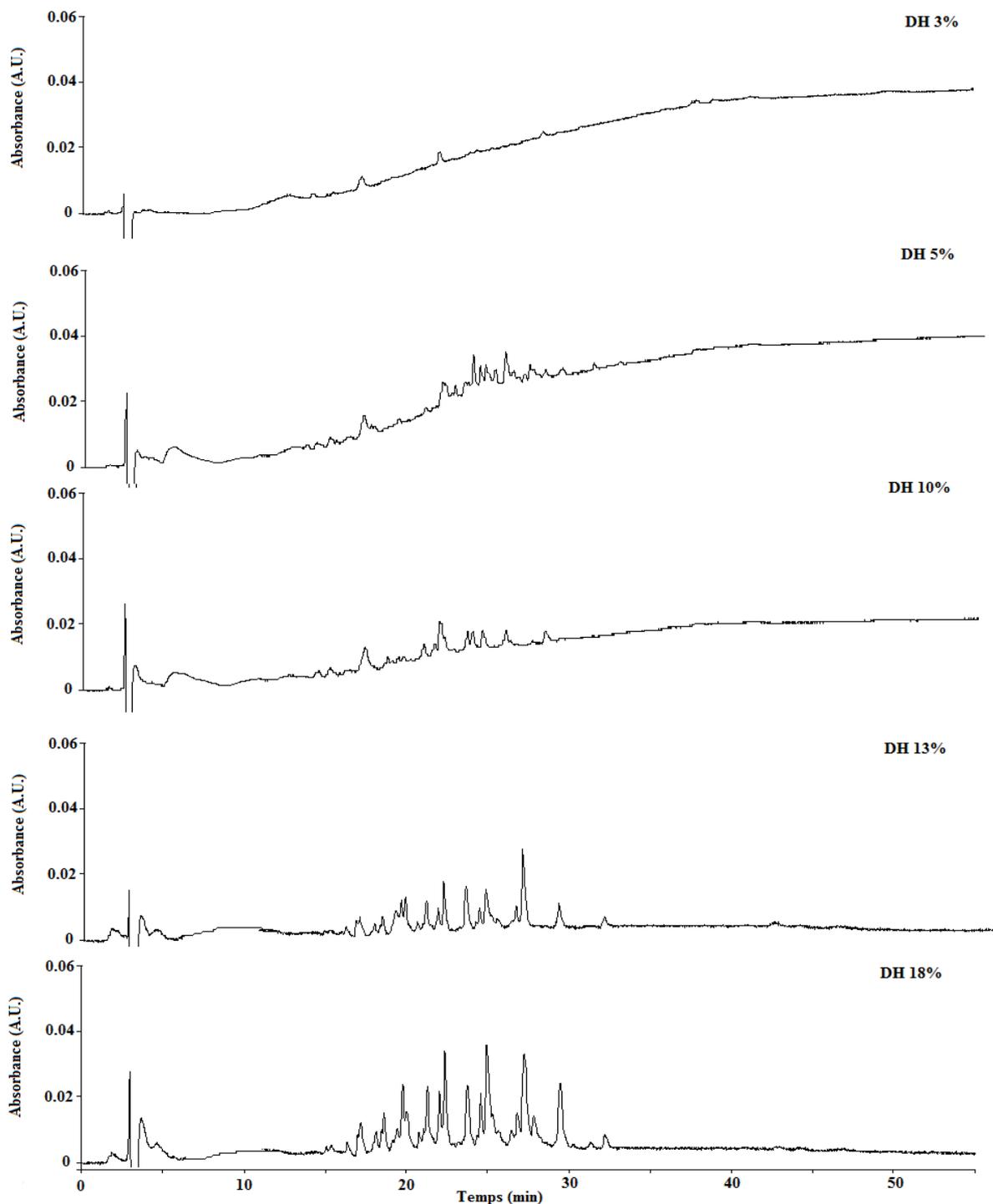


Figure 56 : Profils chromatographiques du compartiment de récupération après 4 heures de séparation en EDUF selon différents degrés d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine (1%, p/v)

Pour l'hydrolysats avec un DH de 3%, la migration peptidique a été la moins importante. Il pouvait être supposé que la migration des peptides au travers de la membrane d'ultrafiltration fût gênée par la présence des chaînes α et β au sein de l'hydrolysats. Leur présence au sein de l'hydrolysats pouvait être responsable de la faible migration peptidique de la solution d'alimentation vers la solution de récupération par interaction avec les peptides. De plus, à ce DH, la quantité de peptides générés était la plus faible. En effet, l'identification en LC-MS/MS a montré que seulement 4 peptides sur un hydrolysats initial composé de 78 séquences identifiées étaient retrouvés au sein de la solution de KCl pour le DH de 3%. De plus, 3 des 4 peptides identifiés avaient une masse moléculaire comprise entre 501 et 1000 Da, comme l'indique le **Tableau 14**.

Tableau 14 : Répartition des masses moléculaires (Da) des peptides ayant migré au sein du KCl après 4 heures d'EDUF lors de la séparation d'hydrolysats d'hémoglobine bovine (1%, p/v) selon différents degrés d'hydrolyse

DH (%)		3	5	10	13	18
Gamme de masses moléculaires (Da)	< 500	0	1	2	1	0
	501 to 1000	3	10	9	9	16
	1001 to 1500	0	5	3	3	10
	1501 to 2000	1	0	3	4	3
	> 2001	0	0	0	0	0
	Total	4	16	17	17	29

L'identification de ces 4 peptides a permis de confirmer que leur migration était en accord avec la cellule d'EDUF utilisée (**Tableau 15**).

Tableau 15 : Séquences peptidiques identifiées au sein du compartiment de récupération lors de la séparation par EDUF de l'hydrolysats d'hémoglobine bovine (1%, p/v) à un DH de 3%

Position	Séquence	Masse moléculaire (Da)	pH _i
α 137-141	TSKYR	653	10.50
α 99-105	KLLSHSL	796	9.91
α 99-106	KLLSHSLL	909	9.91
α 33-46	FLSFPTTKTYFPHF	1732	8.88

Lorsque le DH augmentait, la population de peptides ayant migré au sein du compartiment de récupération était également plus importante.

L'hydrolysate de départ à un DH de 5% comportant 101 séquences identifiées, un nombre de 16 séquences a été retrouvé au sein de la solution de KCl après 4 heures d'EDUF (**Tableau 16**). Sur ce total, 10 faisaient partie de la gamme de masses comprises entre 501 et 1000 Da.

Tableau 16 : Séquences peptidiques identifiées au sein du compartiment de récupération lors de la séparation par EDUF de l'hydrolysate d'hémoglobine bovine (1%, p/v) à un DH de 5%

Position	Séquence	Masse moléculaire (Da)	pHi
α 41-43	TYF	429	5.50
α 129-134	LANVST	603	5.50
α 137-141	TSKYR	653	10.50
α 122-127	HASLDK	668	7.56
α 103-109	KLLGNVL	756	9.91
α 136-141	LTSKYR	766	10.47
α 99-105	KLLSHSL	796	9.91
α 135-141	VLTSKYR	865	10.46
α 99-106	KLLSHSL	909	9.91
β 130-139	QKVVAGVANAL	956	8.88
α 134-141	TVLTSKYR	967	10.40
β 32-40	VVYPWTQRF	1195	9.81
α 37-46	PTTKTYFPHF	1238	10.09
β 114-124	ARNFGKEFTPV	1265	10.18
β 31-40	LVVYPWTQRF	1308	9.83
α 129-141	LANVSTVLTSKYR	1451	10.47

L'hydrolysate décoloré d'un DH de 10% possédait 132 séquences identifiées, comprises entre 501 et 1000 Da pour 75 d'entre elles. Au sein de la solution de récupération, il s'agissait majoritairement de peptides au sein de cette gamme de masses qui ont été retrouvés pour 9 des 17 séquences identifiées au total (**Tableau 17**).

Tableau 17 : Séquences peptidiques identifiées au sein du compartiment de récupération lors de la séparation par EDUF de l'hydrolysate d'hémoglobine bovine (1%, p/v) à un DH de 10%

Position	Séquence	Masse moléculaire (Da)	pH _i
α41-43	TYF	429	5.50
β91-94	CDKL	478	5.92
α137-141	TSKYR	653	10.50
α100-106	LLSHSL	668	7.81
β129-134	FQKVVA	690	9.88
α119-125	PAVHASL	693	8.26
α7-13	KAAVTAF	706	9.91
α100-106	LLSHSLL	782	7.81
α99-105	KLLSHSL	796	9.91
α7-14	KAAVTAFW	893	9.91
α99-106	KLLSHSLL	909	9.91
β34-40	YPWTQRF	996	9.57
β32-40	VVYPWTQRF	1195	9.81
β114-124	ARNFGKEFTPV	1265	10.18
β31-40	LVVYPWTQRF	1308	9.83
α34-46	LSFPTTKTYFPHF	1585	9.74
α66-80	LTKAVEHLDDLPGAL	1591	4.70

La séparation de l'hydrolysats d'un DH de 13% a permis de retrouver également cette tendance puisqu'après séparation, 9 séquences identifiées sur 17 retrouvées au sein de la solution de récupération étaient entre 501 à 1000 Da (**Tableau 18**). L'hydrolysats initial, quant à lui, possédait un total de 155 peptides dont 91 se situaient dans cette gamme de masses.

Tableau 18 : Séquences peptidiques identifiées au sein du compartiment de récupération lors de la séparation par EDUF de l'hydrolysats d'hémoglobine bovine (1%, p/v) à un DH de 13%

Position	Séquence	Masse moléculaire (Da)	pH _i
α 41-43	TYF	429	5.50
β 9-13	AVTAF	507	5.50
α 121-125	FTPVL	575	5.50
α 137-141	TSKYR	653	10.50
β 102-108	FKLLGNV	789	9.88
β 140-145	LAHRYH	795	9.83
α 99-105	KLLSHSL	796	9.91
β 114-120	ARNFGKE	820	10.18
β 102-109	FKLLGNVL	903	8.88
α 99-106	KLLSHSLL	909	9.91
β 32-40	VVYPWTQRF	1195	9.81
β 31-40	LVVYPWTQRF	1308	9.83
β 114-125	ARNFGKEFTPVL	1378	8.88
α 34-46	LSFPTTKTYFPHF	1585	9.74
α 66-80	LTKAVEHLDDLPGAL	1591	4.70
α 110-125	ASHLPSDFTPAVHASL	1649	6.04
α 47-66	DLSHGSAQVKGHGAKVAAAL	1916	9.97

Le nombre maximal de séquences identifiées au sein de la solution KCl a été relevé pour la séparation de l'hydrolysate avec un DH de 18%. Un nombre de 29 séquences peptidiques a ainsi pu être identifié comme ayant migré au travers de la membrane d'ultrafiltration (**Tableau 19**). Majoritairement, les peptides récupérés étaient, une nouvelle fois, dans la gamme de masses moléculaires comprise entre 501 et 1000 Da, soit 16 peptides sur un total de 29. Il est à noter que sur un total de 162 séquences identifiées, l'hydrolysate initial à un DH de 18% comportait 110 séquences au sein de cette gamme de masses.

Tableau 19 : Séquences peptidiques identifiées au sein du compartiment de récupération lors de la séparation par EDUF de l'hydrolysate d'hémoglobine bovine (1%, p/v) à un DH de 18%

Position	Séquence	Masse moléculaire (Da)	pH _i
β9-13	AVTAF	507	5.50
α101-105	LSHSL	555	7.81
β102-106	FKLLG	576	9.88
β103-108	KLLGNV	642	9.91
α137-141	TSKYR	653	10.50
α99-104	KLLSHS	683	9.91
α7-13	KA AVTAF	706	9.91
α103-109	KLLGNVL	756	9.91
α100-106	LLSHSL	782	7.81
α99-105	KLLSHSL	796	9.91
α67-73	TKAVEHL	796	7.50
β131-139	KVVAGVANA	828	9.91
β102-109	FKLLGNVL	903	8.88
α99-106	KLLSHSL	909	9.91
α66-73	LTKAVEHL	910	7.80
α40-46	KTYFPHF	966	9.55
α38-46	TTKTYFPHF	1139	9.45
α12-23	AAWGKVGGHAAE	1153	7.86
β32-40	VVYPWTQRF	1195	9.81
β135-145	GVANALAHRYH	1208	9.83
α56-66	KGHGAKVAAAL	1232	10.69
α37-46	PTTKTYFPHF	1238	10.09
β31-40	LVVYPWTQRF	1308	9.83
β74-84	MKHLDDLKGT	1320	7.55
β114-125	ARNFGKEFTPVL	1378	8.88
α87-98	HAHKL RVD PVNF	1432	9.87
α110-125	ASHLPSDFTPAVHASL	1649	6.04
α47-64	DLSHGSAQVKGHGAKVAA	1733	9.97
α47-66	DLSHGSAQVKGHGAKVAAAL	1916	9.97

De plus, les concentrations en peptides relevées au sein du compartiment de récupération étaient en accord avec le nombre de peptides retrouvés. Pour cela, la **Figure 57** présente l'évolution de la concentration totale en peptides pendant les quatre heures de traitement d'EDUF selon les cinq DH testés.

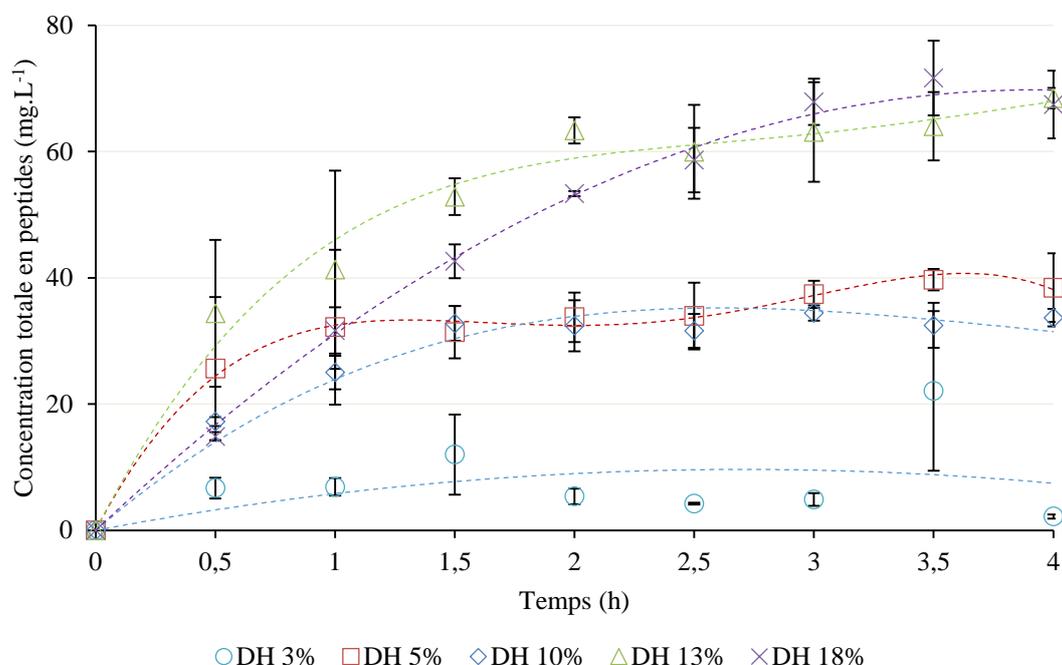


Figure 57 : Évolution de la concentration peptidique totale au sein du compartiment de récupération durant 4 heures d'EDUF pour la séparation d'hydrolysats d'hémoglobine bovine (1%, p/v) selon différents degrés d'hydrolyse

Après 4 heures d'EDUF, les concentrations en peptides relevées dans le compartiment de récupération ont été les plus élevées avec les DH de 13 et de 18%, pour des valeurs de 68.48 ± 1.62 et 67.43 ± 5.36 mg.L⁻¹, respectivement. Suivait ensuite le DH de 10% (33.68 ± 1.40 mg.L⁻¹), proche de celui de 5% (38.45 ± 5.46 mg.L⁻¹). Enfin, la plus faible concentration en peptides au sein du compartiment de récupération a été retrouvée lors de la séparation de l'hydrolysats à un DH de 3% (2.19 ± 0.32 mg.L⁻¹). Également, il a été constaté que plus le DH était élevé, plus la tendance de migration des peptides durant les 4 heures d'EDUF apparaissait comme linéaire. Ceci pouvait être mis en relation avec le **Tableau 14**, indiquant que les peptides avec une masse moléculaire entre 501 et 1000 Da avaient migré davantage que les autres peptides. Avec l'appui du **Tableau 8**, il a été constaté que les peptides dans cette gamme de masses étaient majoritaires et que leur nombre augmentait également avec la progression du DH. Ceci induisait la disparition progressive des peptides de haute masse moléculaire

(> 2000 Da) au cours de la réaction enzymatique. Les plus petits peptides (< 1000 Da) pouvaient ainsi moins interagir avec les peptides de grande masse moléculaire, leur permettant de migrer davantage au travers de la membrane d'ultrafiltration à un DH élevé. Dans ce cas, le nombre de peptides pouvant migrer était supérieur à celui d'un DH faible. La migration pour un petit peptide donné (< 1000 Da) serait donc effectuée de manière plus compétitive à un DH élevé plutôt qu'à un DH faible, due au nombre de peptides en présence au sein de l'hydrolysats.

4.3.3. Influence du degré d'hydrolyse sur la migration du peptide actif α 137-141

Aux conditions d'hydrolyse utilisées, le mécanisme d'hydrolyse était de type *zipper*. Cependant, l' α 137-141 étant un peptide final aux conditions d'hydrolyse étudiées (Dubois *et al.*, 2005), sa concentration augmentait tout au long de l'hydrolyse. Pour rappel, le **Tableau 20** détaille l'ensemble des concentrations initialement présentes dans les cinq hydrolysats de départ. Également, il résume les différentes mesures de pureté et de transport peptidique pour le peptide actif α 137-141.

Tableau 20 : Tableau récapitulatif de la migration de l' α 137-141 après 4 heures d'EDUF

DH (%)	3	5	10	13	18
C_{α137-141}(hydrolysats) (mg.L⁻¹)	36.85 ± 5.53a	74.10 ± 9.90b	81.28 ± 11.70b	85.32 ± 11.78bc	98.91 ± 11.93c
C_{α137-141}(récupération) (mg.L⁻¹)	0.00 ± 0.00a	5.33 ± 0.34b	3.43 ± 1.32c	4.64 ± 0.44c	1.34 ± 0.17d
Teneur α137-141 (hydrolysats) (%)	0.37 ± 0.05a	0.74 ± 0.10b	0.81 ± 0.12bc	0.85 ± 0.12bc	0.99 ± 0.12c
Teneur α137-141 (récupération) (%)	0.00 ± 0.00a	10.27 ± 0.96b	6.61 ± 2.34c	4.25 ± 0.42cd	1.20 ± 0.14d
Transport α137-141 (g.m⁻².h⁻¹)	0.00 ± 0.00a	0.67 ± 0.04b	0.43 ± 0.17c	0.58 ± 0.06d	0.17 ± 0.02e
Facteur d'enrichissement	0.00 ± 0.00a	13.86 ± 1.30b	8.13 ± 2.88c	4.98 ± 0.50d	1.21 ± 0.15e

Les moyennes ne partageant pas les mêmes lettres (a-e) au sein d'une même ligne sont significativement différentes.

La concentration en α 137-141 fut la plus faible au sein du compartiment de récupération pour la séparation de l'hydrolysats à un DH de 3% : aucune concentration significative n'y a été mesurée à 4 heures d'expérience. Pour les DH supérieurs à 3%, le transfert d' α 137-141 fut le

moins important avec l'hydrolysate à un DH de 18% ($0.17 \pm 0.04 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$). Par conséquent, bien que la concentration en $\alpha^{137-141}$ au sein de l'hydrolysate était la plus importante à ce DH, aucun facteur d'enrichissement (1.21 ± 0.15) n'a été observé lors de cette séparation. En revanche, l'hydrolysate à un DH de 5% présentait le plus important transfert d' $\alpha^{137-141}$ durant les 4 heures d'expérience, avec une valeur de $0.67 \pm 0.04 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$, ce qui correspondait à une valeur 4 fois supérieure à celle observée avec un DH de 18%. Le facteur d'enrichissement en $\alpha^{137-141}$ au sein du compartiment de récupération observé avec le DH de 5% était alors supérieur à 13 en comparaison de l'hydrolysate initial. Avec des facteurs d'enrichissement égaux respectivement à 8.13 ± 2.88 et 4.98 ± 0.50 pour les DH de 10 et 13%, il a été constaté que l'enrichissement en $\alpha^{137-141}$ diminuait avec l'élévation du DH, hormis pour le DH de 3% car contenant des chaînes α et β non-hydrolysées.

Concernant la teneur en $\alpha^{137-141}$ au sein du compartiment de récupération, la plus importante a été retrouvée lors de la séparation de l'hydrolysate à un DH de 5%, avec une pureté estimée à $10.27 \pm 0.04\%$. Cette valeur était 8 fois supérieure à celle observée avec un DH de 18% ($1.20 \pm 0.04\%$).

Afin d'expliquer la meilleure migration de l' $\alpha^{137-141}$ au sein du compartiment de récupération avec un hydrolysate d'un DH de 5%, l'évolution de sa concentration au sein de la solution de KCl durant toute la durée de l'EDUF est proposée en **Figure 58**.

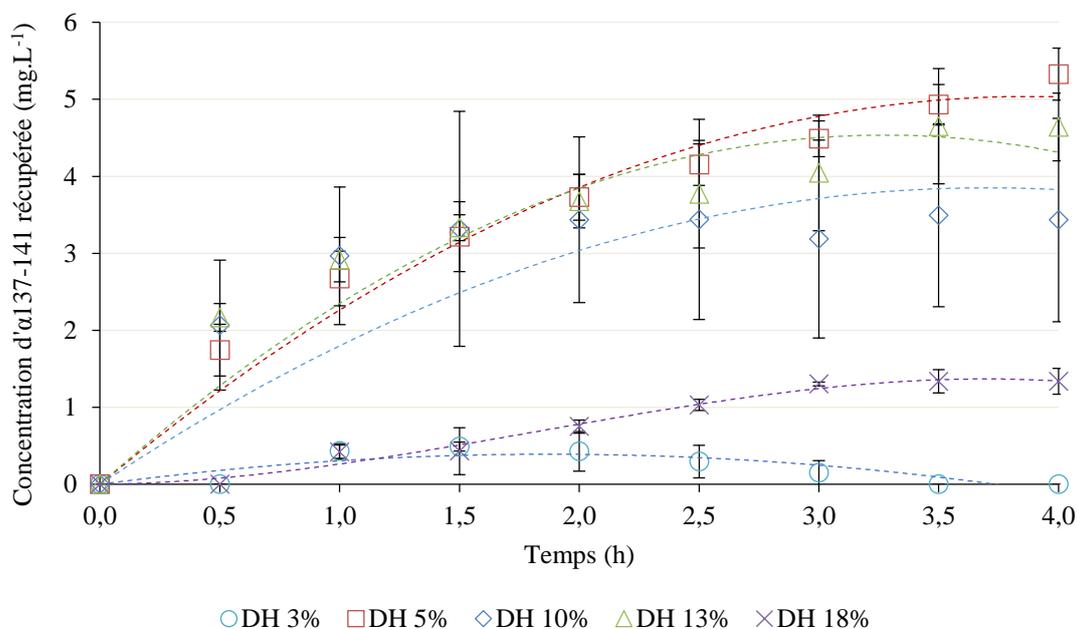


Figure 58 : Évolution de la concentration en $\alpha^{137-141}$ au sein du compartiment de récupération durant 4 heures d'EDUF pour la séparation d'hydrolysats d'hémoglobine bovine (1%, p/v) selon différents degrés d'hydrolyse

En fin d'expérience, la plus haute concentration en α 137-141 a été retrouvée avec un DH de 5% ($5.33 \pm 0.34 \text{ mg.L}^{-1}$). De plus, l'évolution de la concentration en α 137-141 avec ce DH a été la plus linéaire en comparaison de celles effectuées avec les autres DH. Ce comportement était le reflet de la compétition de l' α 137-141 avec les autres peptides contenus au sein de l'hydrolysats, et notamment ceux possédant une masse moléculaire dans la même gamme que la sienne, c'est-à-dire entre 500 et 1000 Da. Par conséquent, plus le DH était élevé, plus la population peptidique entre 500 et 1000 Da était importante, et plus le transfert d' α 137-141 au sein du compartiment de récupération était faible.

L'ensemble de ces données a montré que la population peptidique avait une influence sur la séparation sélective de l' α 137-141. En effet, sa migration au travers de la membrane d'ultrafiltration a été le moins efficace en présence d'une importante population de petits peptides dont la masse moléculaire était inférieure à 1000 Da. En accord avec l'ensemble des précédents résultats, il est conclu que le DH le plus approprié pour la séparation sélective du peptide actif antimicrobien α 137-141 était le DH de 5%. Il s'agissait en effet de l'hydrolysats possédant la plus faible population de petits peptides (< 1000 Da) après le DH de 3%, tout en ne possédant plus de chaînes non-hydrolysées de l'hémoglobine bovine. Il permettait de récupérer l' α 137-141 avec une pureté de plus de 10% (en comparaison de l'hydrolysats initial où sa teneur était de l'ordre de 0.7%), soit un facteur d'enrichissement supérieur à 13 fois.

Pour la suite de l'étude, l'hydrolysats retenu a donc été celui d'un DH de 5%.

4.4. Effet du contrôle du pH sur la séparation sélective du peptide actif α 137-141

Le pH des hydrolysats affecte la charge des peptides présents. Si le pH de l'hydrolysats est plus faible que le point isoélectrique (pH_i) des peptides, les peptides seront chargés positivement. En revanche, ils seront chargés négativement si le pH de travail est plus élevé que leur pH_i .

Avec la configuration cationique de la cellule d'EDUF utilisée, seuls les peptides chargés positivement et dont la masse moléculaire était plus petite que le seuil de coupure de la membrane d'ultrafiltration pouvaient migrer vers le compartiment de récupération. Le pH de

travail devait être sélectionné de manière à faire migrer le moins de peptides possibles, tout en conservant une bonne mobilité électrophorétique pour l' α 137-141, dont le pH_i est aux environs de 10.5. De plus, il est conseillé de ne pas dépasser un pH de 10 afin d'éviter toute hydrolyse basique au sein de la solution d'alimentation ou de récupération.

4.4.1. Contrôle du pH à 4.7

Le pH au sein des compartiments d'alimentation et de récupération de l'EDUF a tout d'abord été maintenu constant à une valeur de 4.7, correspondant au pH de l'hydrolysat juste après l'étape de décoloration.

Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus précédemment lors de l'étude de la séparation de l'hydrolysat d'un DH de 5%, sans régulation du pH.

4.4.1.1. Évolution des paramètres électrodialytiques : pH, conductivités et intensité du courant électrique

Pour rappel, sans contrôle, le pH du compartiment de récupération augmentait de 5.5 à 10 en 30 min d'expérience seulement (**Figure 53**). Ceci correspondait à la durée d'apparition du phénomène de densité de courant limite (Doyen *et al.*, 2013; Poulin *et al.*, 2007), engendrant la dissociation de l'eau principalement à l'interface membrane échangeuse de cations et solution de KCl dans notre cas. Par conséquent, une déminéralisation en deux étapes a été observée en contrôlant le pH (**Figure 59**). Durant les 30 premières minutes du traitement, la déminéralisation au sein du compartiment de récupération a été rapide (avec une pente de $-1.32 \text{ mS.cm}^{-1}.\text{h}^{-1}$, $r^2 = 0.99$), provoquée par le départ des ions K^+ et Cl^- , comme précédemment observé (Firdaous *et al.*, 2009). Ensuite, le pH au sein des compartiments, à cause du phénomène d'autoprotolyse de l'eau, a évolué, nécessitant une régulation afin d'être gardé constant. De cette manière, l'ajout d'HCl a contribué à diminuer la vitesse de déminéralisation après 30 minutes d'expérience avec une pente de $-0.33 \text{ mS.cm}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ($r^2 = 0.99$) jusqu'en fin d'EDUF. En comparaison, l'évolution de la conductivité de la solution de récupération sans contrôle du pH a été davantage linéaire tout au long du traitement, montrant une pente de $-0.63 \text{ mS.cm}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ($r^2 = 0.94$).

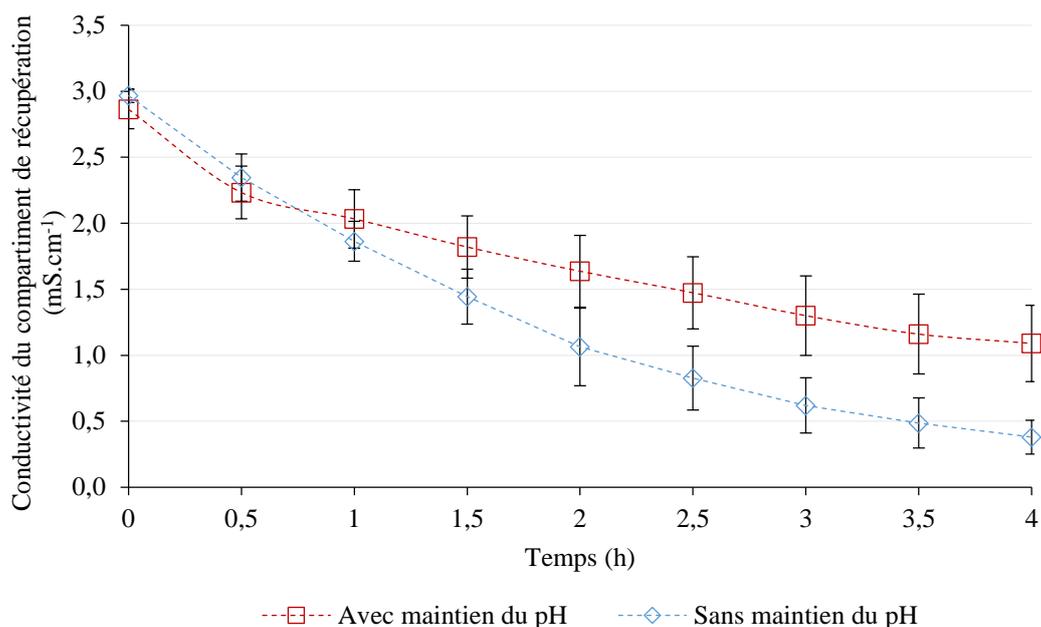


Figure 59 : Évolution des conductivités au sein de la solution de récupération pour la séparation d'un hydrolysât d'hémoglobine bovine (DH de 5% ; 1%, p/v) par EDUF, avec et sans maintien du pH à 4.7

Au sein du compartiment d'alimentation, les deux conditions ont présenté des tendances similaires concernant leurs conductivités (**Figure 60**). Sans contrôle du pH, la conductivité de l'hydrolysât est passée de 7.58 ± 0.16 mS.cm⁻¹ à 10.16 ± 0.46 mS.cm⁻¹ en 4 heures d'EDUF, correspondant à un taux de minéralisation de 34%. Avec maintien du pH à 4.7, elle a évolué de 6.96 ± 0.12 mS.cm⁻¹ à 8.63 ± 0.29 mS.cm⁻¹, équivalant à une minéralisation de 24%.

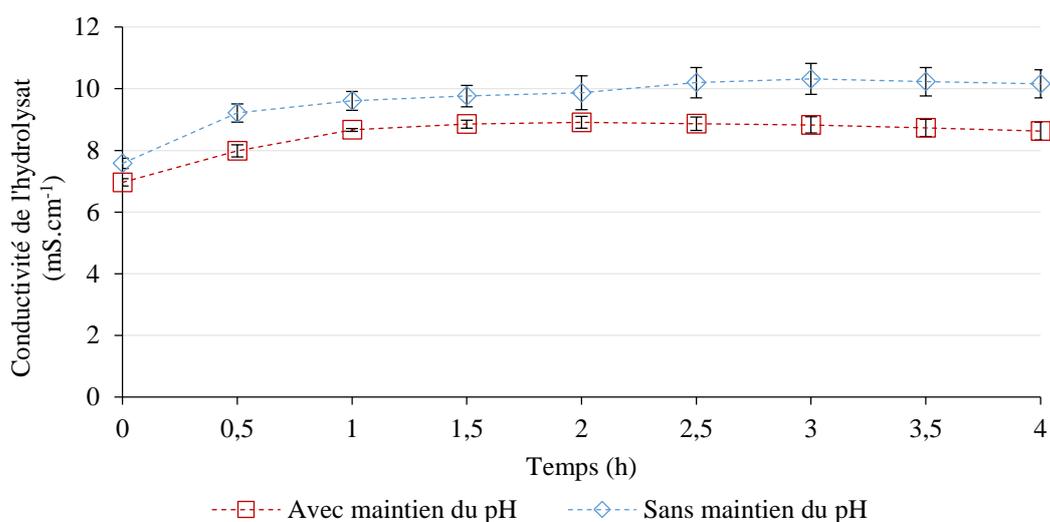


Figure 60 : Évolution des conductivités au sein de la solution d'alimentation selon la séparation d'un hydrolysât d'hémoglobine bovine (DH de 5% ; 1%, p/v) par EDUF, avec et sans maintien du pH à 4.7

Concernant l'intensité du courant électrique (**Figure 61**), la première étape de décroissance a été observée en contrôlant le pH durant les 30 premières minutes avec une pente de -0.19 A.h^{-1} ($r^2 = 0.99$). Ensuite, la seconde étape possédait une pente de -0.04 A.h^{-1} ($r^2 = 0.86$) jusqu'à la fin de l'électrodialyse. Sans contrôle du pH, l'évolution de l'intensité du courant électrique montrait une tendance plus linéaire tout au long du traitement avec une pente de -0.06 A.h^{-1} ($r^2 = 0.98$), confirmant les précédents résultats concernant l'analyse comparative des conductivités.

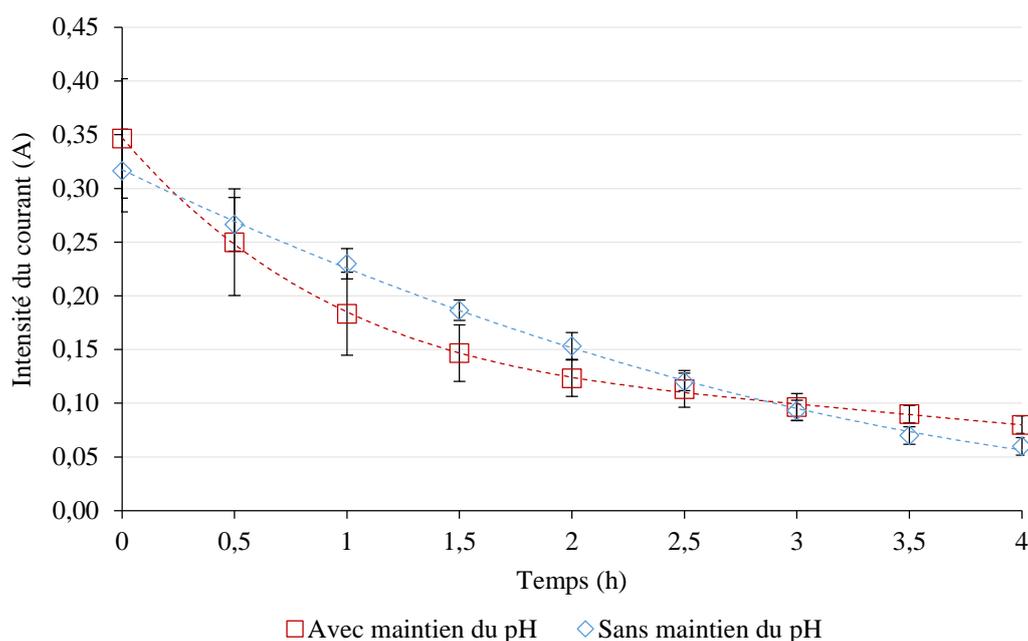


Figure 61 : Évolution de l'intensité du courant électrique au sein de la cellule d'EDUF lors de la séparation de l'hydrolysate d'hémoglobine bovine (DH 5% ; 1%, p/v) avec et sans contrôle du pH à 4.7

4.4.1.2. Effet du contrôle du pH à 4.7 sur la migration peptidique totale

La **Figure 62** présente l'évolution de la concentration totale en peptides au sein du compartiment de récupération durant les 4 heures d'EDUF, avec et sans régulation du pH. Comme attendu, la migration peptidique était plus importante avec contrôle du pH. En effet, la concentration récupérée en fin d'expérience était alors 2.8 fois supérieure, passant de $38.45 \pm 5.46 \text{ mg.L}^{-1}$ (sans contrôle) à $108.36 \pm 2.80 \text{ mg.L}^{-1}$ (avec contrôle). Il avait été observé que sans maintien du pH, la migration peptidique atteignait rapidement un plateau. Or, en régulant le pH, la migration peptidique s'effectuait de manière linéaire durant les 4 heures d'EDUF. Plus

précisément, la concentration totale en peptides n'évoluait plus de manière significative entre 2 et 4 heures d'expérience sans maintien du pH (de 33.75 ± 3.93 à 38.45 ± 5.46 mg.L⁻¹) contrairement à la condition avec contrôle du pH (de 66.00 ± 11.70 à 108.36 ± 2.80 mg.L⁻¹).

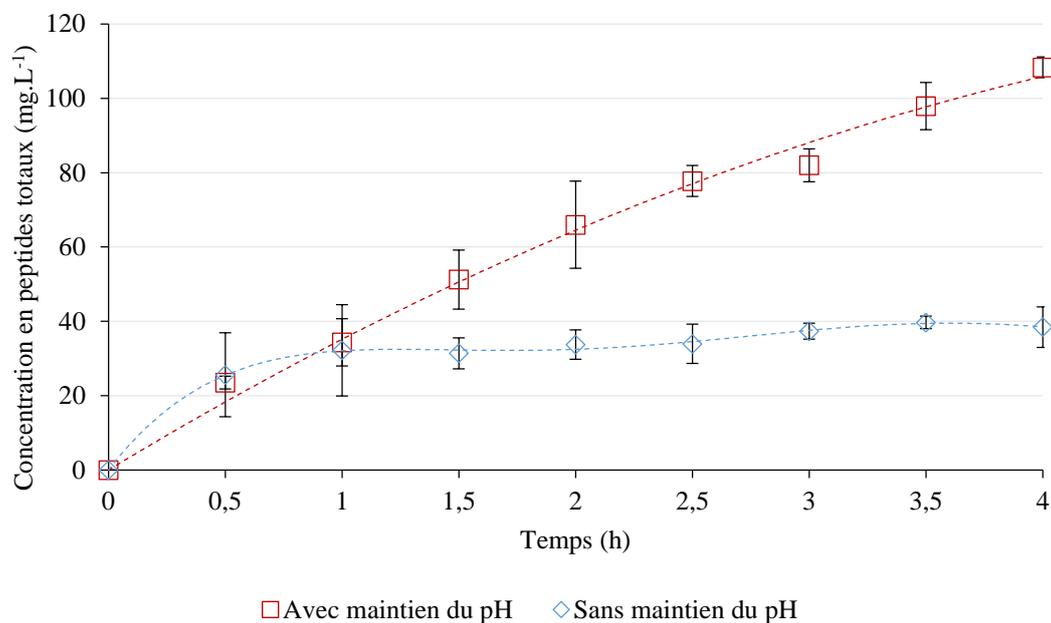


Figure 62 : Évolution de la concentration peptidique totale au sein du compartiment de récupération durant 4 heures d'EDUF pour la séparation d'un hydrolysât d'hémoglobine bovine (DH 5% ; 1%, p/v) avec et sans contrôle du pH à 4.7

Afin de comparer les deux populations ayant migré, la **Figure 63** montre les chromatogrammes obtenus après 4 heures d'EDUF avec et sans contrôle du pH à 4.7. Il est observé qu'en contrôlant le pH, davantage de peptides étaient capables de migrer au travers de la membrane d'ultrafiltration, le pH de travail n'atteignant pas rapidement 10, comme c'était le cas sans régulation.

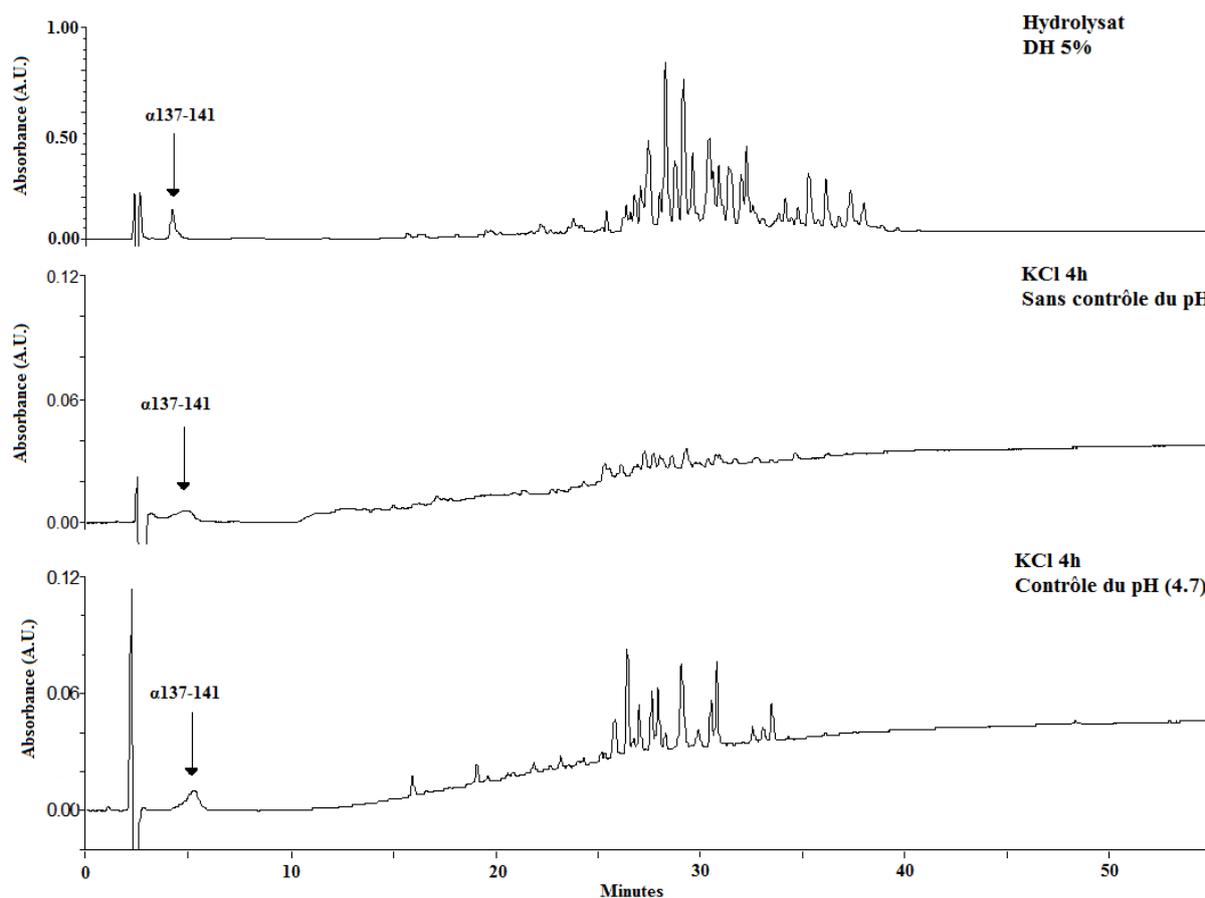


Figure 63 : Chromatogrammes comparant les solutions de récupération avec et sans contrôle du pH (4.7)

Pour confirmer cela, des analyses en LC-MS/MS pour les fractions récupérées après 4 heures d'EDUF ont été effectuées. De cette manière, il a été confirmé que le nombre de peptides au sein de la solution de récupération avait augmenté avec le contrôle du pH. Ainsi, 16 peptides étaient retrouvés au sein de la solution de récupération sans maintien du pH (**Tableau 16**). En revanche, 40 séquences peptidiques ont pu être identifiées au sein de la solution de récupération avec contrôle du pH à 4.7, sur un total initial de 101 séquences identifiées au sein de l'hydrolysats à un DH de 5%. Il pouvait être constaté qu'en l'absence de régulation de pH, la migration des peptides de la solution d'alimentation vers le compartiment de récupération s'effectuait globalement pour des peptides dont le pH_i était supérieur à 10.

L'ensemble de l'identification pour la partie § 4.4 est résumé au sein du **Tableau 21**.

Tableau 21 : Identification des peptides au sein des solutions de récupération selon le contrôle du pH lors de la séparation d'un hydrolysate d'hémoglobine bovine (DH 5%, 1%, p/v)

Position	Séquence	MM	pH _i	Index	Hydrolysate	Sans	Contrôle du pH				
							Gravy	total (DH 5%)	contrôle du pH (1%, p/v)	4,7	6,5
α74-82	DDLPGALSE	915	0,59	-0,433	+						
α81-86	SELSDL	662	0,63	-0,167	+						
β41-47	FESFGDL	813	0,63	0,171	+						
β45-51	GDLSTAD	677	0,73	-0,471	+						
β1-6	MLTAE	692	0,85	-0,033	+						
α22-26	AEYGA	509	0,91	-0,320	+						
β85-90	AALSEL	602	0,92	1,150	+						
α24-29	YGAEAL	622	0,92	0,367	+						
β85-89	AALSE	489	1,00	0,620	+						
α79-84	ALSELS	618	1,01	0,717	+						
α70-83	VEHLDDLPGALSEL	1507	3,42	0,086	+						
α72-82	HLDDLPGALSE	1166	3,54	-0,300	+						
α129-135	LANVSTV	702	3,65	1,286	+						
α130-136	ANVSTVL	702	3,70	1,286	+						
α27-29	EAL	332	3,81	0,700	+					+	
α67-83	TKAVEHLDDLPGALSEL	1807	3,93	-0,094	+						
α66-83	LTKAVEHLDDLPGALSEL	1920	3,93	0,122	+						
α64-83	AALTKAVEHLDDLPGALSEL	2062	3,93	0,290	+						
β3-13	TAEKAAVTAF	1137	4,15	0,173	+						
β1-11	MLTAEKAAVT	1163	4,15	0,273	+						
β1-12	MLTAEKAAVTA	1234	4,15	0,400	+						
β2-13	LTAEKAAVTAF	1250	4,15	0,475	+						
β1-13	MLTAEKAAVTAF	1381	4,15	0,585	+						
β14-27	WGKVKVDEVGGEAL	1486	4,32	-0,157	+						
β70-79	FSNGMKHLDD	1162	5,04	-1,030	+					+	
β96-109	HVDPENFKLLGNVL	1594	5,17	-0,036	+						
α60-80	AKVAAALTKAVEHLDDLPGAL	2102	5,23	0,486	+					+	
β82-84	GTF	323	5,50	0,567	+					+	
α95-97	PVN	328	5,50	-0,300	+					+	
α41-43	TYF	429	5,50	0,267	+		+			+	
β9-13	AVTAF	507	5,50	1,980	+					+	
α129-134	LANVST	603	5,50	0,800	+		+			+	
β32-36	VVYPW	663	5,50	0,920	+					+	
α129-136	LANVSTVL	815	5,50	1,600	+					+	
β92-95	CDKL	478	5,92	-2,925	+					+	
α92-98	RVDPVNF	845	6,25	-0,271	+					+	+
α110-122	ASHLPSDFTPAVH	1378	6,48	-0,077	+						
α110-125	ASHLPSDFTPAVHASL	1649	6,48	0,237	+						
α109-125	LASHLPSDFTPAVHASL	1762	6,48	0,447	+						
α107-125	VTLASHLPSDFTPAVHASL	1962	6,48	0,584	+					+	+

(suite **Tableau 21**)

Position	Séquence	MM	pHi	Index Gravy	Hydrolysats total (DH 5%)	Sans contrôle du pH (1%, p/v)	Contrôle du pH (1%, p/v)		
							4,7	6,5	9
α110-128	ASHLPSDFTPAVHASLDFK	2039	6,48	-0,042	+				
α126-133	DKFLANVS	892	6,66	0,113	+				
α126-136	DKFLANVSTVL	1206	6,66	0,745	+				
α123-128	ASLDFK	679	6,69	0,033	+				
α29-31	LER	416	6,86	-1,400	+		+		+
β14-30	WGKVKVDEVGGEALGRL	1812	6,91	-0,194	+				
α118-128	TPAVHASLDFK	1185	7,50	0,064	+				
α102-106	SHSLL	555	7,54	0,560	+		+		+
β70-84	FSNGMKHLDDLKGTG	1709	7,55	-0,58	+				
α122-127	HASLDFK	668	7,56	-0,967	+	+	+		+
α117-128	FPAVHASLDFK	1185	7,56	0,292	+		+		+
α84-98	SDLHAHKLRVDPVNF	1747	7,70	-0,473	+				
α66-73	LTKAVEHL	910	7,80	0,287	+				
α101-106	LSHSLL	668	7,81	1,100	+				
α100-106	LLSHSLL	781	7,81	1,486	+				
α83-98	LSDLHAHKLRVDPVNF	1860	7,95	-0,206	+				
α119-128	PAVHASLDFK	1084	8,15	0,140	+				
α119-125	PAVHASL	693	8,26	0,857	+				
β102-109	FKLLGNVL	903	8,88	1,325	+		+		
β114-125	ARNFGKEFTPVL	1378	8,88	-0,225	+				
α36-46	FPTTKTYFPHF	1385	8,88	-0,482	+				
α33-46	FLSFPTTKTYFPHF	1732	8,88	0,036	+		+		+
β128-145	DFQKVAVGANALAHRYH	1995	8,88	-0,033	+		+		
α98-106	FKLLSHSLL	1057	9,06	1,033	+				
β138-145	NALAHRYH	980	9,41	-1,038	+				
β126-145	QADFQKVAVGANALAHRYH	2194	9,47	-0,115	+				
α35-46	SFPTTKTYFPHF	1472	9,50	-0,508	+				
β34-40	YPWTQRF	996	9,57	-1,386	+				
α107-141	VTLASHLPSDFTPAVHASLDFKFLANVSTVLTSKYR	3787	9,64	0,231	+				
α34-43	LSFPTTKTYF	1204	9,74	-0,030	+		+		+
α34-46	LSFPTTKTYFPHF	1585	9,74	-0,177	+		+		+
β32-40	VVYPWTQRF	1195	9,81	-0,144	+	+	+	+	+
β130-139	QKVAVGANA	956	9,83	0,670	+	+	+		+
β135-145	GVANALAHRYH	1208	9,83	-0,245	+				
β31-40	LVVYPWTQRF	1308	9,83	0,250	+	+	+	+	+
α54-59	QVKGHG	624	9,84	-1,200	+		+		
α87-98	HAHKLRVDPVNF	1432	9,87	-0,550	+				
α58-64	HGAKVAA	652	9,88	0,300	+		+		
β129-137	FQKVAVGVA	918	9,88	1,244	+				
β137-145	ANALAHRYH	1052	9,90	-0,722	+				
α99-104	KLLSHS	683	9,91	-0,183	+				
β7-13	KAAVTAF	706	9,91	1,114	+				

(suite **Tableau 21**)

Position	Séquence	MM	pH _i	Index Gravy	Hydrolysat total (DH 5%)	Sans contrôle du pH (1%, p/v)	Contrôle du pH (1%, p/v)		
							4,7	6,5	9
β103-109	KLLGNVL	755	9,91	1,114	+	+	+	+	
α99-105	KLLSHSL	796	9,91	0,386	+	+	+	+	
β103-110	KLLGNVLV	855	9,91	1,500	+				
β7-14	KAAVTAFW	893	9,91	0,863	+				
α99-106	KLLSHSLL	910	9,91	0,812	+	+	+	+	+
α99-107	KLLSHSLLV	1009	9,91	1,189	+		+		
α37-46	PTTKTYFPHF	1238	10,09	-0,810	+	+	+	+	
β114-124	ARNFGKEFTPV	1247	10,18	-0,591	+	+	+	+	+
α134-141	TVLTSKYR	967	10,40	-0,487	+	+	+	+	
β130-145	QKVVAGVANALAHRYH	1733	10,40	0,006	+				
α133-141	STVLTSKYR	1054	10,41	-0,522	+				
β129-135	FQKVVAGVANALAHRYH	1880	10,41	0,171	+		+		
α135-141	VLTSKYR	866	10,46	-0,457	+	+	+	+	
α136-141	LTSKYR	766	10,47	-1,233	+	+	+	+	
α129-141	LANVSTVLTSKYR	1451	10,47	0,123	+	+	+	+	+
α137-141	TSKYR	653	10,50	-2,240	+	+	+	+	+
α37-40	PTTK	445	10,57	-1,725	+		+	+	
α56-67	KGHGAKVAAALT	1153	10,69	0,225	+				
β35-40	PWTQRF	833	11,29	-1,400	+				

Les résultats de l'identification des séquences peptidiques ont été cohérents avec la cellule d'EDUF utilisée et les séquences identifiées au sein de l'hydrolysat total (**Tableau 10**). Toutefois, un peptide avec un pH_i inférieur à 4.7 a été identifiée comme ayant traversé la membrane d'ultrafiltration. Il s'agissait du peptide α27-29, dont la séquence est EAL, possédant un pH_i théorique de 3.81. Sa faible masse moléculaire (332 Da) et la proximité de son pH_i avec le pH de travail pourraient expliquer sa migration de l'hydrolysat à la solution de KCl.

Également, par rapport aux pH_i théoriques calculés, certains peptides étaient capables de migrer au sein de la solution de récupération, mais n'y ont pas été retrouvés. Dû au mécanisme de type *zipper* impliqué dans la génération des peptides (Catiau *et al.*, 2011b; Dubois *et al.*, 2005), la population peptidique du DH de 5% était à la fois constituée de peptides intermédiaires de hauts poids moléculaires et de peptides finaux de faibles masses molaires. De plus, la cinétique d'hydrolyse aboutissant à un même peptide final proposait différentes voies de dégradation à partir d'un fragment initial de la protéine précurseur, avec des étapes parfois préférentielles (Hedhili *et al.*, 2014, Hedhili *et al.*, 2015).

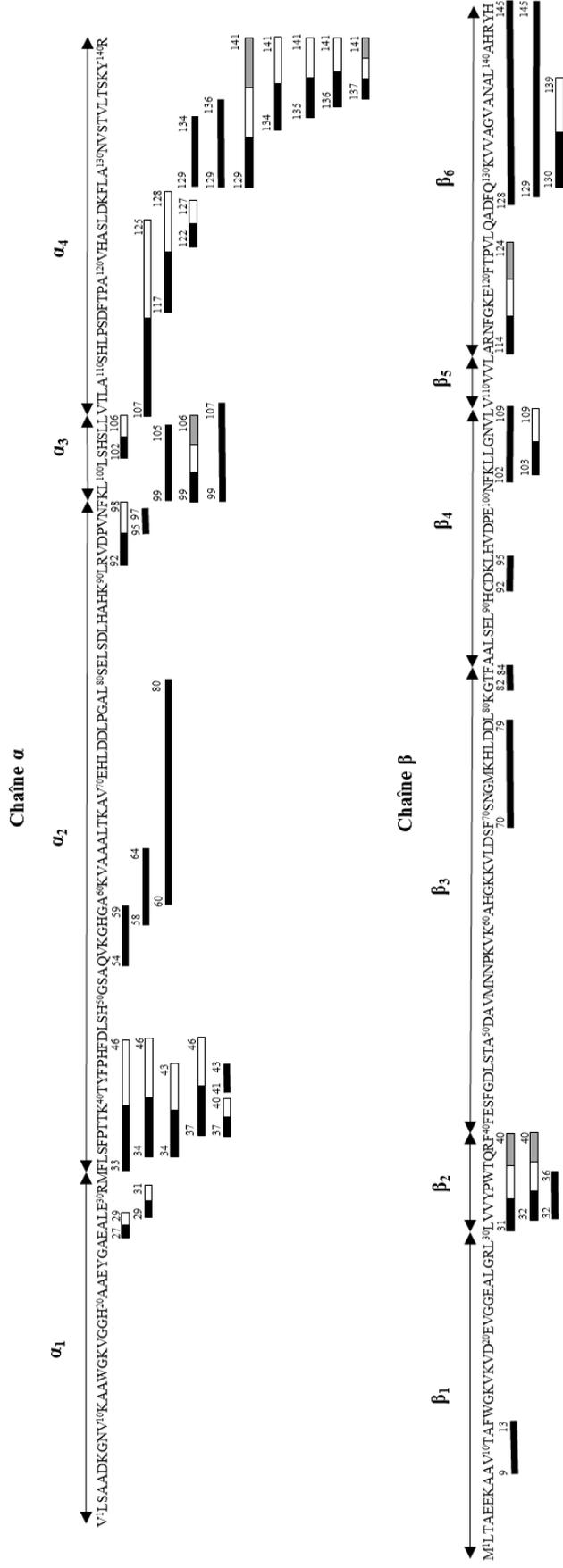


Figure 64 : Cartographie peptidique des peptides récupérés à différents pH de travail au sein de l'EDUF

Avec ces considérations, les chaînes d'hémoglobine bovine pouvaient être subdivisées en plusieurs fragments (**Figure 64**). Ainsi, la chaîne α comportait 4 fragments : α_1 (V¹ to M³²), α_2 (F³³ to N⁹⁸), α_3 (K⁹⁹ to L¹⁰⁶) et α_4 (V¹⁰⁷ to R¹⁴¹) et 6 fragments composaient la chaîne β : β_1 (M¹ to L³⁰), β_2 (L³¹ to F⁴⁰), β_3 (F⁴¹ to F⁸⁴), β_4 (A⁸⁵ to L¹⁰⁹), β_5 (V¹¹⁰ to L¹¹³) et β_6 (A¹¹⁴ to H¹⁴⁵), chacun correspondant à une famille de peptides. Au sein de la même famille de peptides, ceux étant produits le plus abondamment lors de l'hydrolyse seraient donc favorablement les plus disposés à migrer au travers de la membrane d'ultrafiltration s'ils étaient chargés positivement au pH de travail effectué.

Pour la famille α_1 , deux peptides ont été retrouvés au sein de la solution de KCl ($\alpha 27-29$ et $\alpha 29-31$). Leurs faibles masses moléculaires signifieraient par ailleurs qu'il s'agit là de peptides finaux.

La famille α_2 était représentée au sein de la solution de récupération par neuf peptides. Le fragment principal était le peptide $\alpha 33-46$, qui est un peptide intermédiaire au cours de l'hydrolyse. Ce dernier a été hydrolysé en deux peptides antimicrobiens ($\alpha 34-46$ et $\alpha 37-46$), d'après Nedjar-Arroume *et al.* (2008), et trois autres peptides sans bioactivité décrite ($\alpha 34-43$, $\alpha 37-40$ et $\alpha 41-43$), présents au sein de la solution de KCl. Cinq autres peptides ont été retrouvés au sein de cette famille: le $\alpha 54-59$, $\alpha 58-64$, $\alpha 60-80$, $\alpha 92-98$ et $\alpha 92-97$.

La famille $\alpha 99-106$ (ou famille α_3) était essentiellement composée par le peptide antimicrobien $\alpha 99-106$ (Adje *et al.*, 2011b) qui a été récupéré au sein de la solution de KCl avec deux autres peptides qui en sont dérivés : les peptides $\alpha 102-106$ et $\alpha 99-105$. Un autre fragment a été également retrouvé, il s'agissait du peptide $\alpha 99-107$. Il est le témoin d'un site de clivage différent de la pepsine porcine sur la chaîne α de l'hémoglobine bovine, puisqu'il s'agit du peptide principal de la famille α_3 avec un acide aminé en plus.

Ensuite, au DH de 5%, le peptide $\alpha 107-141$ (correspondant à la famille α_4) a déjà été hydrolysé en d'autres intermédiaires de plus courtes séquences. Sa concentration au sein de la solution d'alimentation était donc faible, dû aux nombreux autres peptides identifiés en étant issus (22 au total identifiés). Les peptides produits de manière préférentielle, et donc les plus concentrés, auraient alors migré. Avec le contrôle du pH à 4.7, dix séquences identifiées ont été retrouvées ($\alpha 107-125$, $\alpha 117-128$, $\alpha 122-127$, $\alpha 129-134$, $\alpha 129-136$, $\alpha 129-141$, $\alpha 129-141$, $\alpha 134-141$, $\alpha 135-141$, $\alpha 136-141$ et $\alpha 137-141$), incluant deux peptides antimicrobiens ($\alpha 129-141$ et $\alpha 137-141$). Plus précisément, c'était effectivement le cas des peptides $\alpha 129-141$ et $\alpha 137-141$, produits majoritairement à partir de leur précurseur, l' $\alpha 107-141$ (Catiau *et al.*, 2011b). Aussi, ses seconds intermédiaires étaient principalement les peptides $\alpha 107-125$ et $\alpha 110-128$, formés par exemple à partir de l' $\alpha 107-128$, lui-même déjà hydrolysé à ce DH.

Concernant la famille β_1 , un unique peptide a été retrouvé : le peptide β_9 -13.

En appliquant le même raisonnement, la famille des hémorphines, correspondant à la famille β_2 , était surtout représentée par les peptides β_{31} -40 et β_{32} -40, tous deux retrouvés au sein de la solution de récupération, avec le peptide β_{32} -36 et au contraire du peptide β_{34} -40. Cette famille est connue pour son activité opioïde (Zhao *et al.*, 1997b; Zhao *et al.*, 1996c).

Pour la troisième partie de la chaîne β , le petit peptide final β_{70} -79 a été récupéré.

Les peptides β_{92} -95 et β_{102} -109, ainsi que son dérivé β_{103} -109, ont été les représentants majeurs de la famille β_4 .

Concernant la famille du peptide β_{114} -145, aussi nommée famille β_6 , les plus concentrés au sein de l'hydrolysate devaient être les peptides β_{114} -124 et β_{126} -145, et leurs dérivés β_{129} -145 and β_{130} -139.

Dû à la faible avancée de l'hydrolyse, la majorité des peptides de faible masse moléculaire devaient être peu présents au sein de la solution d'alimentation. Ceci pouvait être le cas des peptides β_{35} -40 et β_{34} -40 pour la famille β_2 , ou α_{99} -104 et α_{101} -106 pour la famille α_3 . Leur faible concentration initiale rendait ainsi leur migration difficile au travers de la membrane d'ultrafiltration.

Enfin, certains peptides de pH_i élevé au sein de l'hydrolysate possédaient aussi un important index GRAVY. Ceci était le cas pour le peptide β_{103} -110, d'un index GRAVY de 1.500, et pour le peptide β_{129} -137, dont l'index GRAVY était de 1.244, indiquant une hydrophobie élevée, qui n'ont pas été retrouvés au sein des familles β_4 et β_6 dans la solution de KCl (Figure 64). Ces peptides pouvaient ainsi être impliqués dans des interactions avec la membrane d'ultrafiltration ou avec d'autres peptides hydrophobes (Lebrun *et al.*, 1998), empêchant leur récupération.

Finalement, il pouvait être supposé qu'une accumulation de peptides cationiques à la surface de la membrane d'ultrafiltration pouvait gêner la migration d'autres peptides qui, selon leur pH_i , auraient dû migrer au sein de la solution de KCl (Galier *et al.*, 2005).

En conclusion, la régulation du pH à une valeur de 4.7 au sein des compartiments d'alimentation et de récupération permettait d'augmenter le rendement de récupération total en peptides d'un facteur 2.8 par rapport aux expériences effectuées sans contrôle du pH.

4.4.1.3. Effet du contrôle du pH à 4.7 sur la récupération du peptide actif α 137-141

La récupération sélective du peptide actif α 137-141 est montrée en **Figure 65** pour les 4 heures de traitement d'EDUF avec et sans maintien du pH.

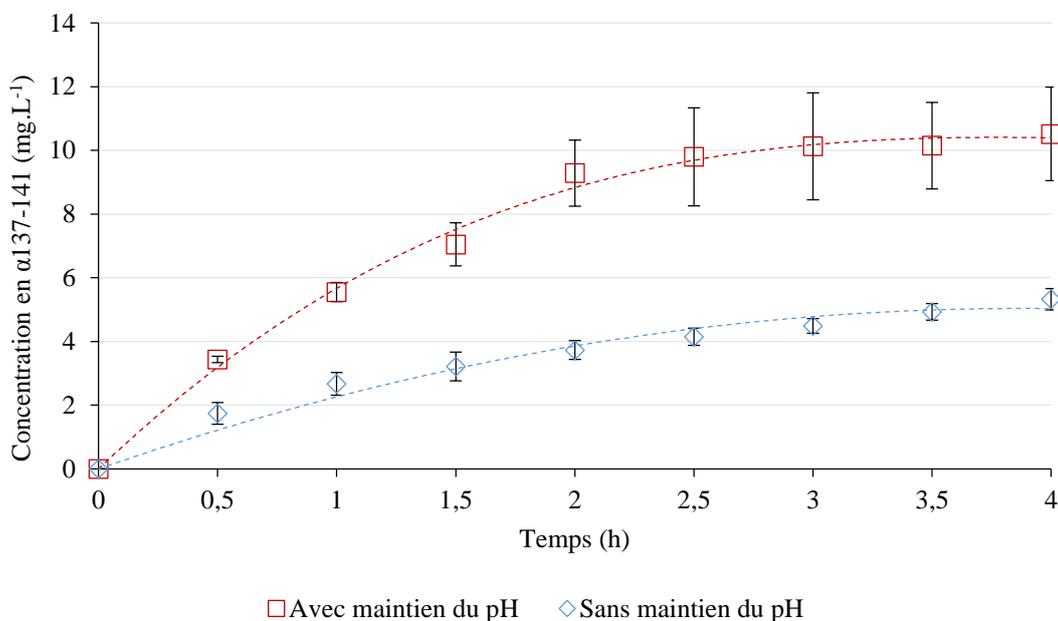


Figure 65 : Évolution de la concentration en α 137-141 au sein du compartiment de récupération durant 4 heures d'EDUF pour la séparation d'un hydrolysate d'hémoglobine bovine (DH 5% ; 1%, p/v) avec et sans contrôle du pH à 4.7

Le contrôle du pH à 4.7 a permis de récupérer deux fois plus d' α 137-141 après 4 heures d'expérience (10.52 ± 1.47 mg.L⁻¹) que précédemment (5.33 ± 0.34 mg.L⁻¹). En revanche, la concentration en α 137-141 n'a pas évolué de manière significative durant les 2 dernières heures d'EDUF avec contrôle du pH (de 9.29 ± 1.04 à 10.52 ± 1.47 mg.L⁻¹). Ce fait n'était par ailleurs pas remarqué pour la récupération totale en peptides qui s'était poursuivie de manière linéaire entre 2 et 4 heures d'EDUF (**Figure 62**). Ceci a donc engendré une différence entre l'augmentation de rendement de récupération des peptides totaux (2.8 fois) et de l' α 137-141 (2 fois) lors du maintien du pH.

Pour expliquer cela, la **Figure 66** est proposée, détaillant les proportions d' α 137-141 récupérées au cours du temps de traitement d'EDUF, avec et sans contrôle du pH.

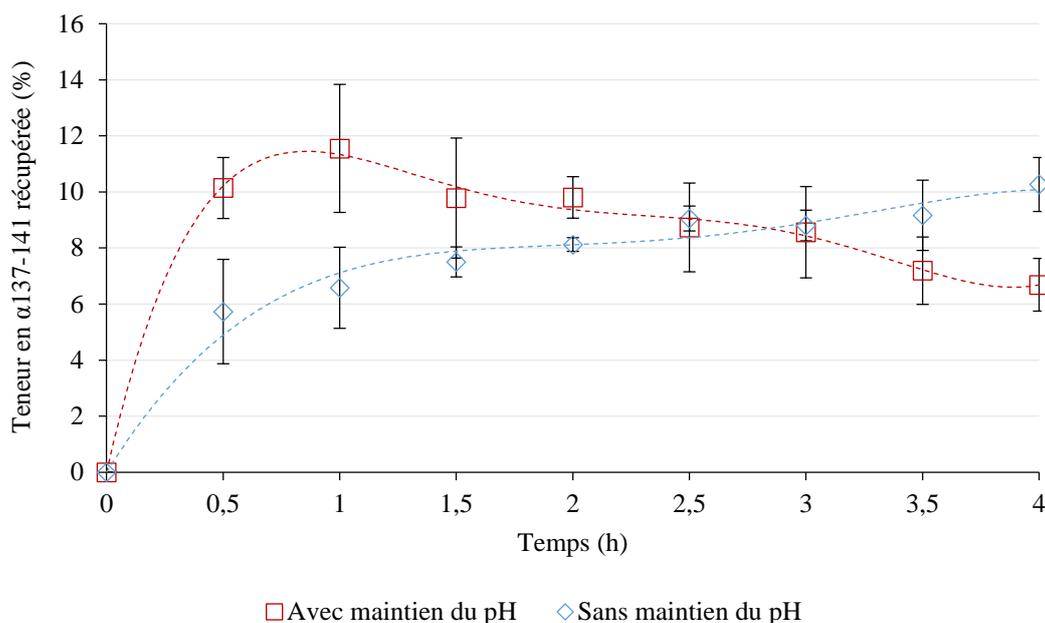


Figure 66 : Évolution de la teneur en α 137-141 au sein de la solution de récupération lors de la séparation par EDUF d'un hydrolysât d'hémoglobine bovine (DH 5% ; 1%, p/v), avec et sans maintien du pH à 4.7

En contrôlant le pH, la teneur en α 137-141 au sein du compartiment de récupération a montré un maximum au bout d'une heure d'EDUF ($11.55 \pm 2.28\%$). Cette teneur n'était pas significativement différente de celle observée à 2 heures ($9.81 \pm 0.74\%$). Ensuite, elle diminuait jusqu'à $6.69 \pm 0.94\%$ en fin d'expérience. En revanche, sans régulation du pH, elle augmentait tout le long de l'EDUF, offrant une valeur maximale de $10.27 \pm 0.96\%$ à 4 heures d'EDUF.

Avec l'aide de la **Figure 65**, il était possible de conclure que la migration de l' α 137-141 se faisait de manière compétitive avec celle des peptides de grande masse moléculaire qui gênait peu à peu celle des petits peptides au fur et à mesure de l'avancée de l'EDUF. Ceci était en corrélation avec le fait que les peptides de hauts poids moléculaires migraient plus lentement que ceux de faibles masses moléculaires (Doyen *et al.*, 2013).

Après 2 heures d'EDUF, il pouvait être supposé que la migration de l' α 137-141 au travers de la membrane d'ultrafiltration entraînait également en compétition avec les OH^- générés par le phénomène de dissociation des molécules d'eau, qui migraient en contre-sens, de la solution de KCl vers l'hydrolysât (Poulin *et al.*, 2007).

En conclusion, le maintien du pH a bien montré une augmentation du rendement de récupération en α 137-141, d'un facteur 2. Il s'agissait donc d'une méthode efficace pour améliorer l'efficacité du transfert peptidique de l'hydrolysate vers la solution de KCl, puisque le contrôle du pH à 4.7 a permis d'enrichir les fractions en α 137-141 d'un facteur égal à 9, en comparaison de l'hydrolysate initial.

En revanche, si le maintien du pH a bien permis d'augmenter le rendement de récupération en peptides totaux, davantage de peptides ont migré au sein de la solution de KCl. Afin d'augmenter la pureté en α 137-141 récupérée, il a ensuite été nécessaire d'essayer de minimiser la migration des autres peptides co-migrant avec l' α 137-141 au sein du compartiment de récupération en sélectionnant d'autres pH de travail.

4.4.2. Augmentation de la pureté en peptide actif α 137-141 au sein de la solution de récupération par contrôle du pH à 6.5 et 9

Après le contrôle à pH 4.7, deux autres pH de travail ont été étudiés. Le premier a été un pH proche du pH neutre : 6.5. Le second a été le pH 9, proche du pH_i de l' α 137-141 (10.5) mais inférieur à 10 afin d'éviter une éventuelle hydrolyse basique de la solution d'alimentation.

L'ensemble des résultats obtenus à pH 6.5 et 9 a été comparé à ceux déjà obtenus précédemment avec le contrôle du pH à 4.7.

4.4.2.1. Évolution des paramètres électrodialytiques : conductivités et intensité du courant électrique

Concernant les conductivités de l'hydrolysate, les tendances selon le pH testé étaient similaires, mais les valeurs n'étaient pas identiques, montrant une augmentation de la conductivité initiale avec l'élévation du pH de travail (**Figure 67**). Cette différence était due à l'addition de NaOH dans l'hydrolysate décoloré (pH de 4.7) afin d'ajuster le pH de travail à 6.5 ou 9, induisant une conductivité plus élevée.

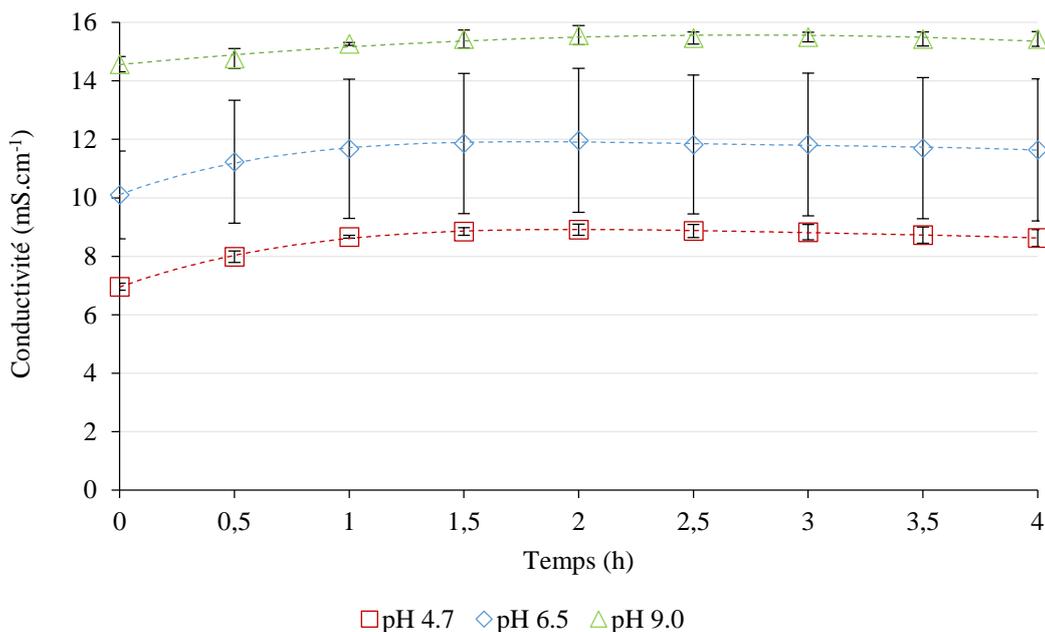


Figure 67 : Évolution des conductivités au sein de la solution d'alimentation selon la séparation d'un hydrolysate d'hémoglobine bovine (DH de 5% ; 1% p/v) par EDUF à différents pH

Les tendances observées pour l'évolution des conductivités de la solution de KCl en contrôlant le pH à 6.5 et 9 ont été similaires (**Figure 68**), avec une première phase correspondant aux deux premières heures d'EDUF avec une pente de $-0.73 \text{ mS.cm}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ($r^2 = 0.96$) pour le contrôle à pH 6.5 et une pente à $-0.72 \text{ mS.cm}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ($r^2 = 0.87$) pour le contrôle à pH 9. Ensuite, les deux conductivités ont tendu vers un plateau. En comparaison du contrôle à pH 4.7, le début de la seconde étape a été retardé de 30 min à 2 heures, comme précédemment décrit (cf. 4.3.1.1). En effet, avec l'augmentation de la valeur du contrôle du pH, les décroissances ont semblé plus linéaires, comme remarqué dans un précédent travail pour la récupération des peptides cationiques (Firdaous *et al.*, 2009).

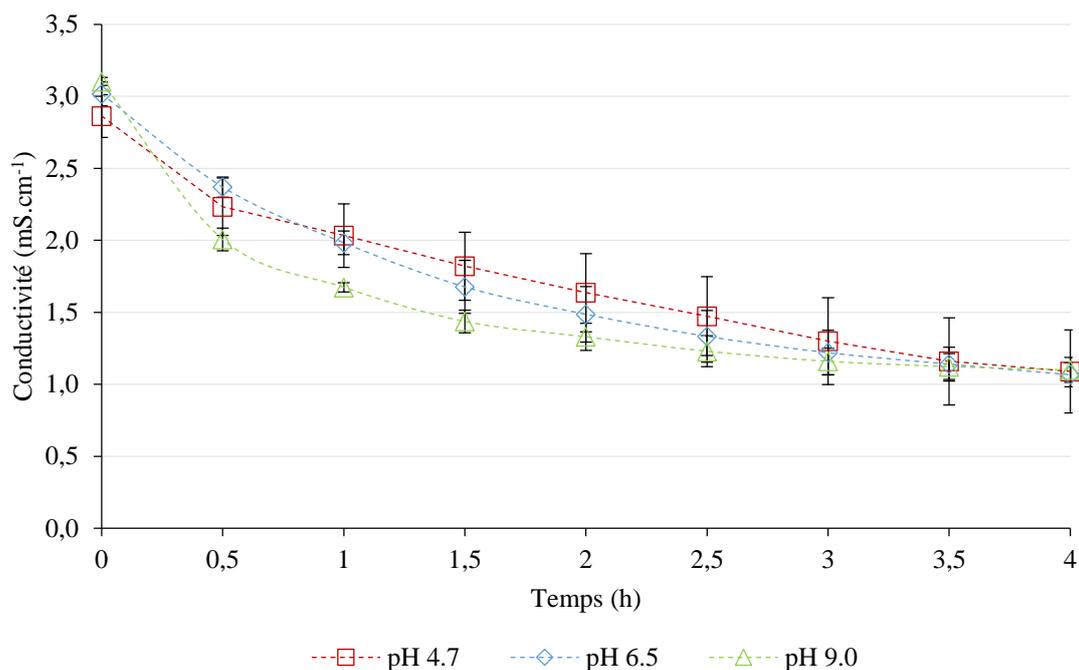


Figure 68 : Évolution des conductivités au sein de la solution de récupération pour la séparation d'un hydrolysate d'hémoglobine bovine (DH de 5% ; 1%, p/v) par EDUF, à différents pH de travail

Concernant l'intensité du courant électrique, les tendances se sont montrées similaires entre les pH 6.5 et 9 (**Figure 69**) et ont montré une première phase de décroissance jusqu'à 2 heures d'EDUF, confirmant les premières analyses portant sur les conductivités de solution de KCl.

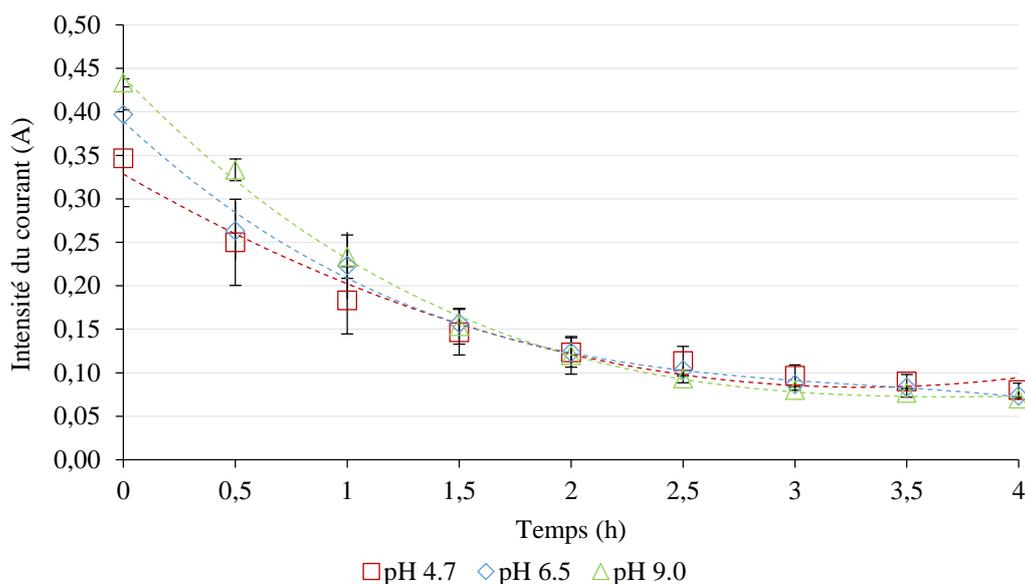


Figure 69 : Évolution de l'intensité du courant électrique au sein de la cellule d'EDUF lors de la séparation de l'hydrolysate d'hémoglobine bovine (DH 5% ; 1% p/v) selon différents pH

4.4.2.2. Effet du contrôle du pH à 6.5 et 9 sur la récupération totale en peptides

La récupération totale en peptides a diminué avec l'augmentation du pH de travail, comme montré en **Figure 70**.

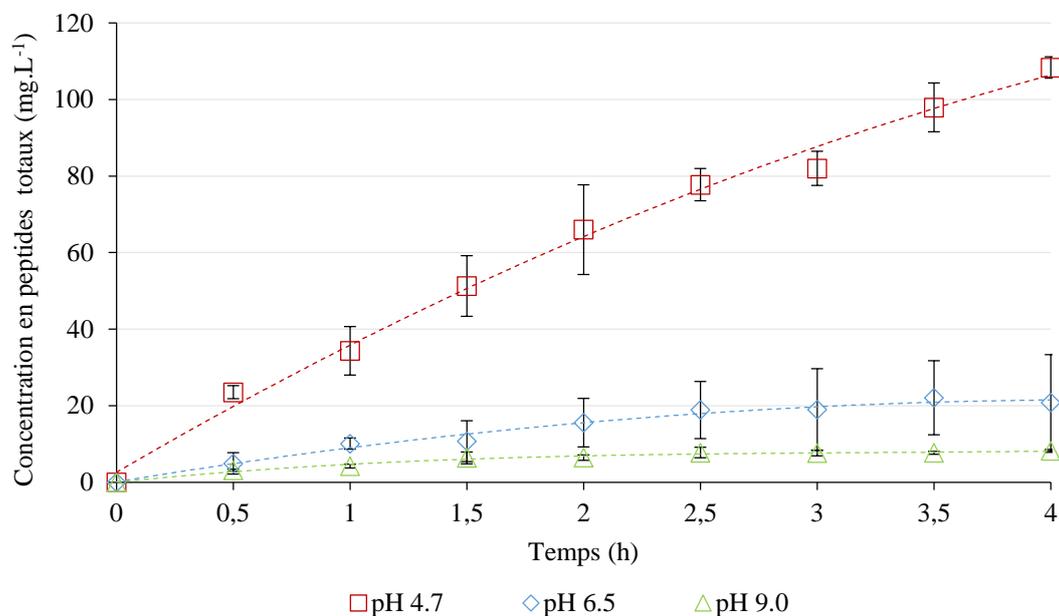


Figure 70 : Évolution de la concentration peptidique totale au sein du compartiment de récupération durant 4 heures d'EDUF pour la séparation d'un hydrolysât d'hémoglobine bovine (DH 5% ; 1%, p/v) à différents pH

Après 4 heures d'EDUF, la concentration totale en peptides était de 108.36 ± 2.80 mg.L⁻¹ pour le contrôle à pH 4.7, de 20.80 ± 12.54 mg.L⁻¹ à pH 6.5 et de 8.18 ± 0.39 mg.L⁻¹ à pH 9. De plus, les concentrations en peptides totaux durant les deux dernières heures de traitement à pH 6.5 et 9 n'ont pas évolué de manière significative, passant respectivement de 15.54 ± 6.33 à 20.80 ± 12.54 mg.L⁻¹ et de 6.46 ± 0.72 à 8.18 ± 0.39 mg.L⁻¹.

Afin de montrer les résultats du contrôle du pH après 4 heures d'EDUF sur la population peptidique récupérée, la **Figure 71** présente les différents chromatogrammes des solutions de KCl aux différents pH de travail. En effet, si la concentration totale en peptides récupérés a diminué avec l'élévation du pH de travail, il était aussi certain que le nombre de peptides retrouvés au sein de la solution de KCl diminuait également.

Les analyses en spectrométrie de masse ont confirmé ce fait spectaculaire (**Tableau 21**). En travaillant à pH 4.7, 40 séquences ont été retrouvées au sein de la solution de récupération sur un total initial de 101. Travailler à pH 6.5 a presque divisé le nombre de séquences récupérées par deux. En effet, seulement 23 peptides ont été identifiés comme ayant migré au

travers de la membrane d'ultrafiltration. En augmentant le pH de travail à 9, la sélectivité du procédé s'est à nouveau améliorée, permettant de récupérer seulement 6 peptides à des concentrations significatives (**Figure 64**).

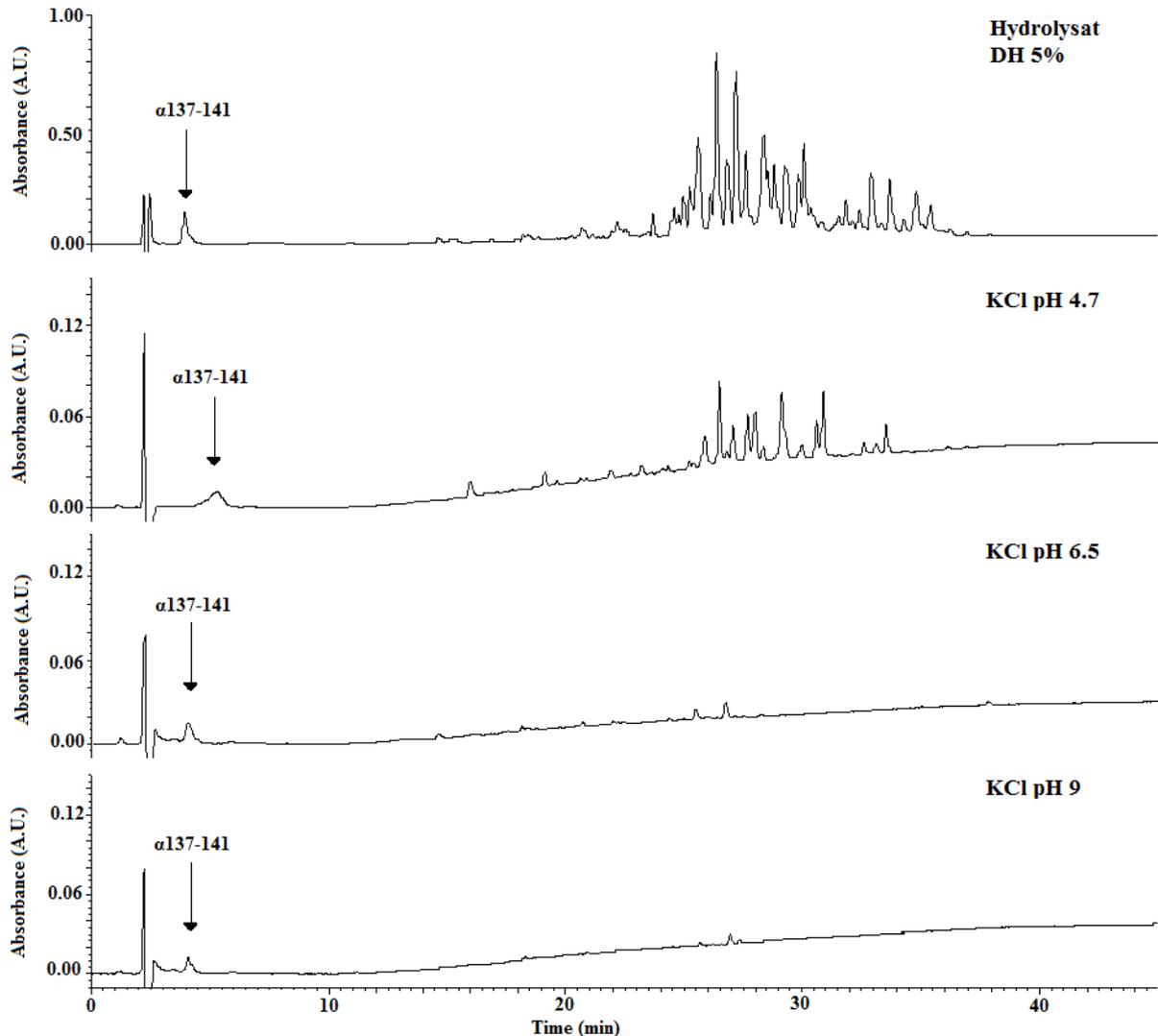


Figure 71 : Chromatogrammes comparant la récupération de peptides après 4 h d'EDUF lors de la séparation d'hydrolysate d'hémoglobine bovine (DH 5% ; 1%, p/v) à différents pH

Plus précisément, les séquences peptidiques possédant un pH_i inférieur au pH de travail de 6.5 n'ont pas migré au sein du compartiment de récupération, exceptés pour les peptides $\alpha 92-98$ et $\alpha 107-125$. Toutefois, ils possédaient des pH_i théoriques (6.25 et 6.48, respectivement) relativement proches du pH de travail (6.5).

Les autres peptides récupérés étaient en accord avec les peptides déjà retrouvés ou non au sein de la solution de KCl lors du travail à pH 4.7.

Néanmoins, 6 autres peptides pouvaient migrer à pH 6.5 et n'ont pas été retrouvés au sein de la solution de KCl. Il s'agissait des peptides α 58-64 et α 54-59 pour la famille α_2 , α 102-109, α 98-106, α 99-107 pour le troisième fragment de la chaîne α , et du peptide β 129-135 à partir de la famille β_4 (**Figure 64**). Ces peptides intermédiaires étaient en effet moins chargés positivement à pH 6.5 qu'à pH 4.7 et leurs faibles concentrations au sein de l'hydrolysate étaient probablement responsables de leur absence au sein de la solution de récupération. Également, la compétition avec les autres peptides plus chargés, présents à de plus hautes concentrations au sein de la solution d'alimentation, pouvait gêner leur passage au travers de la membrane d'ultrafiltration.

Le même raisonnement a été appliqué pour l'analyse des résultats lors du travail à pH 9. Les séquences peptidiques identifiées ont été en accord avec celles ayant déjà migré ou non lors du maintien du pH à 6.5, excepté pour le peptide β 114-124 dont le pH_i théorique (8.88) était proche de celui de travail (9).

Au final, à concentrations significatives, les peptides β 31-40, β 32-40 (de la famille β_2), β 114-124 (de la famille β_4), α 99-106 (pour la famille α_3), α 137-141 et α 129-141 (pour la famille α_4) ont été retrouvés au sein du compartiment de récupération (**Figure 64**).

Pour les peptides capables de migrer selon leur pH_i mais absents de la solution KCl, il a également été reporté dans la littérature que des pH de travail élevés induisaient la formation de charges négatives à la surface de la membrane d'ultrafiltration (Roblet *et al.*, 2013), augmentant la probabilité d'interactions entre peptides et membrane (Gourley *et al.*, 1995; Gourley *et al.*, 1998).

Au sein de la solution récupérée avec un pH de travail de 9 lors du traitement d'EDUF, d'autres séquences peptidiques ont également pu être identifiées en spectrométrie de masse, mais leurs concentrations n'étaient pas significatives, signifiant leur présence à l'état de traces.

En conclusion, l'augmentation du pH de travail a permis de diminuer le nombre de peptides récupérés, justifiant parfaitement la stratégie de purification employée. Elle a éliminé la très large majorité des peptides ayant co-migré avec le peptide actif α 137-141 lors du contrôle du pH de l'EDUF au sein des compartiments d'alimentation et de récupération à 4.7.

4.4.2.3. Effet du contrôle du pH à 6.5 et 9 sur la récupération du peptide actif α 137-141

Avec un pH_i égal à 10.5, le peptide actif α 137-141 a été retrouvé au sein des solutions de KCl, quel que soit le contrôle du pH effectué. L'évolution de sa concentration au sein de la solution de récupération au cours du traitement d'EDUF est présentée en **Figure 72**.

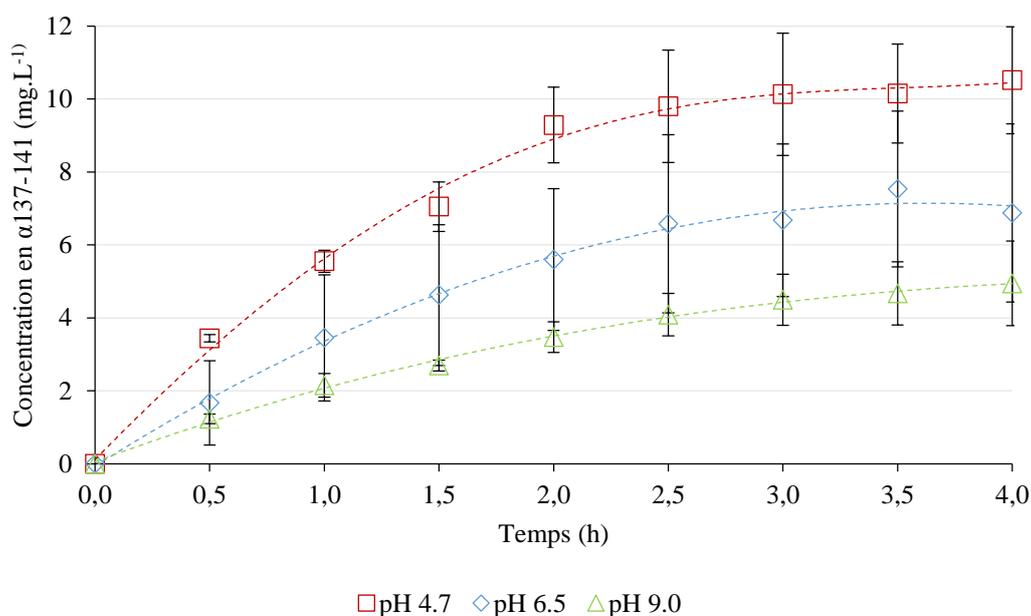


Figure 72 : Évolution de la concentration en α 137-141 au sein du compartiment de récupération durant 4 heures d'EDUF pour la séparation d'un hydrolysât d'hémoglobine bovine (DH 5% ; 1%, p/v) à différents pH

Le contrôle du pH à 9 a permis de récupérer une concentration en α 137-141 de $4,94 \pm 1,16 \text{ mg.L}^{-1}$ après 4 heures d'EDUF. Des concentrations de $6,88 \pm 2,44$ et de $10,52 \pm 1,47 \text{ mg.L}^{-1}$ ont respectivement été mesurés lors du travail à pH 6.5 et 4.7. Par conséquent, la concentration en peptide α 137-141 récupérée diminuait lorsque la valeur du contrôle du pH de travail augmentait.

Déjà constaté lors du contrôle du pH à 4.7, la concentration en α 137-141 n'évoluait plus de manière significative entre 2 et 4 heures d'EDUF lors du maintien à pH 6.5 et 9, passant respectivement de $3,42 \pm 0,42$ à $4,94 \pm 1,16 \text{ mg.L}^{-1}$ et de $5,60 \pm 1,94$ à $6,88 \pm 2,44 \text{ mg.L}^{-1}$. La diminution de la concentration en α 137-141 récupérée lors de l'élévation du pH de travail est principalement due à la diminution des charges du peptide à pH élevé. Les interactions entre le peptide α 137-141 (chargé positivement) et les autres peptides (essentiellement chargés négativement) pouvaient expliquer ce plateau après 2 heures de traitement, tout comme de possibles interactions avec la membrane d'ultrafiltration (Galier *et al.*, 2005; Gourley *et al.*,

1995; Gourley *et al.*, 1998; Lebrun *et al.*, 1998). Cette hypothèse était particulièrement à prendre en considération puisque lorsque le pH augmentait, le nombre de peptides chargés négativement au sein de l'hydrolysate augmentait également. Par conséquent, la probabilité d'interaction entre le peptide α 137-141 (chargé positivement) et les autres peptides (chargés négativement) augmentait aussi. Cette hypothèse menait à suggérer que la migration du peptide actif α 137-141 au travers de la membrane d'ultrafiltration serait moins importante à pH élevé, et donc plus conséquente à pH faible. Les résultats obtenus ont été en accord avec ce raisonnement.

Néanmoins, l'un des objectifs principaux de cette étude était d'améliorer la teneur en α 137-141 au sein de la solution de KCl. Avec l'élévation du pH de travail, la teneur en α 137-141 récupérée a augmenté. À pH 4.7, un facteur d'enrichissement de 9 a pu être observé avec une pureté en α 137-141 de $6.69 \pm 0.94\%$. À pH 6.5, le facteur d'enrichissement a été multiplié par 5 comparé à celui obtenu à un pH de 4.7. En effet, il était alors de 50.68 ± 13.37 , ce qui correspondait à une teneur en α 137-141 de l'ordre de $37.20 \pm 9.89\%$ au sein du compartiment de récupération. Cependant, la meilleure teneur a été obtenue pour le traitement réalisé à un pH de 9. En effet, la pureté récupérée en α 137-141 était de $56.13 \pm 11.26\%$, représentant un facteur d'enrichissement spectaculaire de plus de 75.

Enfin, il est important de noter que la pureté en α 137-141 n'a plus évolué de manière significative après 2 heures d'EDUF pour le travail à pH 6.5 et 9, avec des valeurs respectives à 2 heures de 36.17 ± 7.93 et $50.14 \pm 7.93\%$. Ceci était corrélé au ralentissement observé de la migration peptidique après 2 heures d'expérience, excepté pour le pH 4.7 où la migration s'était effectuée de manière plus linéaire durant les 4 heures d'EDUF (**Figure 70**). Dans l'objectif de récupérer la meilleure teneur en α 137-141, il serait donc préférable de limiter la durée du traitement d'électrodialyse à 2 heures au lieu des 4 heures effectuées jusqu'à présent.

Pour conclure cette partie sur l'influence du pH de travail en EDUF, il a été démontré que le pH de travail à 9 était la méthode la plus efficace pour récupérer le peptide actif α 137-141 avec un facteur d'enrichissement important, d'une valeur maximale de 75. Ainsi, la pureté en α 137-141 passait de $0.74 \pm 0.10\%$ à $56.13 \pm 11.26\%$ au sein du compartiment de récupération. De plus, à ce pH, cette stratégie a permis de récupérer seulement 6 peptides avec des concentrations significatives sur un total initial de 101, justifiant la bonne démarche de purification entreprise.

Ainsi, si le peptide actif α 137-141 a été obtenu avec une haute pureté, cela laissait présager que son activité biologique a été enrichie. Néanmoins, la concentration récupérée restait faible, rendant difficile la mise en place de la valorisation des fractions obtenues après séparation des hydrolysats peptidiques par EDUF.

Par conséquent, la concentration en α 137-141 récupéré se devait d'être améliorée. La stratégie adoptée pour la suite a alors été d'augmenter la concentration peptidique au sein de la solution d'alimentation dans le but d'améliorer la productivité globale du procédé.

4.5. Effet de l'augmentation de la concentration peptidique sur la séparation sélective du peptide actif α 137-141

De précédentes études ont montré l'influence de la concentration peptidique au sein de la solution d'alimentation sur le fractionnement d'hydrolysats, notamment en termes de sélectivité du procédé. Dans la littérature, il a été reporté que l'augmentation de la concentration de la solution d'alimentation augmentait du même facteur la récupération des composés d'intérêt (Bargeman *et al.*, 2002; Galier *et al.*, 2004). Cependant, une étude récente a montré que l'augmentation de la concentration peptidique de l'hydrolysats en EDUF ne permettait pas de récupérer les peptides cationiques du même facteur (Noudou *et al.*, 2016). Néanmoins, en l'état actuel des connaissances, aucune étude n'a fait état de l'influence de la concentration peptidique sur la récupération sélective préférentielle d'un peptide en particulier.

Par conséquent, l'objectif de cette partie a été d'étudier l'influence de la concentration de l'hydrolysats de cruor, conformément aux hydrolyses réalisées au sein du Chapitre 3, sur la séparation sélective du peptide actif α 137-141 afin de valoriser au mieux le co-produit.

En regard des résultats obtenus au cours de la partie précédente, la durée de l'électroséparation a été réduite à deux heures.

4.5.1. Évolution des paramètres électrodialytiques selon la concentration peptidique de la solution d'alimentation

Concernant le compartiment de l'hydrolysate, les conductivités initiales n'étaient pas significativement différentes quelle que soit la concentration peptidique testée, avec une valeur moyenne de $14 \pm 0.38 \text{ mS.cm}^{-1}$ (**Figure 73**). Leurs évolutions durant le traitement d'EDUF ont été similaires pour les quatre concentrations testées, avec une valeur finale moyenne de $16.14 \pm 0.51 \text{ mS.cm}^{-1}$.

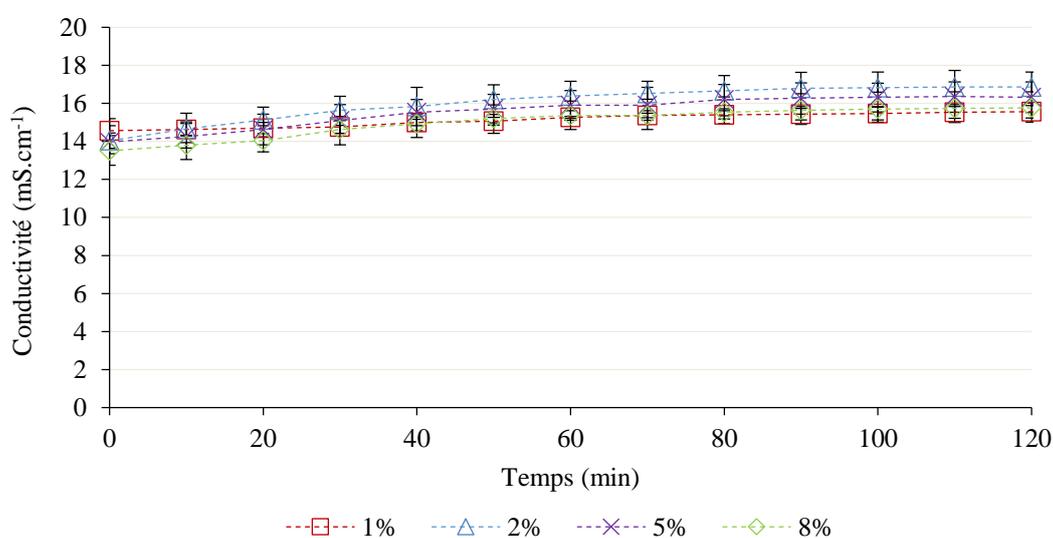


Figure 73 : Évolution des conductivités au sein de l'hydrolysate (DH 5%) selon différentes concentrations peptidiques (p/v)

En revanche, la conductivité du compartiment de récupération a diminué tout au long du traitement d'EDUF quelle que soit la concentration peptidique testée (**Figure 74**). Pour la solution de KCl lors de l'étude de la concentration à 1% (p/v), l'allure de la courbe a été similaire à celle de 2% (p/v) avec une valeur initiale moyenne de 2.78 mS.cm^{-1} et une valeur finale moyenne de 1.40 mS.cm^{-1} . Cependant, les conductivités en fin d'expérience se sont avérées être supérieures pour l'étude à 5 et 8% (p/v), avec une valeur moyenne de 2.80 mS.cm^{-1} . Pour toutes les concentrations testées, une tendance linéaire a été observée avec une pente moyenne de $-0.012 \text{ mS.cm}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ($r^2 = 0.88$).

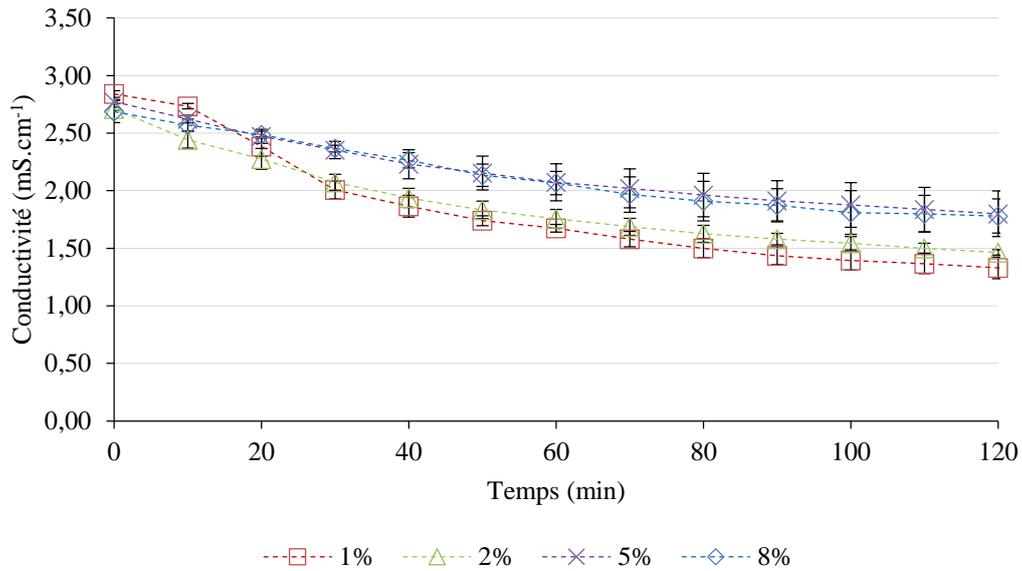


Figure 74 : Évolution des conductivités au sein du compartiment de récupération selon différentes concentrations peptidiques (p/v)

Concernant l'intensité du courant électrique, son comportement durant l'électroséparation n'a pas été significativement différent quelle que soit la concentration peptidique utilisée en alimentation (**Figure 75**), ce qui a été cohérent avec l'évolution de la résistance apparente du système au sein d'une précédente étude (Noudou *et al.*, 2016).

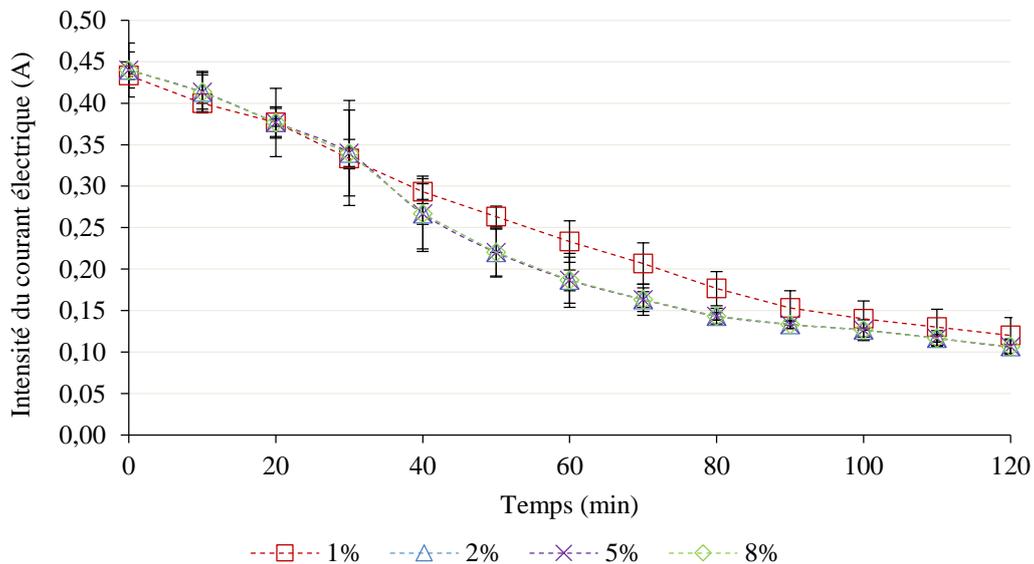


Figure 75 : Évolution des intensités du courant électrique selon différentes concentrations peptidiques (p/v) de l'hydrolysate (DH 5%)

4.5.2. Effet de la concentration peptidique de l'hydrolysate sur la migration totale en peptides

La **Figure 76** présente la migration peptidique totale pour les quatre concentrations d'hydrolysate testées (1, 2, 5 et 8%, p/v) durant les deux heures d'EDUF.

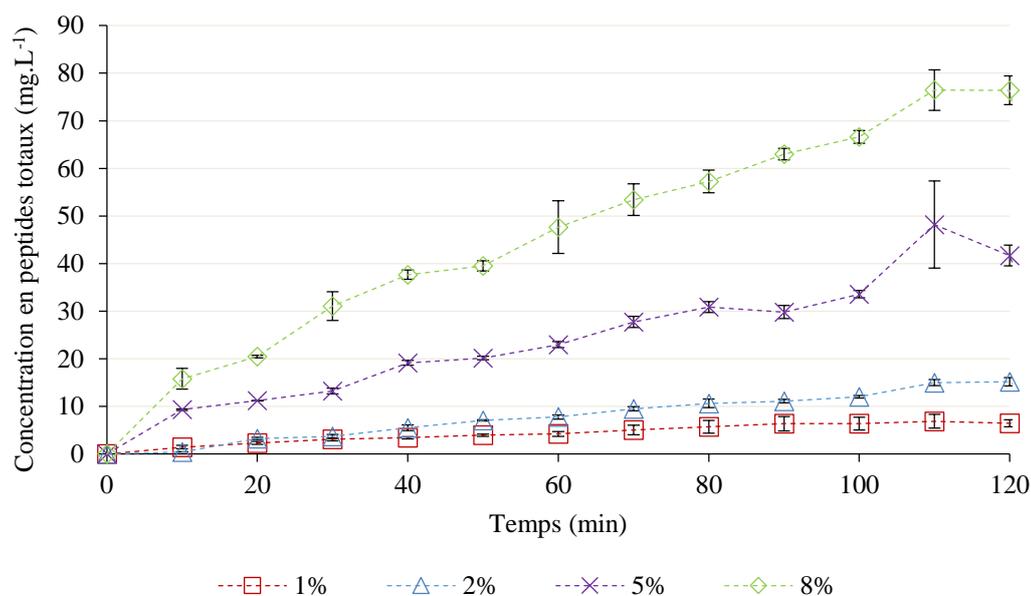


Figure 76 : Migration des peptides totaux au sein du compartiment de récupération durant 2 heures d'EDUF

Comme précédemment observé, la concentration en peptides totaux au sein de la solution de récupération a atteint un maximum de $6.46 \pm 0.72 \text{ mg.L}^{-1}$ pour la séparation de l'hydrolysate à 1% (p/v). La concentration totale en peptides récupérée a été doublée ($15.19 \pm 0.72 \text{ mg.L}^{-1}$) avec l'utilisation de l'hydrolysate à 2% (p/v). Ensuite, la séparation de l'hydrolysate à 5% (p/v) a permis une récupération peptidique 6.4 fois supérieure ($41.70 \pm 2.17 \text{ mg.L}^{-1}$). Enfin, l'augmentation de la concentration peptidique récupérée a été la plus importante avec l'hydrolysate à 8% (p/v) comme solution d'alimentation. En effet, si la concentration peptidique était initialement 8 fois supérieure à l'hydrolysate de 1% (p/v), la récupération des peptides y a été 12 fois plus importante ($76.39 \pm 3.03 \text{ mg.L}^{-1}$).

Pour expliquer cela, la **Figure 77** est proposée et présente les différents chromatogrammes pour les solutions de récupération obtenues après 2 heures d'EDUF avec les quatre concentrations peptidiques testées. Avec l'augmentation de la concentration de l'hydrolysate, la population peptidique a évolué. Principalement, la population peptidique avec

des temps de rétention compris entre 24 et 30 min a augmenté en intensité, signifiant qu'ils étaient davantage présents lors de la séparation d'hydrolysats à hautes concentrations. Ces temps de rétention correspondaient à des peptides hydrophobes ou de haute masse moléculaire.

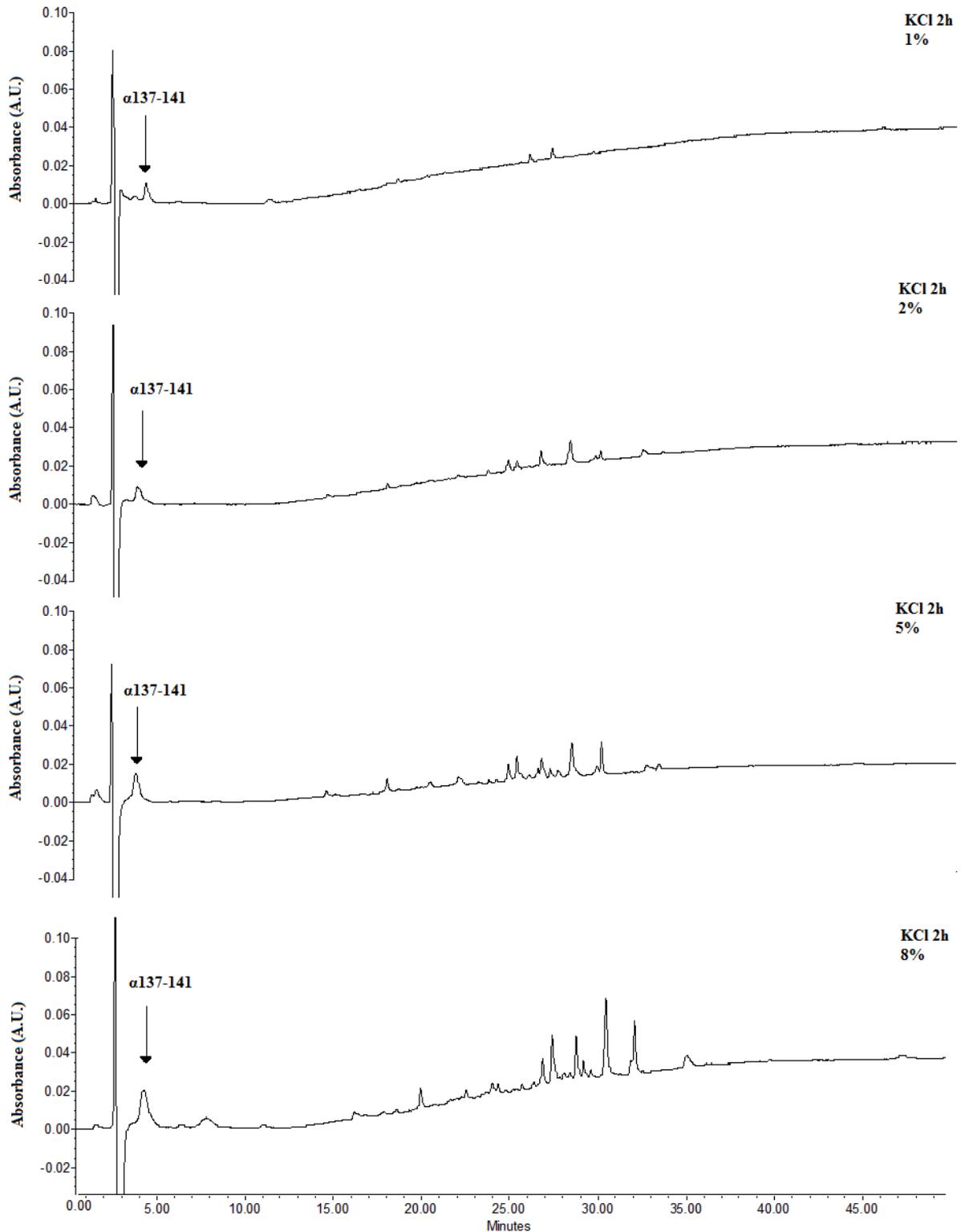


Figure 77 : Profils chromatographiques des solutions de récupération obtenues après 2 h d'EDUF à pH 9 et selon différentes concentrations peptidiques en alimentation

Les données de spectrométrie de masse ont complété ces premières analyses (**Tableau 22**). 14 peptides ont été retrouvés en travaillant avec les concentrations peptidiques de 2, 5 et 8% (w/v) en solution d'alimentation contre 6 lors de la séparation de l'hydrolysats à 1% (p/v).

Tableau 22 : Peptides identifiés au sein de la solution KCl lors de la séparation d'hydrolysats d'hémoglobine bovine (DH 5% ; 2, 5 et 8%, p/v)

Position	Séquence	Masse moléculaire (Da)	pH _i
α137-141	TSKYR	653	10.50
α 136-141	LTSKYR	766	10.47
α 99-105	KLLSHSL	796	9.91
α 135-141	VLTSKYR	865	10.46
α99-106	KLLSHSL	909	9.91
β 130-139	QKVVAGVANA	956	9.83
α 134-141	TVLTSKYR	966	10.40
β32-40	VVYPWTQRF	1195	9.81
α 34-43	LSFPTTKTYF	1204	9.74
α 37-46	PTTKTYFPHF	1238	10.09
β114-124	ARNFGKEFTPV	1247	10.18
β31-40	LVVYPWTQRF	1308	9.83
α129-141	LANVSTVLTSKYR	1451	10.47
α 34-46	LSFPTTKTYFPHF	1586	9.74

(les **peptides en gras** ont été identifiés également à 1%, p/v)

Il est à noter que les 8 autres peptides identifiés étaient présents de manière non-significative au sein de la solution de récupération pour l'hydrolysats à 1% (p/v), témoignant de leur concentration à l'état de traces. En accord avec une étude précédente (Noudou *et al.*, 2016), le transport sélectif des peptides riches en arginine (R) et/ou lysine (K) était amélioré lors de l'augmentation de la concentration peptidique au sein de la solution d'alimentation. En dépit de leur présence plus importante lors de la séparation d'hydrolysats à hautes concentrations, les mêmes séquences peptidiques ont été identifiées au sein de la solution de récupération quelle que soit la concentration peptidique testée à partir de 2% (p/v) et possédaient toutes au moins une arginine et/ou une lysine. En effet, aucune variation de la sélectivité du transfert des peptides n'avait été observée lorsque la densité de courant limite était dépassée en EDUF (Roblet *et al.*, 2013). Or, par rapport à nos précédentes analyses, la densité de courant limite est rapidement atteinte au cours du traitement d'EDUF avec les conditions de séparation ici utilisées. Par conséquent, la sélectivité du procédé vis-à-vis de la séparation peptidique ne serait pas impactée par l'augmentation de la concentration peptidique de l'hydrolysats. Toutefois, les

interactions entre peptides lors de leur transfert pourraient laisser penser que leur teneur récupérée ne serait pas identique selon la concentration de la solution d'alimentation utilisée.

En conclusion, la concentration peptidique totale récupérée a bien augmenté avec l'élévation de la concentration d'hydrolysat testée. En effet, une concentration en peptides jusqu'à 12 fois supérieure a pu être récupérée avec un hydrolysat dont la concentration a été augmentée d'un facteur 8. Il a également été constaté que la sélectivité du procédé n'était pas impactée par l'augmentation de la concentration peptidique de l'hydrolysat en termes de séquences peptidiques retrouvées au sein de la solution de récupération.

4.5.3. Effet de la concentration peptidique de l'hydrolysat sur la récupération sélective du peptide actif α 137-141

La concentration en α 137-141 a évolué de manière linéaire tout au long des 2 heures d'EDUF, excepté pour les 10 dernières minutes d'expérience (**Figure 78**), notamment pour la séparation des hydrolysats à une concentration peptidique de 5 et 8% (p/v). Ceci permettait de justifier à nouveau la réduction du temps d'expérience à 2 heures.

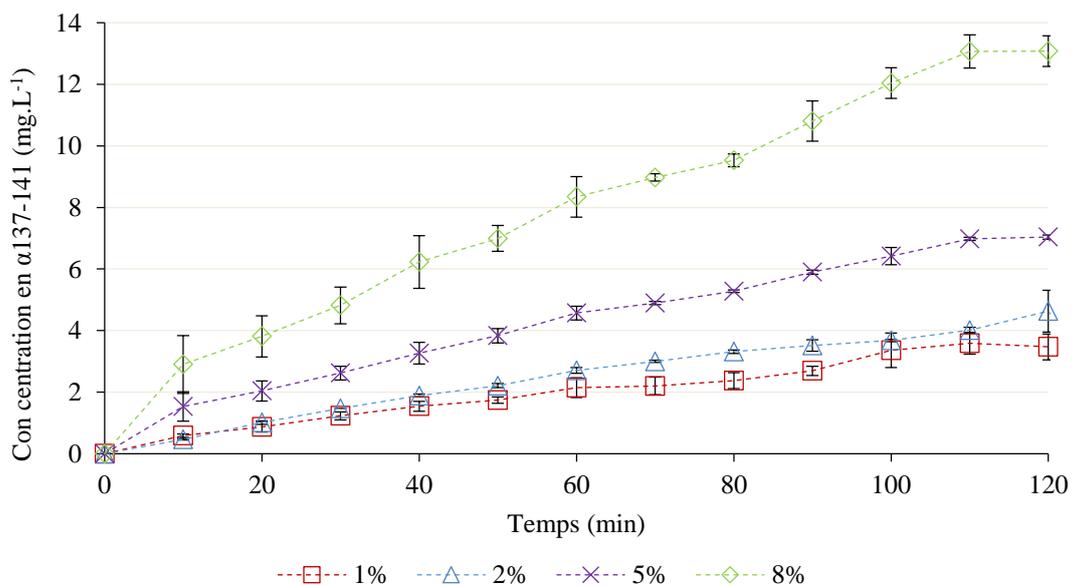


Figure 78 : Migration de l' α 137-141 au sein du compartiment de récupération durant les 2 h d'EDUF

Pour la séparation de l'hydrolysats à 1% (p/v), la concentration finale récupérée en α 137-141 a été de $3.47 \pm 0.42 \text{ mg.L}^{-1}$. Lorsque la concentration peptidique a été doublée, la concentration récupérée en α 137-141 a augmenté d'un facteur 1.3 comparé à l'hydrolysats à 1% (p/v), donnant une concentration en α 137-141 de $4.63 \pm 0.68 \text{ mg.L}^{-1}$. Avec l'hydrolysats à 5% (p/v), une concentration de α 137-141 récupérée de $7.04 \pm 0.68 \text{ mg.L}^{-1}$ a été obtenue, correspondant à une augmentation de 2 fois par rapport à la séparation de l'hydrolysats à 1% (p/v). Finalement, l'hydrolysats à 8% (p/v) a permis de récupérer une concentration en α 137-141 de $13.08 \pm 0.50 \text{ mg.L}^{-1}$, c'est-à-dire 3.7 fois supérieure à celle obtenue à 1% (p/v). Par conséquent, la récupération sélective d' α 137-141 a été améliorée avec l'élévation de la concentration peptidique de l'hydrolysats.

Néanmoins, la récupération de l' α 137-141 n'a pas montré la même tendance de facteur d'augmentation que pour les peptides totaux, qui avait été amélioré de 12 fois en augmentant la concentration peptidique à 8% (p/v), comme déjà observé pour la récupération de peptides cationiques en EDUF (Noudou *et al.*, 2016). Ainsi, l'élévation de la concentration peptidique au sein de la solution d'alimentation a diminué la teneur en α 137-141 récupérée après 2 heures d'EDUF. Respectivement, la teneur en α 137-141 récupérée était de 50.14 ± 1.61 , 29.21 ± 2.53 , 18.29 ± 1.17 et $18.47 \pm 0.74 \text{ mg.L}^{-1}$ pour un hydrolysats à 1, 2, 5 et 8% (p/v). Si l'augmentation de la concentration peptidique a bien permis d'augmenter la récupération d' α 137-141, le facteur n'a pas été le même. Pour expliquer cela, la première hypothèse était les probables interactions électrostatiques entre le peptide actif α 137-141 (chargé positivement) et les autres peptides au sein de la solution d'alimentation (la plupart chargés négativement au pH de travail de 9). De plus, en travaillant à pH 9, l'augmentation des charges négatives à la surface de la membrane d'ultrafiltration pouvait accroître la probabilité d'interactions électrostatiques entre les peptides chargés positivement sur le côté hydrolysats de la membrane d'ultrafiltration (Roblet *et al.*, 2013). Ensuite, la faible surface membranaire (de 10 cm^2) pouvait être un facteur limitant pour le transfert des peptides de la solution d'alimentation (hydrolysats) vers la solution de récupération (KCl).

Ainsi, l'augmentation de la concentration de l'hydrolysats jusqu'à 8% (p/v) a bien permis de récupérer davantage de peptide actif α 137-141 puisqu'une concentration jusqu'à 4 fois supérieure à celle retrouvée lors de la séparation d'un hydrolysats à 1% (p/v) a été retrouvée. Néanmoins, du fait de probables compétitions entre peptides lors de son transfert au travers de la membrane d'ultrafiltration, sa teneur récupérée a diminué avec l'augmentation de la concentration de l'hydrolysats testé.

Pour conclure cette partie, l'effet de l'augmentation de la concentration en peptides dans la solution d'alimentation a permis d'augmenter la concentration en peptides récupérée. De plus, la sélectivité du procédé d'EDUF n'a pas été affectée par l'augmentation de la concentration peptidique d'alimentation, puisque les mêmes peptides furent récupérés quelle que soit la concentration de l'hydrolysate testée. La récupération sélective d' α 137-141 a été également augmentée d'un facteur proche de 4 en utilisant un hydrolysate à 8% (p/v) comme solution d'alimentation comparée à la concentration de 1% (p/v). Ceci a permis de conserver un facteur d'enrichissement supérieur à 25 comparé à l'hydrolysate initial. Il a donc été mis en évidence que le peptide α 137-141 entrait en compétition avec les autres peptides co-migrant avec lui. Il pouvait être supposé que cette compétition s'intensifiait avec l'augmentation de la concentration peptidique d'alimentation.

Conclusions

La séparation sélective du peptide actif α 137-141 par EDUF à partir des hydrolysats complexes a tout d'abord montré que le degré d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine avait une influence sur la sélectivité du procédé. En effet, plus le DH était élevé, plus la séparation du peptide d'intérêt s'effectuait difficilement. En revanche, il se séparait d'une manière optimale (tant en termes de concentration que de pureté) à faible DH (5%) et lorsque les sous-unités de l'hémoglobine bovine étaient totalement hydrolysées. La population peptidique y était la plus faible dans la gamme de masses de l' α 137-141, mettant ainsi en avant la compétition entre peptides qui s'opérait si leurs caractéristiques physico-chimiques étaient proches.

Afin d'améliorer la teneur en α 137-141 obtenue, la stratégie a ensuite consisté à partir de cet hydrolysat sélectionné (DH de 5%) et d'étudier l'influence du pH de travail au sein de l'EDUF. Grâce aux séquences peptidiques identifiées par spectrométrie de masse, trois pH ont été sélectionnés afin d'éliminer le plus de peptides récupérés possibles tout en gardant le meilleur transfert d' α 137-141. Il a ainsi été montré que le pH de 9 permettait d'enrichir de 75 fois en peptide d'intérêt la fraction obtenue en comparaison de l'hydrolysat initial, en ne faisant migrer significativement que cinq autres peptides lors de la séparation d'un hydrolysat à 1% (p/v).

Ensuite, afin de pouvoir valoriser au mieux les fractions obtenues lors de leur application antimicrobienne, il a été nécessaire d'augmenter la concentration en peptides utilisée en solution d'alimentation afin de récupérer davantage de peptides actifs en une seule étape de séparation par EDUF. Il a ainsi été montré que l'augmentation de la concentration peptidique de l'hydrolysat à 8% (p/v) permettait de récupérer une concentration jusqu'à 4 fois supérieure en peptide actif α 137-141. Ceci donnait lieu à un enrichissement d'un facteur 25 par rapport à l'hydrolysat initial et pouvait laisser présager une valorisation intéressante du co-produit.

La suite du projet consistait désormais à mettre en évidence l'activité antimicrobienne des fractions obtenues après séparation par EDUF.

L'enjeu y était double. Dans un premier temps, il s'agissait de montrer que le procédé d'EDUF n'avait pas un effet inhibiteur de l'activité peptidique. Dans un second temps, la possible valorisation des fractions peptidiques en tant que composés à haute valeur ajoutée issus d'un co-produit de l'industrie agroalimentaire se devait d'être démontrée.

Production scientifique

Articles

R. Przybylski, L. Bazinet, M. Kouach, J.-F. Goossens, P. Dhulster, L. Firdaous, N. Nedjar. “Effect of the hydrolysis degree on the selective separation by electrodialysis with ultrafiltration membranes of an antimicrobial peptide derived from slaughterhouse by-product”. *Separation and Purification Technology*. *Soumis*.

R. Przybylski, L. Firdaous, L. Bazinet, M. Kouach, J.-F. Goossens, P. Dhulster, N. Nedjar. “Effects of feed pH and concentration on the selective electroseparation of an antimicrobial peptide from a slaughterhouse by-product”. *Separation and Purification Technology*. *Soumis*.

Communications orales

R. Przybylski, L. Firdaous, L. Bazinet, P. Dhulster, N. Nedjar (Septembre 2015). “Selective separation of an antimicrobial peptide from bovine hemoglobin hydrolysates by electrodialysis with ultrafiltration membranes”. *3th European Congress on Applied Biotechnology*, NICE, FRANCE.

R. Przybylski, L. Firdaous, L. Bazinet, M. Kouach, J.-F. Goossens, P. Dhulster, N. Nedjar (Avril 2016). “Électroséparation d’un peptide antimicrobien à partir d’un co-produit des abattoirs”. *Journée des doctorants, Club Français des Membranes*, PARIS, FRANCE.

Posters

R. Przybylski, L. Firdaous, L. Bazinet, P. Dhulster, N. Nedjar-Arroume (Septembre 2014). “Selective separation of an antimicrobial peptide from bovine hemoglobin hydrolysates by electrodialysis with ultrafiltration membranes”. *10th European Symposium on Biochemical Engineering Sciences*, LILLE, FRANCE.

R. Przybylski, L. Firdaous, L. Bazinet, P. Dhulster, N. Nedjar-Arroume (Juin 2015).
“Selective separation of an antimicrobial peptide from bovine hemoglobin hydrolysates
by electro dialysis with ultrafiltration membranes”. *12th International Congress on
Engineering and Food*, QUÉBEC CITY, CANADA.

Chapitre 5

*Valorisation des peptides actifs
comme potentiels conservateurs
des aliments*

Chapitre 5 :

Valorisation des peptides actifs comme potentiels conservateurs des aliments

La sélectivité du procédé d'EDUF ayant été démontrée pour le peptide α 137-141, il est maintenant nécessaire de montrer que l'activité antimicrobienne des fractions obtenues a été conservée suite à la séparation en EDUF des hydrolysats d'hémoglobine et de cruor bovins. Dans un premier temps, l'activité antimicrobienne a été mise en évidence contre des microorganismes dont l'hydrolysat et le peptide α 137-141 sont connus pour être inhibiteurs de leur croissance.

Ensuite, leur valorisation a été effectuée par application sur matrice alimentaire de type « viande hachée ».

5.1. Matériels et méthodes spécifiques : mise en évidence de l'activité antimicrobienne et application comme conservateurs alimentaires

L'ensemble des protocoles détaillés ci-après a été réalisé de manière stérile, le plus souvent sous hotte à flux laminaire au sein d'un poste de sécurité microbiologique (ou PSM), afin de réduire tout risque de contamination extérieure.

Chacun des résultats présentés a été réalisé au minimum en triplicata.

La mise à disposition des souches ainsi que l'apprentissage technique ont été effectués avec les précieuses aides du Dr Assaad Sila et de Corinne Boistel, technicienne au sein du laboratoire ProBioGEM.

5.1.1. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne s'est effectuée par des tests sur boîtes de Pétri gélosées, permettant de déterminer de manière qualitative le pouvoir antimicrobien de l'échantillon testé.

La détection de l'activité antimicrobienne sur un milieu gélosé est basée sur la diffusion de l'agent antimicrobien contenu dans l'échantillon testé au sein d'un milieu ensemencé par une souche bactérienne donnée. Ainsi, le pouvoir antimicrobien peut donc être déterminé contre la souche testée.

5.1.1.1. Souches bactériennes utilisées

En accord avec les précédents travaux déterminant l'activité antimicrobienne des hydrolysats d'hémoglobine bovine et peptides en étant issus (Catiau *et al.*, 2011b; Nedjar-Arroume *et al.*, 2008; Nedjar-Arroume *et al.*, 2006), quatre souches ont été sélectionnées.

Micrococcus luteus ATCC 4698 et *Listeria innocua* ATCC 33090 correspondent à des souches Gram-positif. Les deux dernières, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 font partie des bactéries à Gram-négatif.

5.1.1.2. Préparation des pré-cultures

L'activité antimicrobienne est ici déterminée selon la méthode de Parish *et al.* (2001).

Dans un premier temps, les pré-cultures sont réalisées à partir des souches référencées des bactéries testées. Pour cela, 20 μL de souches conservées sont ajoutés à 5 mL de milieu Lysogeny Broth (ou LB), puis inoculés à 37°C sous agitation. L'inoculum était, si besoin, ajusté à 10^6 UFC.mL⁻¹ pour la suite des tests. La pureté de la souche était vérifiée pour chacun des tests effectués par le biais d'un isolement réalisé sur LB gélosé.

Une relation linéaire entre le nombre d'Unités Formatrices de Colonie par mL de milieu de culture (UFC.mL⁻¹), obtenu par dénombrement, et l'absorbance à 620 nm a été établie, dont les gammes-étalon sont résumées dans le **Tableau 23**.

Tableau 23 : Dénombrement des souches bactériennes par mesure de la densité optique

Souches	Durée d'incubation	DO à 620 nm	Inoculum correspondant	Log ₁₀ (UFC.mL ⁻¹) = f(DO _{620nm})	r ²
<i>Micrococcus luteus</i>	2 à 8 h	0.04 < DO ₆₂₀ < 0.79	7.10 ⁵ à 2,4.10 ¹¹	8.34 DO ₆₂₀ + 5.54	0.999
<i>Listeria innocua</i>	2 à 8 h	0.10 < DO ₆₂₀ < 0.94	10 ⁸ à 4,6.10 ¹²	5.03 DO ₆₂₀ + 7.63	0.999
<i>Escherichia coli</i>	2 à 12 h	0.20 < DO ₆₂₀ < 0.90	6.10 ⁹ à 4.10 ¹²	4.00 DO ₆₂₀ + 8.98	0.979
<i>Salmonella enteritidis</i>	1 à 3 h	0.07 < DO ₆₂₀ < 0.45	10 ⁹ à 6.10 ¹²	9.93 DO ₆₂₀ + 8.25	0.993

5.1.1.3. Réalisation du test antimicrobien sur boîte de Pétri

De manière parallèle, étaient préparées de façon stérile des boîtes de Pétri contenant 15 mL de milieu LB gélosé.

Après refroidissement, leur ensemencement est effectué par une méthode d'inondation constituant à ajouter 2 mL de suspension bactérienne en surface de la gélose. Après repos de 15 min afin de laisser la pré-culture diffuser, l'excédent est retiré. La boîte est mise à sécher 15 min sous la hotte à flux laminaire.

À l'aide d'un gabarit stérile, cinq puits sont ensuite découpés dans la gélose pour y accueillir les échantillons. Pour chacune des boîtes est placé un témoin positif, inhibant la croissance bactérienne telle que l'ampicilline, à la même concentration que les échantillons testés afin de permettre la comparaison des résultats par mesure des halos d'inhibition. Un témoin négatif correspondant au solvant (de l'eau ultrapure dans le cas ci-présent) est également déposé. Le tout est disposé de manière semblable à ce qui est montré en **Figure 79**.

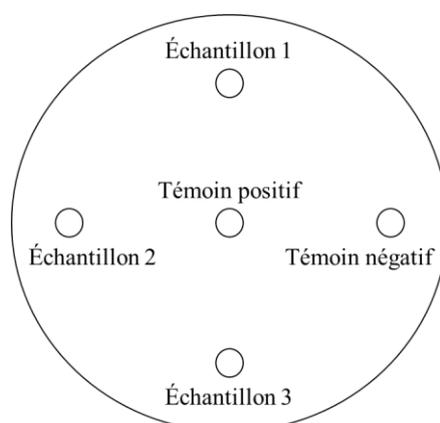


Figure 79 : Schéma de la boîte de Pétri utilisée pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne

20 μ L d'échantillon à 1% (p/v) sont déposés par puits, après leur stérilisation à froid par le biais d'un filtre en acétate de cellulose (0.20 μ m). Le tout est laissé durant 2 h à 4°C afin de permettre la diffusion des échantillons dans la gélose.

Enfin, les boîtes sont incubées durant 24 h à 37°C.

Les résultats sont lus par mesure du halo d'inhibition autour du puits dans lequel a été déposé l'échantillon. Plus le halo d'inhibition possède un diamètre élevé, plus le pouvoir antimicrobien de l'agent déposé à une concentration donnée est important.

Néanmoins, il est à préciser que cette technique a ici été utilisée de manière informative et non quantitative de l'activité. Principalement, elle a servi à vérifier la présence ou non de l'activité antimicrobienne au sein de l'échantillon et non pas à quantifier le pouvoir antimicrobien de l'échantillon testé.

5.1.2. Application des peptides actifs comme conservateurs alimentaires

5.1.2.1. Préparation des échantillons et suivi de l'expérience

Afin d'assurer la reproductibilité de l'expérience, les tests ont été menés en triplicatas avec plusieurs lots de viande, achetés à des dates différentes.

La viande de bœuf sélectionnée était composée de bœuf commercial contenant 0.28% (p/p) de sel, 14% (p/p) de graisse et environ 18% (p/p) de protéines.

Les morceaux de viande ont été préparés dans les plus strictes conditions d'asepsie afin d'éviter au maximum des contaminations extérieures. Quatre conditions de stockage ont été testées :

- 1) Le contrôle, c'est-à-dire la viande sans additif,
- 2) La viande à différentes concentrations d'un conservateur synthétique connu, l'hydroxytoluène butylé (ou BHT) : 0.1 et 0.5% (p/p),
- 3) La viande à différentes concentrations d' α 137-141 : 0.1 et 0.5% (p/p),
- 4) La fraction d'EDUF a été utilisée à 0.5% (p/p).

Le conservateur, sous forme de poudre, a été ajouté à la viande après pesée. L'ensemble a été mélangé par le biais d'un mixeur. Ensuite, des morceaux de viande sont confectionnés et enveloppés dans du film polyéthylène à usage alimentaire. Les différents morceaux sont conservés à 4°C pour une durée maximale de 14 jours.

5.1.2.2. Évaluation de l'oxydation des lipides

L'oxydation des lipides a été quantifiée *via* la technique décrite par Witte *et al.* (1970), mesurant les substances réagissant avec l'acide 2-thiobarbiturique. 5 g de viande hachée ont été ajoutés à 12.5 mL d'une solution d'acide phosphorique (2 M) contenant 20% (p/v) d'acide trichloroacétique (ou TCA). Ensuite, l'ensemble a été transféré dans 25 mL d'eau ultrapure, puis filtré. 5 mL de ce filtrat ont été ajoutés à 5 mL d'une solution d'acide 2-thiobarbiturique (0.005 M).

L'absorbance a été lue à 520 nm après 17 heures de réaction à température ambiante. Les résultats obtenus sont exprimés en équivalents de malondialdéhyde par kg de viande (mg MDA/ kg de viande).

5.1.2.3. Analyses microbiologiques

Différents comptages microbiologiques ont été réalisés aux jours 0, 2, 4, 7, 9, 11 et 14 de stockage à 4°C. 5 g de viande pour chacune des conditions testées ont été ajoutés à 45 mL d'eau peptonée stérile à 0.1% (p/v) dans un sac stérile pour *stomacher*. L'homogénéisation s'est déroulée à 300 min⁻¹ pour une durée de 2 min. Des aliquotes ont ensuite été préparées pour des dilutions allant de 10⁻¹ à 10⁻⁵. 100 µL de celles-ci ont été prélevées et étalées sur boîtes de Pétri avec différents milieux sélectifs.

Le Plate Count Agar (PCA) pour les colonies totales, le Potato Dextrose Agar (PDA) pour les levures et les moisissures, le Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar pour les bactéries lactiques et le Violet Red Bile Lactose (VRBL) agar pour les bactéries coliformes ont été utilisés. L'ensemble des étalements a été incubé à 37°C pour une durée de 24 h.

Les résultats sont exprimés en log₁₀ d'unités formatrices de colonies (UFC) par gramme de viande (log₁₀ UFC/g).

5.2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne du peptide actif α 137-141 et de la fraction d'EDUF obtenue à pH 9 et une concentration initiale en hémoglobine bovine de 8% (p/v)

Du fait de la faible surface membranaire utilisée (10 cm²), la fraction d'EDUF utilisée pour l'application sur matrice alimentaire a été celle permettant le meilleur compromis entre concentration en α 137-141 récupérée et pureté. La fraction d'EDUF à une C_{HB} de 8% (p/v) a donc été sélectionnée. Pour rappel, elle comportait une teneur en α 137-141 estimée à plus de 18%, pour une concentration de 13.08 ± 0.50 mg.L⁻¹. La concentration en peptides totaux était quant à elle de 76.39 ± 3.03 mg.L⁻¹.

Toutefois, afin de standardiser les tests, chacun des échantillons pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne a été réalisée avec une concentration de 1% (p/v).

Suivant la stratégie expérimentale établie tout au long du projet, les échantillons ici testés ont été : le peptide actif α 137-141 purifié, l'hydrolysats total à un DH de 5% et la fraction d'EDUF à pH 9 et une C_{HB} de 8% (p/v). De par les travaux précédents (Catiau *et al.*, 2011b; Nedjar-Arroume *et al.*, 2008; Nedjar-Arroume *et al.*, 2006), l'activité antimicrobienne est envisagée principalement contre quatre souches, *Micrococcus luteus* et *Listeria innocua* pour les Gram-positifs et *Escherichia coli* et *Salmonella enteritidis* pour les Gram-négatifs. Il est important de préciser que ces souches sont couramment impliquées dans l'altération biologique des denrées alimentaires, tant dans le secteur de la production que de la distribution (Borch *et al.*, 2002). Les résultats obtenus ont été résumés au sein du **Tableau 24**.

Tableau 24 : Activité antimicrobienne du peptide actif 137-141, de l'hydrolysats total à un DH de 5% et de la fraction d'EDUF par mesure du halo d'inhibition (en mm)

	Gram -		Gram +	
	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>L. innocua</i>	<i>M. luteus</i>
α 137-141 pur	12 ± 3	16 ± 3	14 ± 3	13 ± 3
Hydrolysats total (C _{HB} 1% et DH 5%)	12 ± 2	8 ± 2	11 ± 2	12 ± 1
Fraction d'EDUF (C _{HB} 8 et DH 5%)	13 ± 3	14 ± 3	12 ± 2	11 ± 2

Les activités retrouvées pour l'hydrolysats total d'un DH de 5% étaient donc en accord avec les travaux précédents (Nedjar-Arroume *et al.*, 2008; Nedjar-Arroume *et al.*, 2006). Il est également remarqué que le peptide α 137-141 était actif contre l'ensemble des souches testées, Gram-positives et Gram-négatives, comme précédemment décrit par Catiau *et al.* (2011b).

Concernant la fraction d'EDUF testée, l'activité a également été retrouvée contre les quatre souches testées. De plus, il est à noter que l'effet antimicrobien est retrouvé de manière plus significative contre *Salmonella enteritidis*, au contraire de l'hydrolysats qui présentait une activité plus modérée contre cette souche. Ceci pouvait donc laisser suggérer un enrichissement de l'activité détectée avec la fraction d'EDUF par rapport à l'hydrolysats de départ dont elle en est extraite. Également, ces résultats permettaient de confirmer que l'EDUF n'endommageait pas les fonctionnalités des peptides.

L'enrichissement d'activité pouvait être dû à la plus haute teneur en peptide α 137-141 au sein de la fraction d'EDUF ($18.47 \pm 0.74\%$) contrairement à l'hydrolysats initial ($0.74 \pm 0.10\%$). Également, et en accord avec le **Tableau 22**, d'autres peptides participent à l'activité antimicrobienne au sein de cet extrait. Ils sont recensés au sein du **Tableau 25**.

Tableau 25 : Activités antimicrobiennes des peptides retrouvés au sein de la fraction d'EDUF

Position	Séquence	Activité décrite	Références
α 137-141	TSKYR	Oui	Catiau <i>et al.</i> (2011b)
α 136-141	LTSKYR	Non	/
α 135-141	VLTSKYR	Non	/
α 134-141	TVLTSKYR	Non	/
α 99-105	KLLSHSL	Oui	Adje <i>et al.</i> (2011a)
α 99-106	KLLSHSLL	Oui	Adje <i>et al.</i> (2011a)
α 129-141	LANVSTVLTSKYR	Non	/
α 37-46	PTTKTYFPHF	Oui	Nedjar-Arroume <i>et al.</i> (2008)
α 34-43	LSFPTTKTYF	Non	/
α 34-46	LSFPTTKTYFPHF	Oui	Nedjar-Arroume <i>et al.</i> (2008)
β 130-139	QKVVAGVANA	Non	/
β 114-124	ARNFGKEFTPV	Oui	Adje <i>et al.</i> (2011a)
β 32-40	VVYPWTQRF	Non	/
β 31-40	LVVYPWTQRF	Non	/

Au sein de ces résultats, il était à noter que les peptides α 136-141, α 135-141, α 134-141 et α 129-141 étaient des précurseurs potentiels du peptide actif α 137-141 dont l'activité antimicrobienne a été précédemment décrite et clairement mise en évidence. L'ensemble de ces peptides dérivant du précurseur α 107-141 et contenant le déterminant antimicrobien minimal

Lys-Tyr-Arg (KYR) suggèrent fortement qu'ils possédaient tous une activité antimicrobienne, sachant également que le plus grand précurseur connu, l' α 107-141, en possède une également (Catiau *et al.*, 2011b). Les peptides α 99-105, α 99-106 et β 114-124 ont une activité qui a aussi été précédemment décrite (Adje *et al.*, 2011a), tout comme les peptides α 34-46 et α 37-46 (Nedjar-Arroume *et al.*, 2008).

Afin d'approfondir ces résultats, le **Tableau 26** reprend l'ensemble des concentrations minimales inhibitrices, ou CMI, relevées dans la littérature pour les peptides retrouvés dans la fraction d'EDUF dont l'activité antimicrobienne a déjà été décrite. Principalement, les activités antimicrobiennes démontrées se dirigeaient vers *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* ainsi que *Salmonella enteritidis*.

Tableau 26 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour les peptides retrouvés au sein de la fraction d'EDUF

Position	Séquence	<i>M. luteus</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>
α 137-141	TSKYR	9 ^a	1 ^a	9 ^a	5 ^a
α 99-105	KLLSHSL	39 ^b	39 ^b	78 ^b	- ^c
α 99-106	KLLSHSLL	34 ^b	34 ^b	68 ^b	nr
α 37-46	PTTKTYFPHF	1 ^d	1 ^d	9 ^d	9 ^d
α 34-46	LSFPTTKTYFPHF	5 ^d	1 ^d	9 ^d	5 ^d
β 114-124	ARNFGKEFTPV	6 ^b	6 ^b	12 ^b	nr

CMI (μ M) ; - : absence d'effet antimicrobien ; nr : non renseignée

Références : ^a : Catiau *et al.*, 2011b ; ^b : Adje *et al.*, 2011a ;

^c : Adje *et al.*, 2011b ; ^d : Nedjar-Arroume *et al.*, 2008

Les CMI décrites indiquaient que le peptide α 137-141 figurait parmi les plus actifs au sein de la fraction. En effet, plus la CMI (exprimée en μ M) est faible, plus l'activité antimicrobienne contre la souche étudiée est importante. De ce fait, l' α 137-141 se situait comme le peptide le plus actif de la fraction contre les souches de *Listeria innocua*, *Escherichia coli* et *Salmonella enteritidis*, les CMI étant les plus basses des peptides analysés. Elles étaient similaires pour ces trois souches au peptide α 34-46 qui possède une CMI contre *Micrococcus luteus* légèrement plus faible que le peptide α 137-141 (respectivement de 5 et 9 μ M).

De par l'importante teneur du peptide α 137-141 au sein de la fraction d'EDUF étudiée ($18.47 \pm 0.74\%$), il a été suggéré que la majeure partie de l'activité antimicrobienne de la fraction était générée par son important enrichissement lors de la séparation de l'hydrolysate peptidique avec un facteur qui était supérieur à 25.

5.3. Application du peptide α 137-141 au sein d'une matrice alimentaire de type « viande hachée »

5.3.1. Évolution de l'oxydation des lipides durant le stockage

L'oxydation des lipides est un facteur important impliqué dans le processus de rancissement de la viande. Pendant le stockage de la viande à 4°C, l'oxydation des lipides a été évaluée par la mesure des substances réactives à l'acide thiobarbiturique ou TBARS (Witte *et al.*, 1970). Les résultats sont présentés dans la **Figure 80**. Les TBARS sont produits durant la seconde phase d'auto-oxydation durant laquelle les peroxydes sont oxydés en aldéhydes et en cétones tels que les malondialdéhydes (MDA).

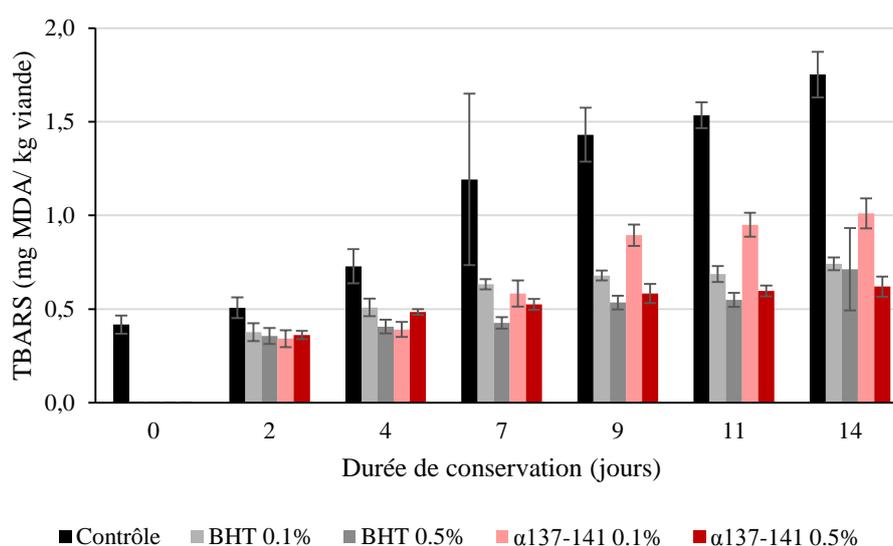


Figure 80 : Évaluation de l'oxydation des lipides de la viande hachée traitée avec le peptide α 137-141 et le BHT aux concentrations de 0.1 et de 0.5% (*p/p*) durant le stockage sous réfrigération (4°C)

Pour l'ensemble des échantillons de viande testés, les TBARS ont augmenté tout au long des 14 jours qu'a duré l'expérience. Comme attendu, l'effet a été le plus marquant pour le contrôle (ne possédant aucun additif). Les valeurs de TBARS ont été les plus élevées pour cette condition à la fin du stockage que pour les autres, comportant l'additif ($p \leq 0.05$). Cependant, il n'y a pas de différence significative entre les quatre groupes traités durant les sept premiers jours d'expérience. Néanmoins, leurs valeurs de TBARS ont été significativement plus faibles que le contrôle à partir du jour 2, d'un facteur 2 environ. À partir du jour 9, les échantillons à

α 137-141 à 0.1% (p/p) étaient supérieurs (0.90 ± 0.06 mg MDA/ kg) aux trois autres groupes testés (avec une moyenne de 0.60 ± 0.06 mg MDA/ kg) mais restaient plus faibles que le contrôle (1.43 ± 0.14 mg MDA/ kg). Cette tendance s'est poursuivie jusqu'à la fin de l'expérience. Au jour 14, les groupes BHT à 0.1 et 0.5% (p/p) ne possédaient pas de différence significative pour protéger la viande de l'oxydation des lipides, avec une valeur de TBARS aux alentours de 0.70 mg MDA/ kg de viande. Ceci a représenté une réduction de l'oxydation des lipides de 60% en comparaison avec le contrôle. Par ailleurs, le groupe α 137-141 à 0.1% (p/p) a permis une réduction de l'oxydation des lipides estimée à 42%.

Ces résultats ont démontré que le peptide α 137-141 possédait un effet positif sur la protection de la viande durant son stockage à 4°C, en réduisant le phénomène de l'oxydation des lipides. Par conséquent, il pouvait être suggéré que le peptide α 137-141 possède une activité antioxydante, souvent décrite de manière concomitante à l'activité antimicrobienne pour ce type de conservateur appliqué à la viande (Chaâbane *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2013; Nanasombat *et al.*, 2012). Ceci est probablement dû à la présence de la tyrosine (Y) au sein de sa séquence. En effet, cet acide aminé aromatique est capable de capter les radicaux libres par transfert direct d'électrons et agir ainsi comme un antioxydant (Huang *et al.*, 2005). De plus, il a également été reporté que la lysine (K) et l'arginine (R) positionnées en C-terminal de la séquence d'un peptide montrent une haute activité antioxydante (Guo *et al.*, 2009).

Par conséquent, le peptide actif α 137-141 est un potentiel candidat afin de lutter contre le rancissement de la viande.

5.3.2. Croissances des microorganismes au sein de la viande durant le stockage

Afin d'estimer l'effet antimicrobien de l'addition de l' α 137-141 dans la viande, plusieurs comptages microbiologiques ont été effectués tout au long des 14 jours de stockage à 4°C.

La population microbienne totale a diminué de manière significative en présence d'additifs (**Figure 81**). En effet, le groupe contrôle, sans traitement, possédait la plus grande valeur de colonies totales en comparaison des groupes traités en fin d'expérience ($p \leq 0.05$). Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les quatre groupes traités (de 6.01 ± 0.42 à 6.35 ± 0.12 log UFC/g). Néanmoins, le groupe traité à l' α 137-141 à 0.5% (p/p) a montré la plus lente augmentation dans le nombre des colonies totales au cours des 14 jours de

conservation. Pour chacune des mesures, le comptage des colonies totales s'est révélé être significativement plus faible que pour les autres, hormis pour le quatorzième jour.

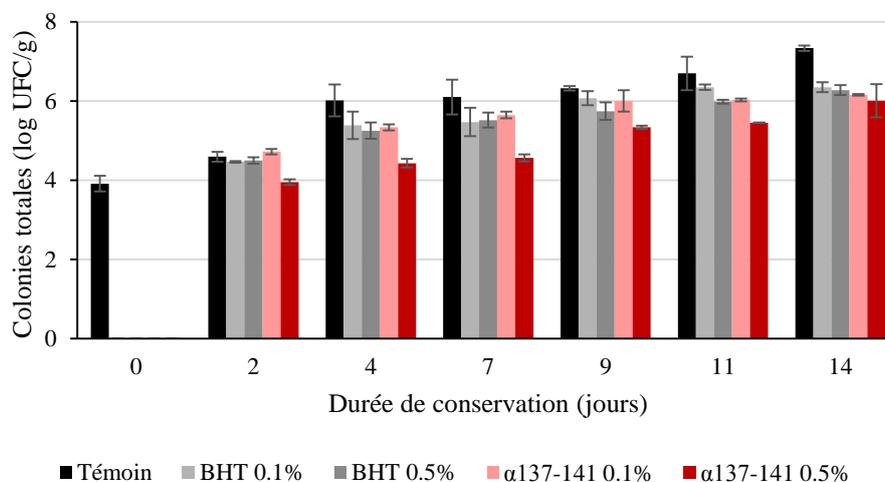


Figure 81 : Évolution de la croissance microbienne totale au sein de la viande non-traitée et traitée avec le BHT et l'α137-141 aux concentrations de 0.1 et 0.5% (p/p) durant 14 jours de conservation sous réfrigération (4°C)

Contre les bactéries coliformes (**Figure 82**), les groupes traités à l'α137-141 à 0.1 et 0.5% (p/p) ont été les plus performants, avec une croissance évaluée à 5.41 ± 0.30 et 5.07 ± 0.09 log UFC/g, respectivement, au jour 14. Ces effets ont été similaires à ceux du BHT à 0.5% (p/p), aucune différence significative n'étant constatée entre eux. En revanche, les groupes non-traité et traité avec le BHT à 0.1% (p/p) ne présentaient plus de différence significative aux jours 11 et 14, avec un comptage des colonies coliformes supérieur à 6.1 log UCF/g. À titre de comparaison, ce comptage était de 2.87 ± 0.62 log UFC/g au jour 0.

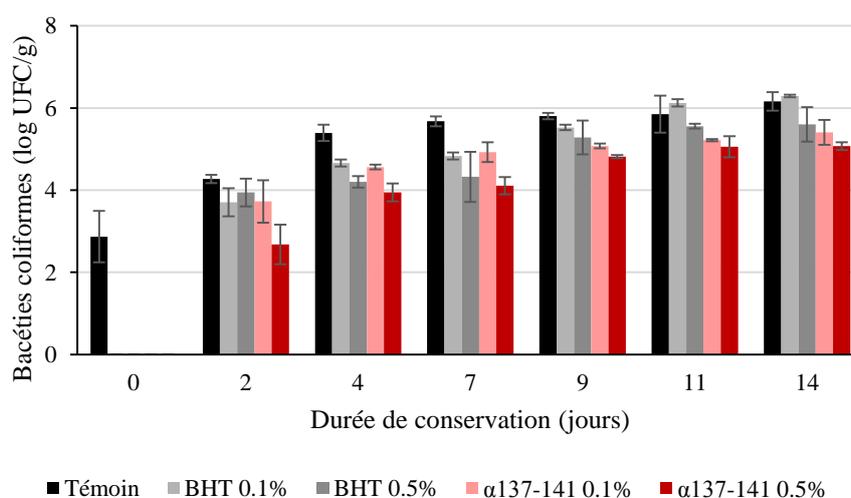


Figure 82 : Évolution de la croissance des bactéries coliformes au sein de la viande non-traitée et traitée avec le BHT et l'α137-141 aux concentrations de 0.1 et 0.5% (p/p) durant 14 jours de conservation sous réfrigération (4°C)

D'autre part, les levures et les moisissures n'ont pas vu leur croissance inhibée des jours 0 à 9, hormis pour le groupe traité à l' α 137-141 à 0.5% (p/p) au septième jour de conservation (**Figure 83**). À ce temps d'expérience, les comptages ont été de 5.42 ± 0.16 log UFC/g pour le groupe non-traité et de 4.37 ± 0.42 log UFC/g pour le groupe traité avec l' α 137-141 à 0.5% (p/p). Après le jour 7, l'ensemble des groupes traités a montré des différences significatives avec le groupe contrôle. Une fois encore, le groupe possédant la croissance microbiologique la moins avancée a été celui de l' α 137-141 à 0.5% (p/p).

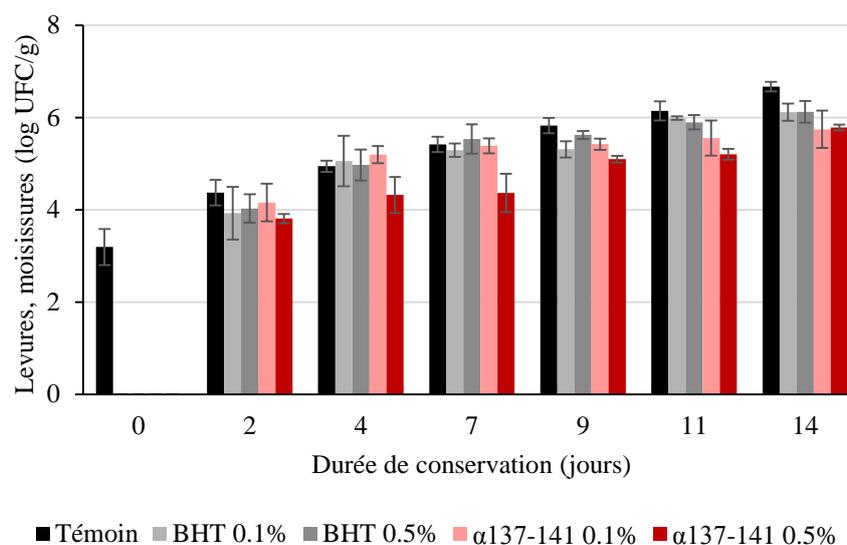


Figure 83 : Évolution de la croissance des moisissures et des levures au sein de la viande non-traitée et traitée avec le BHT et l' α 137-141 aux concentrations de 0.1 et 0.5% (p/p) durant 14 jours de conservation sous réfrigération (4°C)

Enfin, concernant la croissance des bactéries lactiques (**Figure 84**), un effet des additifs est apparu à partir du jour 11. Une différence significative n'a toutefois été notable qu'au quatorzième jour entre le groupe contrôle et l'ensemble des groupes avec additif. Néanmoins, il peut être remarqué que les effets de l' α 137-141 se sont révélés similaires aux effets du BHT pour cette population bactérienne étudiée.

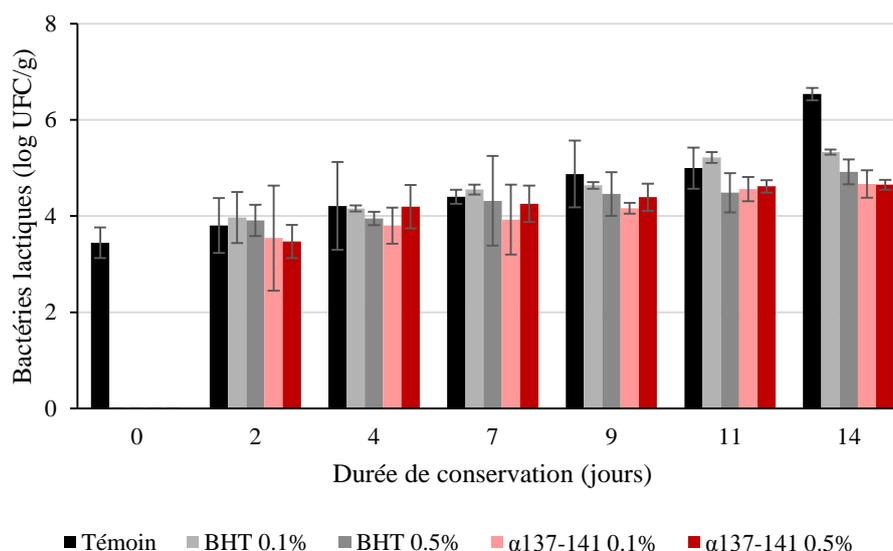


Figure 84 : Évolution de la croissance des bactéries lactiques au sein de la viande non-traitée et traitée avec le BHT et l'α137-141 aux concentrations de 0.1 et 0.5% (p/p) durant 14 jours de conservation sous réfrigération (4°C)

En résumé, le peptide α137-141 a montré un puissant effet antimicrobien contre la prolifération bactérienne au sein de la viande hachée stockée à 4°C, particulièrement à la concentration de 0.5% (p/p). Le fait le plus marquant a été observé contre la croissance des bactéries coliformes. De plus, les effets du peptide à cette concentration se sont montrés supérieurs à ceux constatés avec le BHT. Ces résultats ont donc confirmé les effets antimicrobiens précédemment décrits par Catiau *et al.* (2011b) et ont démontré que l'α137-141 à 0.5% pourrait avoir le potentiel de devenir un conservateur des aliments, notamment pour la viande et ses dérivées.

Par perspective, il est donc fortement suggéré que les fractions d'EDUF enrichies en peptide actif α137-141 seraient aussi de potentiels candidats comme conservateurs naturels des matrices alimentaires de type « viande hachée ».

5.4. Application de la fraction d'EDUF enrichie en α 137-141 sur matrice alimentaire de type « viande hachée »

Pour rappel, du fait de la faible surface membranaire employée (10 cm²), la fraction d'EDUF utilisée pour l'application sur matrice alimentaire a été la fraction d'EDUF à la C_{HB} de 8% (p/v). Plusieurs expériences consécutives ont été nécessaires afin de récolter suffisamment de peptides pour mener l'ensemble de l'application.

Afin d'éviter tout effet induit par les sels présents au sein du compartiment de récupération de l'EDUF, les fractions récupérées ont été dessalées. L'application s'est effectuée à 0.5% (p/p), correspondant à une application en α 137-141 à 0.09% (p/p). La comparaison de l'activité de cette fraction s'est donc effectuée avec les échantillons à 0.5% (p/p) pour le BHT et pour le peptide α 137-141 seul, correspondant aux échantillons les plus efficaces.

5.4.1. Évolution de l'oxydation des lipides durant le stockage

Comme précédemment décrit pour l'application du peptide α 137-141 seul, l'oxydation des lipides a augmenté tout le long des 14 jours de conservation pour les trois échantillons, y compris pour la fraction d'EDUF testée (**Figure 85**). Au second jour, la fraction d'EDUF présentait une activité contre l'oxydation des lipides de 0.357 ± 0.114 TBARS/ kg de viande, non significativement différente de celle du peptide α 137-141 seul (0.361 ± 0.022 mg MDA/ kg de viande) ou du BHT (0.357 ± 0.042 mg MDA/ kg de viande). À partir du jour 7, les valeurs de TBARS pour la fraction d'EDUF se sont montrées significativement plus élevées (0.682 ± 0.051 mg MDA/ kg de viande) que pour les deux autres : 0.526 ± 0.029 mg MDA/ kg de viande pour l' α 137-141 et 0.426 ± 0.030 mg MDA/ kg de viande. Au 14^{ème} jour, la fraction d'EDUF possédait une activité équivalente à celle du BHT (0.871 ± 0.080 mg MDA/ kg de viande contre 0.713 ± 0.220 mg MDA/ kg de viande) mais une valeur supérieure à celle du peptide α 137-141 seul (0.620 ± 0.053 mg MDA/ kg de viande).

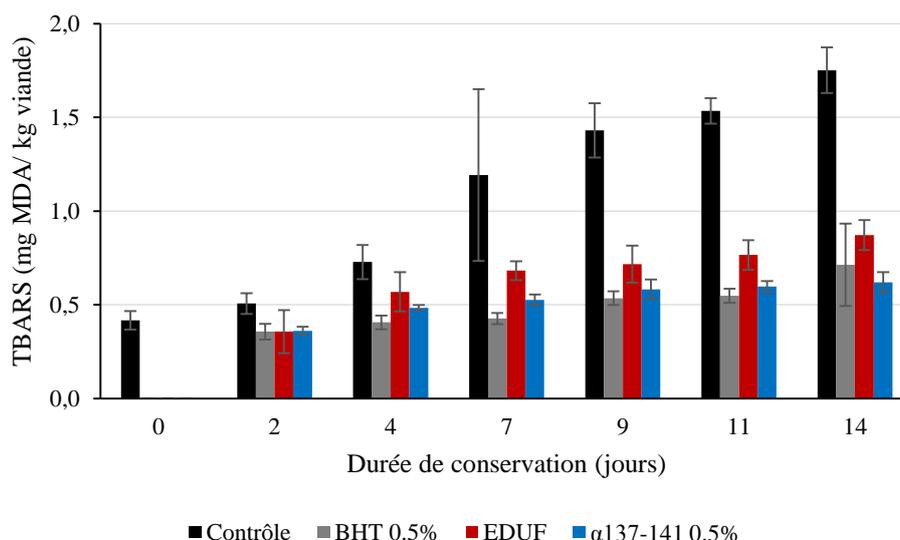


Figure 85 : Évaluation de l'oxydation des lipides de la viande hachée traitée avec la fraction d'EDUF, le BHT et l' α 137-141 à 0.5% (p/p) durant le stockage sous réfrigération (4°C)

L'activité de la fraction utilisée a donc été équivalente à celle du BHT. Ceci a permis dans un premier temps de démontrer la conservation de l'activité antimicrobienne après séparation par électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration. D'autre part, la réduction de l'oxydation des lipides de 50% par rapport au témoin après 14 jours de conservation à 4°C a confirmé la très bonne potentialité des fractions peptidiques issues d'hydrolysats d'hémoglobine bovine et enrichies en α 137-141 pour lutter contre le rancissement de matrice alimentaire de type viande hachée.

5.4.2. Croissances des microorganismes au cours du stockage de la viande

En parallèle du suivi de l'oxydation des lipides, le contrôle de la croissance microbiologique a été effectué par dénombrement des colonies totales, des bactéries lactiques, des coliformes et des moisissures et champignons.

Concernant les colonies totales, l'évolution de la croissance bactérienne s'est effectuée de manière intermédiaire entre celles du peptide α 137-141 seul et du BHT jusqu'au jour 9 (**Figure 86**).

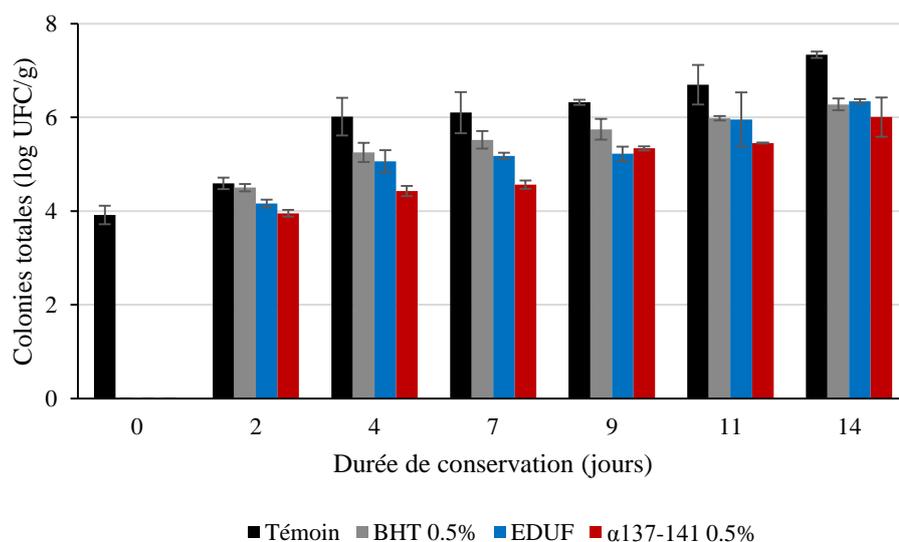


Figure 86 : Évolution de la croissance bactérienne totale au sein de la viande non-traitée et traitée avec le BHT, l'α137-141 et la fraction d'EDUF à la concentration de 0.5% (p/p) durant 14 jours de conservation sous réfrigération (4°C)

La croissance bactérienne au sein de la viande avec la fraction d'EDUF restait significativement différente à celle du témoin, sans additif (5.22 ± 0.16 log UFC/g contre 6.32 ± 0.05 log UFC/g pour le témoin). Au 11^{ème} jour de conservation, la fraction d'EDUF permettait une inhibition de croissance des colonies totales (5.96 ± 0.58 log UFC/g) similaire aux BHT (5.98 ± 0.05 log UFC/g) et α137-141 (5.45 ± 0.01 log UFC/g). La croissance bactérienne totale restait toutefois inférieure au témoin (6.70 ± 0.042 log UFC/g). Au dernier jour de suivi, les trois conditions ne présentaient pas de différence significative entre elles (6.28 ± 0.13 log UFC/g pour le BHT, 6.01 ± 0.42 log UFC/g pour l'α137-141 et 6.34 ± 0.04 log UFC/g pour la fraction d'EDUF). Néanmoins, elles présentaient toutes trois un nombre de colonies totales inférieur à celui du témoin, sans conservateur ajouté (7.34 ± 0.07 log UFC/g).

De manière globale, l'activité de la fraction d'EDUF s'est située de manière intermédiaire entre le BHT et le peptide α137-141 durant les 9 à 11 premiers jours, pour rejoindre ensuite celle du BHT au 14^{ème} et ainsi conserver une activité significative durant deux semaines sous réfrigération.

Concernant les bactéries coliformes, la tendance a été identique pour les trois conditions avec additif avec une croissance des bactéries coliformes constatée pour le traitement de la viande avec la fraction d'EDUF de 4.82 ± 0.06 log UFC/g contre 5.80 ± 0.08 log UFC/g pour la viande non-traitée au jour 9 (**Figure 87**).

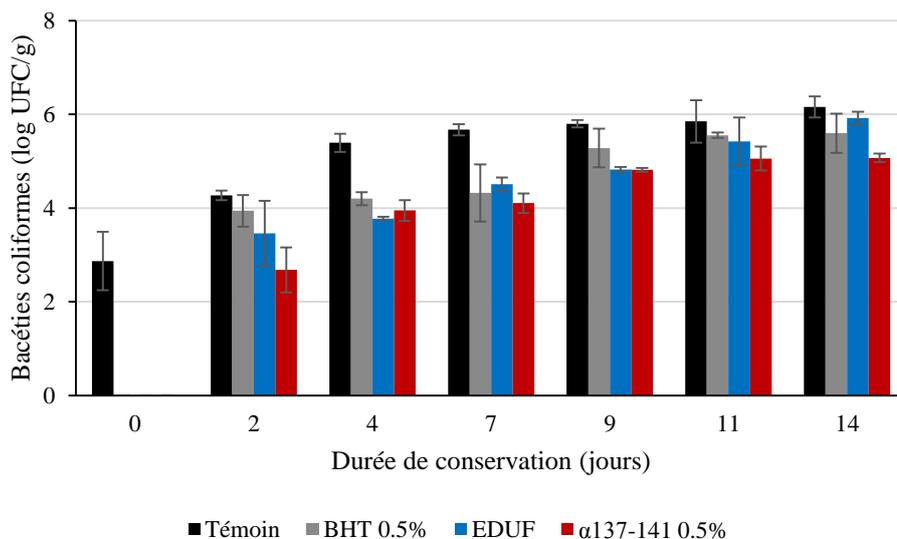


Figure 87 : Évolution de la croissance des bactéries coliformes au sein de la viande non-traitée et traitée avec le BHT, l' α 137-141 et la fraction d'EDUF à la concentration de 0.5% (p/p) durant 14 jours de conservation sous réfrigération (4°C)

L'inhibition de croissance des bactéries coliformes n'était plus significative entre les trois conditions testées à partir du jour 11. Les jours 11 et 14, seule l'inhibition de croissance due au peptide α 137-141 seul (5.07 ± 0.09 log UFC/g au 14^{ème} jour) est restée significative par rapport au témoin, sans conservateur (6.16 ± 0.22 log UFC/g au 14^{ème} jour). Les bactéries coliformes ont été dénombrées à 5.92 ± 0.14 log UFC/g au dernier jour de l'expérience avec l'emploi de la fraction d'EDUF.

L'efficacité de la fraction d'EDUF a été à nouveau retrouvée contre les bactéries coliformes. L'enrichissement en peptide actif α 137-141 a permis d'inhiber la croissance des bactéries coliformes au sein de la matrice alimentaire avec un effet proche de celui du BHT au rapport peptides/viande testé (0.5 %, p/p).

La croissance des levures et des moisissures n'a pas montré d'inhibition significative avec les conditions BHT (5.90 ± 0.16 log UFC/g) et EDUF (5.86 ± 0.12 log UFC/g) jusqu'au 11^{ème} jour par rapport au témoin (6.14 ± 0.21 log UFC/g), au contraire de la viande traitée avec l' α 137-141 seul (5.20 ± 0.12 log UFC/g) (**Figure 88**).

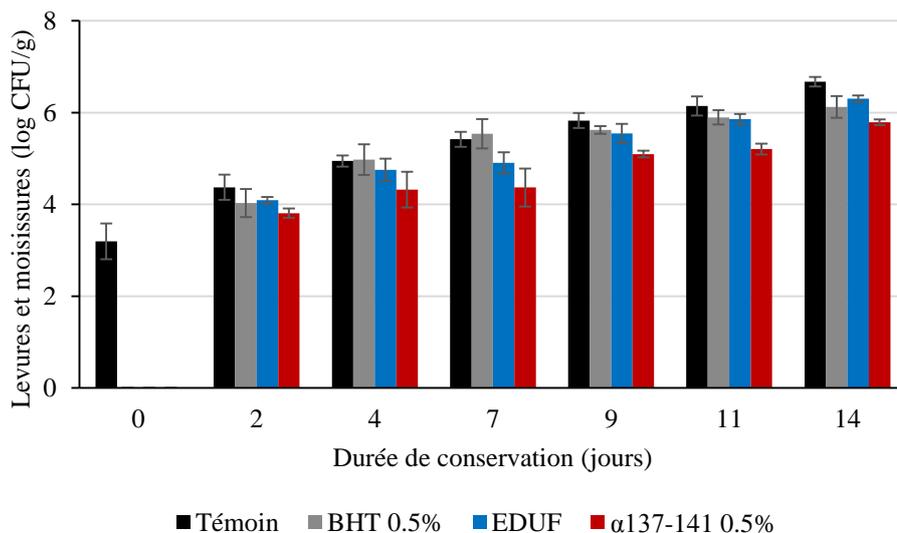


Figure 88 : *Évolution de la croissance des levures et moisissures au sein de la viande traitée et non-traitée avec le BHT, l' α 137-141 et la fraction d'EDUF à la concentration de 0.5% (p/p) durant 14 jours de conservation sous réfrigération (4°C)*

Au 14^{ème} jour, la différence entre le témoin et la fraction d'EDUF était significative (6.67 ± 0.10 contre 6.30 ± 0.07 log UFC/g, respectivement). Néanmoins, le peptide α 137-141 était le plus efficace au dernier jour du suivi (5.79 ± 0.06 log UFC/g), même si l'activité de la fraction d'EDUF était équivalente à celle du BHT (6.12 ± 0.24 log UFC/g).

La fraction d'EDUF a permis de retrouver l'effet antimicrobien contre les levures et moisissures au sein de la matrice alimentaire, précédemment décrit avec le peptide α 137-141 seul. Il est à noter que l'efficacité de la fraction d'EDUF se situait de manière globalement intermédiaire aux effets du BHT et de l' α 137-141 testés, avec un effet équivalent au BHT au 14^{ème} jour.

L'évolution de la croissance des bactéries lactiques s'est effectuée de manière similaire au témoin, sans additif, durant les 11 premiers jours, la fraction d'EDUF comptabilisant une croissance de 4.68 ± 0.35 log UFC/g contre une croissance de 5.00 ± 0.43 log UFC/g pour le témoin (**Figure 89**).

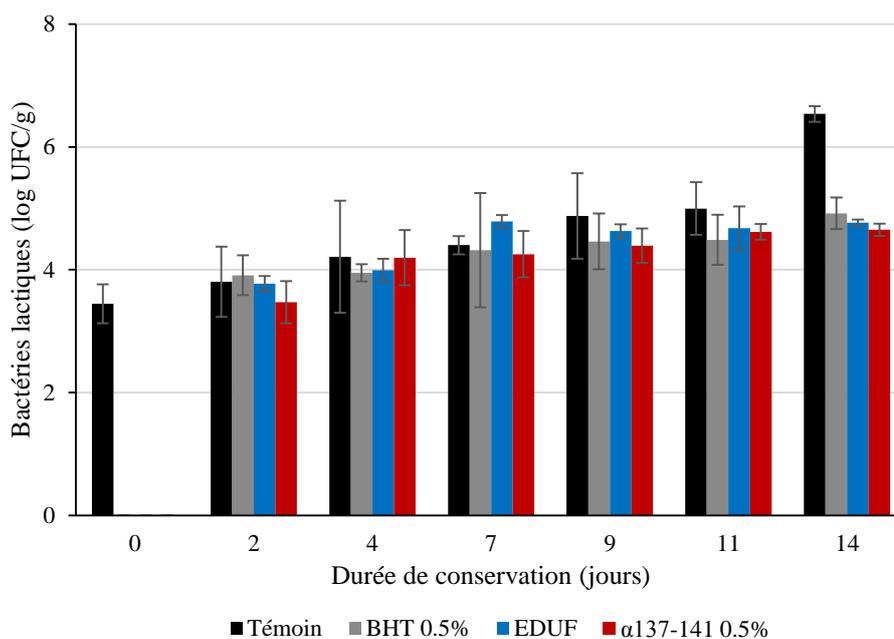


Figure 89 : Évolution de la croissance des bactéries lactiques au sein de la viande traitée et non-traitée avec le BHT, l'137-141 et la fraction d'EDUF à la concentration de 0.5% (p/p) durant 14 jours de conservation sous réfrigération (4°C)

Au 14^{ème} jour, la différence a été significative entre le témoin et les trois conditions testées. La fraction d'EDUF possédait une croissance de bactéries lactiques estimée à 4.77 ± 0.05 log UFC/g, contre 4.65 ± 0.10 log UFC/g pour le peptide α 137-141 pur et 4.92 ± 0.26 log UFC/g pour le BHT. La croissance estimée au sein du témoin était quant à elle de 6.54 ± 0.13 log UFC/g.

L'effet de la fraction d'EDUF était à nouveau estimé comme similaire au conservateur connu tel que le BHT, à concentration égale.

De manière globale, l'application de la fraction d'EDUF a permis de mettre en évidence ses propriétés conservatrices des aliments de type viande hachée à 4°C. En effet, non seulement la séparation de fractions peptidiques par EDUF issues d'hydrolysats d'hémoglobine bovine a permis de conserver l'activité des peptides mais a également montré une activité tout aussi efficace que le BHT, conservateur synthétique des aliments.

Toutefois, la pureté de l' α 137-141 (18%) au sein de la fraction laissait à penser que son activité pouvait être équivalente à celle de l' α 137-141 à 0.1% (p/p) précédemment étudiée, menant la fraction d'EDUF à 0.5% (p/p) à une teneur en 137-141 de l'ordre de 0.09% (p/p). La comparaison des activités antimicrobiennes entre le peptide α 137-141 à 0.1% (p/p) et la fraction d'EDUF à 0.5% (p/p) à 14 jours est présentée dans le **Tableau 27**.

Tableau 27 : Comparaison des croissances microbiennes sur la viande hachée lors de l'application de l' α 137-141 à 0.1% (p/p) et de la fraction d'EDUF à 0.5% (p/p) à 14 jours

	Colonies totales	Bactéries coliformes	Moisissures et levures	Bactéries lactiques
Témoin	7.34 ± 0.07	6.16 ± 0.22	6.67 ± 0.10	6.54 ± 0.13
α 137-141 (0.1%, p/p)	6.16 ± 0.02	5.41 ± 0.30	5.74 ± 0.41	4.67 ± 0.29
EDUF (0.5%, p/p)	6.34 ± 0.04	5.92 ± 0.14	6.30 ± 0.07	4.77 ± 0.05

(exprimées en log UFC/g)

Si les activités à 14 jours restaient équivalentes pour les colonies totales (6.16 ± 0.02 log UFC/g pour l' α 137-141 et 6.34 ± 0.02 log UFC/g pour la fraction d'EDUF) et les bactéries lactiques (4.67 ± 0.29 log UFC/g pour l' α 137-141 et 4.77 ± 0.05 log UFC/g pour la fraction d'EDUF) entre les deux additifs, une première différence significative était visible pour les moisissures et levures (5.74 ± 0.41 log UFC/g pour l' α 137-141 et 6.30 ± 0.07 log UFC/g pour la fraction d'EDUF). Ceci pouvait être dû à la teneur en α 137-141 au sein de la fraction d'EDUF qui n'était pas aussi importante que celle du peptide seul. Enfin, la différence constatée pour l'évolution des bactéries coliformes à 14 jours (5.41 ± 0.30 log UFC/g pour l' α 137-141 et 5.92 ± 0.14 log UFC/g pour la fraction d'EDUF) pouvait être également due à la teneur en α 137-141, plus faible que celle du peptide seul. Également, de par l'identification des peptides présents au sein de la fraction et l'analyse des activités antimicrobiennes retrouvées (**Tableau 25**), il était probable que l'efficacité de la fraction d'EDUF n'était pas uniquement due au peptide α 137-141, mais également à d'autres peptides présents, tels que les α 99-105 et α 99-106. Toutefois, ces derniers possèdent des CMI pour les bactéries coliformes bien supérieures à celles observées pour l' α 137-141 ($78 \mu\text{M}$ pour α 99-105, $69 \mu\text{M}$ pour α 99-106 et $9 \mu\text{M}$ pour α 137-141, comme montré dans le **Tableau 26**), et donc des activités antimicrobiennes moins importantes, pouvant ainsi justifier l'inhibition légèrement plus faible de la croissance des bactéries coliformes par la fraction d'EDUF en comparaison du peptide α 137-141 seul.

Cependant, au sein de la fraction, le peptide α 137-141 devait être l'acteur majoritaire de l'effet antimicrobien de par son importante teneur (plus de 18% des peptides représentés) et son important facteur d'enrichissement après séparation (plus de 25 fois en comparaison de l'hydrolysats initial à un DH de 5%).

En conclusion, la fraction d'EDUF se positionne comme un potentiel conservateur des aliments de type « viande hachée », de par sa réduction effective de l'oxydation des lipides afin de lutter contre le rancissement de la viande et de par l'inhibition de la croissance des bactéries, levures et moisissures constatée après 14 jours de conservation à 4°C. Par ailleurs, il est à noter que ses effets ont été identiques à ceux retrouvés par application d'un conservateur connu et synthétique des aliments, le BHT, témoignant d'un excellent pouvoir antimicrobien de la fraction d'EDUF.

Conclusions

Dans un premier temps, la mise en évidence des activités antimicrobiennes sur boîte de Pétri a permis de confirmer que les peptides conservaient leur bioactivité après séparation par EDUF.

Ensuite, l'application du peptide α 137-141 seul sur matrice alimentaire de type viande hachée a permis de démontrer sa potentielle valorisation comme conservateur des aliments. D'une part, à une concentration de 0.5% (p/p), son efficacité a été évaluée comme étant supérieure à celle du BHT à la même concentration sur la croissance des bactéries totales, coliformes et lactiques, ainsi que sur les moisissures et levures pour une durée de conservation à 4°C de 14 jours. D'autre part, il a permis de lutter efficacement contre le rancissement de la viande, avec une réduction de l'oxydation des lipides de l'ordre de 60% en comparaison de la viande non-traitée. L'effet antioxydant du peptide α 137-141 n'avait par ailleurs jamais été montré jusqu'à présent. Ces premiers résultats exposaient ainsi la très bonne potentialité d'application des fractions d'EDUF enrichies en α 137-141 comme conservateurs de la viande.

L'activité d'inhibition de la croissance bactérienne au sein de la viande hachée a été retrouvée lors de l'application des fractions d'EDUF. Les résultats observés ont permis de constater que les effets antimicrobiens étaient équivalents à ceux observés avec l'application du BHT à la même concentration (0.5%, p/p) contre la croissance des bactéries totales, coliformes et lactiques et contre les moisissures et levures. L'effet antioxydant a également été retrouvé avec une réduction de 50% de l'oxydation des lipides, montrant ainsi l'excellente préservation des qualités organoleptiques de la viande hachée dont le rancissement a ainsi été fortement retardé.

Production scientifique

Articles

Les résultats présentés tout au long de ce chapitre ont fait l'objet de la seconde partie d'une publication :

R. Przybylski, L. Firdaous, G. Châtaigné, P. Dhulster, N. Nedjar (2016). "Production of an antimicrobial peptide derived from slaughterhouse by-product and its potential application on meat as preservative". *Food Chemistry*, 211, 306-313.

Les connaissances et techniques développées ont permis de participer à un article :

A. Sila, K. Hedhili, R. Przybylski, S. Ellouz-Chaabouni, P. Dhulster, A. Bougatef, N. 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*, 2, 322-329.

Poster

Ces connaissances ont permis de participer une communication par affiche :

A. Sila, R. Przybylski, A. Bougatef, P. Dhulster, N. Nedjar-Arroume (Mai 2014). "Antibacterial activities of enzymatic hydrolysis products from fish proteins against pathogenic bacteria". *4th International Symposium on Antimicrobial Peptide*, LORIENT, FRANCE.

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

Ce dernier chapitre clôture le manuscrit suivant deux axes. Le premier propose un récapitulatif des résultats marquants obtenus durant ce travail de thèse, en rappelant la problématique initiale et en tentant d'y répondre par le biais de la démarche interdisciplinaire entreprise. Ensuite, des perspectives d'étude sont soumises, qu'elles soient transversales ou propres à chaque thème abordé.

Conclusions générales et synthèse du manuscrit

Aujourd'hui, les ressources s'amenuisent et la tendance de l'industrialisation mène à une accumulation des déchets pouvant être réinvestis comme nouveau matériel de base de par la présence de nombreux composés actifs encore présents. Leur valorisation permettrait ainsi la création de nouveaux produits à haute valeur ajoutée. Enjeu capital pour une économie durable, ce système s'attache à réduire l'impact environnemental, mais se positionne également comme une alternative à de nombreux additifs créés par voie de synthèse, inondant les produits de consommation courante. Ainsi, à partir d'une source dont l'obtention est suffisamment maîtrisée, il devient parfaitement envisageable de satisfaire non seulement l'industrie en réduisant la production des déchets, mais aussi le consommateur, de par l'exploitation de ressources donnant lieu à des composés naturels se substituant à des composés synthétiques largement répandus.

Dans cette optique, le cruor bovin est un co-produit abondant de l'industrie agroalimentaire et est caractérisé par la prépondérance majeure de l'hémoglobine en son sein. Protéine modèle du laboratoire ProBioGEM, son hydrolyse par la pepsine porcine permet de générer des populations de peptides possédant des bioactivités déjà renseignées dans la littérature, comme les activités antimicrobiennes ou opioïdes. Pourtant, le cruor est considéré comme un déchet et tout l'enjeu de cette thèse était d'envisager une voie possible de valorisation de ce dernier par le biais de la production en masse de peptides actifs et leur application successive en tant que conservateur naturel des aliments.

La production de l'hydrolysate peptidique, riche en peptides bioactifs, s'est effectuée dans un premier temps sur l'hémoglobine bovine purifiée. Un *focus* particulier a été réalisé sur un peptide antimicrobien original, l' α 137-141, ne possédant ni structure secondaire ni résidu hydrophobe. Ainsi, il a été montré que son obtention était rapide au cours de l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine bovine par la pepsine porcine, permettant de produire plus de 70% de l' α 137-141 finalement produits en 24 heures en seulement 30 minutes. Par comparaison avec le co-produit des abattoirs, le cruor, il a été montré que le mécanisme d'hydrolyse était identique, s'opérant par un mécanisme de type *zipper* et permettant l'obtention de différentes populations peptidiques en fonction du temps de réaction. L' α 137-141, peptide final dans ces conditions d'hydrolyse (pH 3.5, E/S = 1/11, 23°C), s'accumulait tout au long de la réaction, et autorisait une production de manière proportionnelle à la concentration en substrat introduite initialement. Ainsi, la montée en échelle s'avérait facilitée, avec une production de l' α 137-141 à 24 heures équivalente à $807.95 \pm 41.03 \text{ mg.L}^{-1}$ à la concentration en hémoglobine bovine au sein du cruor maximale de 8% (p/v). La génération du peptide α 137-141 selon un mécanisme *zipper* et de par le fait qu'il s'agissait d'un peptide final au cours de l'hydrolyse permettait ainsi d'étudier sa séparation sélective selon son environnement peptidique. Couvrant une large gamme de masses moléculaires et un nombre variable de peptides, cinq degrés d'hydrolyse (DH) ont été sélectionnés pour la suite de l'étude.

La séparation sélective du peptide α 137-141 s'est effectuée par le fractionnement d'hydrolysats complexes avec une technologie hybride, éco-responsable, dont les mécanismes de séparation permettaient la migration de composés chargés selon leur masse molaire et selon leur charge : il s'agit de l'électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration (EDUF). Afin de déterminer quelle était l'influence de la population peptidique sur la séparation du peptide d'intérêt, différents DH ont été testés. L'hydrolysate de 5% a donné le meilleur enrichissement lors de la récupération, jusqu'à un facteur 13. Il s'agissait également de l'hydrolysate permettant de récupérer le plus d' α 137-141, tant en termes de concentration que de pureté. Cet hydrolysate était celui possédant la plus faible proportion de peptides dans la même gamme de masses molaires que l' α 137-141 après le DH de 3%, mais ne possédait pas de sous-unités non hydrolysées de l'hémoglobine bovine. Par la suite, afin d'augmenter la pureté du peptide récupéré, l'influence du pH a été étudiée et a permis, grâce à la spectrométrie de masse et l'excellente connaissance de la source initiale, d'augmenter d'un facteur de 75 la teneur en α 137-141 récupérée comparée à l'hydrolysate de départ en travaillant à un pH de 9. Enfin, afin d'augmenter le rendement de récupération, la concentration en peptides au sein de la solution

d'alimentation a été augmentée de 1 à 8% (p/p) et a montré que la récupération du peptide d'intérêt pouvait être améliorée jusqu'à 4 fois.

Par la suite, il était primordial de vérifier l'activité antimicrobienne des fractions recueillies. Dans un premier temps, la faisabilité de l'application du peptide α 137-141 sur matrice alimentaire a d'abord été effectuée avec le peptide seul sur viande hachée, en comparaison avec un conservateur synthétique connu, l'hydroxytoluène butylé (BHT). Le peptide α 137-141 a montré une activité antimicrobienne toute aussi efficace que celle du BHT et a permis de réduire le rancissement de la viande en protégeant l'oxydation des lipides de plus de 50% par rapport au témoin, sans additif. Les fractions enrichies en α 137-141 après séparation par EDUF étaient donc de potentiels et prometteurs conservateurs naturels de la viande hachée. La fraction récupérée avec une concentration peptidique de 8% (p/v) et en contrôlant le pH de l'EDUF à 9 a en effet démontré une activité conservatrice des aliments sur la viande hachée, luttant contre la prolifération des bactéries, levures et moisissures ainsi que contre l'oxydation des lipides jusqu'à 14 jours à 4°C.

La valorisation du co-produit des abattoirs, le cruor, est donc parfaitement envisageable pour la production en masse de peptides bioactifs, pouvant se substituer à des composés synthétiques utilisés aujourd'hui dans des denrées de consommation courante et dont les effets peuvent être négatifs sur le long terme. La production de ces composés à haute valeur ajoutée permet également de tendre vers une économie durable où la minimisation des déchets de l'industrie et leur réinvestissement comme nouvelle matière première seraient des priorités.

Perspectives

Dans une optique de production continue et intégrée, afin d'augmenter la productivité de l'ensemble du process, il serait intéressant de se pencher sur la question de l'hydrolyse et de la séparation en simultané. Aujourd'hui limité par la décoloration de l'hydrolysate successive à la réaction de catalyse, le caractère multi-étapes en *batch* était obligatoire. Plusieurs axes de réflexion peuvent alors être engagés. Un procédé de décoloration préliminaire pourrait être réfléchi afin d'éviter le colmatage et les interactions des chaînes α et β avec la membrane d'ultrafiltration lors de la séparation par EDUF.

Également, la purification de l' α 137-141 pourrait être améliorée afin d'augmenter son enrichissement au sein du compartiment de récupération, voire même aller jusqu'à son isolement. De premières études sur le champ électrique pulsé en EDUF semblent prometteuses pour éliminer d'autres peptides pouvant co-migrer avec l' α 137-141 en faisant intervenir le ratio m/z en plus de la masse molaire et de la charge du peptide à un pH donné.

L'augmentation de rendement en α 137-141 pourrait également être obtenue en maintenant stable la conductivité au sein du compartiment de récupération, afin de conserver le flux peptidique au plus proche de sa valeur observée en début d'expérience.

En termes d'intensification de procédés, la montée en échelle devrait être envisagée. Tout d'abord, de par les faibles quantités de peptides récupérées avec la surface membranaire de 10 cm², il serait indispensable d'augmenter le rendement de récupération en employant une surface membranaire plus importante. Il serait alors primordial de vérifier la sélectivité du procédé, en premier lieu à une concentration peptidique de 1% (p/v), puis en l'augmentant jusqu'à 8% (p/v).

Si le projet de thèse s'intéressait de manière particulière au peptide antimicrobien α 137-141, il a pu être remarqué qu'il ne s'agissait pas du seul peptide à être récupéré après séparation. Il pourrait ainsi être valorisant d'envisager une récupération sélective d'autres peptides bioactifs, tels que les opioïdes, comme le peptide β 32-40, et d'en étudier l'enrichissement ou non d'activité en découlant. Les applications thérapeutiques potentielles se situeraient alors dans le domaine du traitement de la douleur, bien que de nombreux tests, notamment *in vivo*, devraient alors être réalisés afin de s'assurer de l'innocuité du peptide pour l'organisme.

D'un point de vue microbiologique, si l'inhibition de croissance bactérienne a bien été démontrée sur la viande en condition standard de stockage, il pourrait être intéressant de vérifier si le peptide α 137-141 ou la fraction recueillie après EDUF, permet toujours d'observer une activité dirigée contre les bactéries pathogènes en matrice alimentaire. Ainsi, la viande pourrait être inoculée par des souches pathogènes telles que *Salmonella enteritidis* ou *Staphylococcus aureus*, afin de vérifier que lors d'une contamination accidentelle de la denrée alimentaire, le peptide posséderait toujours son activité.

Dans un contexte où les emballages actifs sont plein essor, il serait également intéressant de tester leur adsorption sur film alimentaire et comparer l'activité obtenue lors de l'incorporation directe au sein de la matrice, comme fait au sein de ce manuscrit.

D'un point de vue plus général, la démarche entreprise au sein de ce manuscrit peut être effectuée sur une autre source de protéine, abondante et parfaitement caractérisée, afin de permettre au mieux la création de produits à haute valeur ajoutée. Il pourrait être envisagé, pour la filière végétale, de reprendre la stratégie globale de production et de purification et d'appliquer les peptides antimicrobiens recueillis sur des produits alimentaires végétaux.

Références

Références

- Abad-Zapatero, C., Rydel, T. J. & Erickson, J.** (1990). "Revised 2.3 Å, Structure of porcine pepsin: Evidence for a flexible subdomain". *Proteins*, 8, 62-81.
- Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P. & Chihib, N.-E.** (2014). "Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments". *Archives of Microbiology*, 196, 453-472.
- Adje, E. Y., Balti, R., Kouach, M., Dhulster, P., Guillochon, D. & Nedjar-Arroume, N.** (2011a). "Obtaining antimicrobial peptides by controlled peptic hydrolysis of bovine hemoglobin". *International Journal of Biological Macromolecules*, 49, 143-153.
- Adje, E. Y., Balti, R., Kouach, M., Guillochon, D. & Nedjar-Arroume, N.** (2011b). "α67-106 of bovine hemoglobin: a new family of antimicrobial and angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides". *European Food Research and Technology*, 232, 637-646.
- Adler-Nissen, J.** (1978). "Enzymatic hydrolysis of soy protein for nutritional fortification of low pH food". *Annales of Nutrition and Alimentation*, 32(2-3), 205-216.
- Agyei, D. & Danquah, M.** (2011). "Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides". *Biotechnology Advances*, 29, 272-277.
- Andreu, D. & Rivas, L.** (1998). "Animal antimicrobial peptides: an overview". *Peptide Science*, 47(6), 415-433.
- Aoki, W., Kuroda, K. & Ueda, M.** (2012). "Next generation of antimicrobial peptides as molecular targeted medicines". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(4), 365-370.
- Aubes-Dufau, I., Capdevielle, J., Seris, J.-L. & Combes, D.** (1995). "Bitter peptide from hemoglobin hydrolysate: isolation and characterization". *FEBS Letters*, 364, 115-119.
- Autio, K., Kiesvaara, M., Malkki, Y. & Kanko, S.** (1984). "Chemical and functional properties of blood globin prepared by a new method". *Journal of Food Science*, 49, 859-862.
- Bah, C. S. F., Bekhit, A. E.-D. A., Carne, A. & McConnell, M. A.** (2013). "Slaughterhouse blood: an emerging source of bioactive compounds". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12, 314-331.
- Bargeman, G., Dohmen-Speelmans, M., Recio, I., Koops, G. H. & Host, H. C. V. D.** (2000). "Selective isolation of cationic amino acids and peptides by electro-membrane filtration". *Lait*, 80, 175-185.

- Bargeman, G., Houwing, J., Recio, I., Koops, G.-H. & Horst, C. V. D.** (2002). "Electro-membrane filtration for the selective isolation of bioactive peptides from an as2-casein hydrolysate". *Biotechnology and Bioengineering*, 80(6), 599-609.
- Barkhudaryan, N. A., Kellermann, J., Galoyan, A. A. & Lottspeich, F.** (1993). "High molecular weight aspartic endopeptidase generates a coronaro-constrictory peptide from the β -chain of hemoglobin". *FEBS Letters*, 329, 215-218.
- Barkhudaryan, N. A., Oberthuer, W., Lottspeich, F. & Galoyan, A.** (1992). "Structure of hypothalamic coronaro-constrictory peptide factors". *Neurochemical Research*, 17, 1217-1221.
- Bauer, A. K., Dwyer-Nield, L. D., Hankin, J. A., Murphy, R. C. & Malkinson, A. M.** (2001). "The lung tumor promoter, butylated hydroxytoluene (BHT), causes chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant CXB4 mice". *Toxicology*, 169, 1-15.
- Bazinet, L.** (2005). "Electrodialytic phenomena and their applications in the dairy industry: a review". *CRC Critical review in Food Science and Nutrition*, 45, 307-326.
- Bazinet, L., Amiot, J., Poulin, J. F., Tremblay, A. & Labbé, D.** (2005). "Process and system for separation of organic charged compounds". *Brevet PCT/CA2005/000337*.
- Bazinet, L. & Castaigne, F.** (2011). *Concepts de génie alimentaire : Procédés associés et applications à la conservation des aliments* (T. D. Lavoisier Ed.).
- Bazinet, L. & Firdaous, L.** (2013). "Separation of bioactive peptides by membrane processes: technologies and devices". *Recent Patents on Biotechnology*, 7, 9-27.
- Bazinet, L., Lamarche, F. & Ippersiel, D.** (1998). "Bipolar-membrane electrodialysis: applications of electrodialysis in the food industry". *Trends in Food Science & Technology*, 9, 107-113.
- Bechinger, B., Zasloff, M. & Opella, S. J.** (1993). "Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy". *Protein Science*, 2(12), 2077-2084.
- Beckhoven, R. F. V., Duchateau, A. L., Edens, L., Kleinherenbrink, F. A., Kloek, J. & Roos, A. L. D.** (2009). "Composition comprising carbohydrates and peptides which comprise tryptophan". *US20090270337 and EP08155387*.
- Benedé, S., Lopez-Exposito, I., Giménez, G., Grishina, G., Bardina, L., Sampson, H. A., Molina, E. & Lopez-Fandino, R.** (2014). "In vitro digestibility of bovine β -casein with simulated and human oral and gastrointestinal fluids. Identification and IgE-reactivity of the resultant peptides". *Food Chemistry*, 143, 514-521.

- Blishchenko, E. Y., Kalinina, O. A., Sazonova, O. V., Khaidukov, S. V., Egorova, N. S., Surovoy, A. Y., Philippova, M. M., Vass, A. A., Karelin, A. A. & Ivanov, V. T.** (2001). "Engoneous fragment of hemoglobin, neokyotorphin, as cell growth factor". *Peptides*, 22, 1999-2008.
- Blishchenko, E. Y., Mernenko, O. A., Mirkina, I. I., Satpaev, D. K., Ivanov, V. S., Tchikin, L. D., Ostrovsky, A. G., Karelin, A. A. & Ivanov, V. T.** (1996). "Tumor cell cytolysis mediated by valorphin, an opioid-like fragment of hemoglobin β -chain". *Peptides*, 18, 79-85.
- Boman, H. G.** (1995). "Peptide antibiotics and their role in innate immunity". *Annual Review of Immunology*, 13, 61-92.
- Borch, E. & Arinder, P.** (2002). "Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well as control measures". *Meat Science*, 62, 381-390.
- Boudesocque, L., Lameiras, P., Amarouche, N., Giraud, M., Quattrini, F., Garrity, J. M., Nuzillard, J.-M. & Renault, J.-H.** (2012). "Ion-exchange centrifugal partition chromatography: A methodological approach for peptide separation". *Journal of Chromatography A*, 1236, 115-122.
- Bouhallab, S. & Touzé, C.** (1995). "Continuous hydrolysis of caseinomacropptide in a membrane reactor: kinetic study and gram-scale production of antithrombotic peptides". *Lait*, 75, 251-258.
- Boys, L. B. & Konermann, L.** (2007a). "Folding and assembly of haemoglobin monitored by electrospray Mass spectrometry using an on-line dialysis system". *Journal of the American Society for the Mass Spectrometry*, 18, 8-16.
- Boys, L. B., Mark, C. & Konermann, K. L.** (2007b). "Symmetric behavior of hemoglobin α - and β -subunits during acid-induced denaturation observed by electrospray mass spectrometry". *Biochemistry*, 46, 10675-10684.
- Brantl, V., Gramsch, C., Lottspeich, F., Mertz, R., Jaeger, K. H. & Herz, A.** (1986). "Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins". *European Journal of Pharmacology*, 106, 213-214.
- Breukink, E. & Kruijff, B. D.** (1999). "The lantibiotic nisin, a special case or not?". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462(1-2), 223-234.
- Briggs, G. & Haldane, J.** (1925). "A note on the kinetics of enzyme action". *Biochemical Journal*, 19, 338-339.
- Brogden, K. A.** (2005). "Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?". *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238-250.
- Bulet, P., Stöcklin, R. & Menin, L.** (2004). "Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates". *Immunological Reviews*, 198, 169-184.

- Castro, R. J. S. d. & Sato, H. H.** (2015). "Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries". *Food Research International*, 74, 185-198.
- Catiau, L., Traisnel, J., Chihib, N.-E., Flem, G. L., Blanpain, A., Melnyk, O., Guillochon, D. & Nedjar-Arroume, N.** (2011a). "RYH: a minimal peptidic sequence obtained from beta-chain hemoglobin exhibiting an antimicrobial activity". *Peptides*, 32, 1463-1468.
- Catiau, L., Traisnel, J., Delval-Dubois, V., Chihib, N.-E., Guillochon, D. & Nedjar-Arroume, N.** (2011b). "Minimal antimicrobial peptide sequence from hemoglobin alpha-chain: KYR". *Peptides*, 32, 633-638.
- Chaâbane, M., Maktouf, S., Nadhem, S., Zouari, S., Zeghal, N. & Ghorbel, R. E.** (2014). "Antioxidant and antimicrobial properties of the extracts from *Nitraria retusa* fruits and their applications to meat product preservation". *Industrial Crops and Products*, 55, 295-303.
- Chang, R. C. C., Huang, W. Y., Redding, T. W., Arimura, A., Coy, D. H. & Schally, A. V.** (1980). "Isolation and structure of several peptides from porcine hypothalami". *Biochimica et Biophysica Acta*, 625, 266-273.
- Choisnard, L., Froidevaux, R., Nedjar-Arroume, N., Lignot, B., Vercaigne-Marko, D., Krier, F., Dhulster, P. & Guillochon, D.** (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.
- Church, F. C., Porter, D. H., Catignani, G. L. & Swaisgood, H. E.** (1985). "An o-phthaldialdehyde spectrometric assay for proteinases". *Analytical Biochemistry*, 146, 343-348.
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H. & Catignani, L.** (1983). "Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins". *Journal of Dairy Science*, 66, 1219-1227.
- Clare, D. A. & Swaisgood, H. E.** (2000). "Bioactive milk peptides: a prospectus". *Journal of Dairy Science*, 83, 1187-1195.
- Clark, J. H., Luque, R. & Matharu, A. S.** (2012). "Green chemistry, biofuels and biorefinery". *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 3, 183-207.
- Clemente, A.** (2000). "Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition". *Food Science and Technology*, 11, 254-262.
- Constantinides, A. & Adu-Amankwa, B.** (1980). "Enzymatic modification of vegetable protein: mechanism, kinetics, and production of soluble and partially soluble protein in a batch reactor". *Biotechnology and Bioengineering*, 22(8), 1543-1565.

- Corma, A., Torre, O. D. L., Renz, M. & Villandier, N.** (2011). "Production of high-quality diesel from biomass waste products". *Angewandte Chemie International Edition*, 50(10), 2375-2378.
- Crosby, W. H., Munn, J. L. & Furth, F. W.** (1954). "Standardizing a method for clinical hemoglobimetry". *US Armed Forces Med. J.*, 5, 693-703.
- D'Alessandro, L. G., Vauchel, P., Przybylski, R., Châtaigné, G., Nikov, I. & Dimitrov, K.** (2013). "Integrated process extraction-adsorption for selective recovery of antioxidant phenolics from *Aronia melanocarpa* berries". *Separation and Purification Technology*, 120, 92-101.
- Danquah, M. & Agyei, D.** (2012). "Pharmaceutical applications of bioactive peptides". *OA Biotechnology*, 1(2), 5-9.
- 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., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M. & Bienert, M.** (2001). "Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge". *FEBS Letters*, 501(2-3), 146-150.
- 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(1-2), 71-87.
- Dathe, M., Wieprecht, T., Nikolenko, H., Handel, L., Maloy, W., MacDonald, D. L., Beyermann, M. & Bienert, M.** (1997). "Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipatic helical peptides". *FEBS Letters*, 403, 208-212.
- Davies, D. R.** (1990). "The structure and function of the aspartic proteinases". *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 19, 189-215.
- Dhulster, P., Kapel, R., Froidevaux, R., Nedjar, N., Fertin-Bazus, A., Choisnard, L. & Guillochon, D.** (2002). "Advancement in intermediate opioid peptide production in an enzymatic membrane reactor assisted by solvent extraction". *Desalination*, 148, 221-226.
- Diamant, G., Beckloff, N., Weinberg, A. & Kisich, K. O.** (2009). "The roles of antimicrobial peptides in innate host defense". *Current Pharmaceutical Design*, 15(21), 2377-2392.
- Divakaran, S.** (1982). *Animal blood. Processing and utilisation.* (Agricultural Service Bulletin ed. Vol. 32).

- Doyen, A., Beaulieu, L., Saucier, L., Pouliot, Y. & Bazinet, L.** (2011). "Demonstration of *in vitro* anticancer properties of peptide fractions from a snow crab by products hydrolysate after separation by electro dialysis with ultrafiltration membranes". *Separation and Purification Technology*, 78, 321-329.
- Doyen, A., Roblet, C., Beaulieu, L., Saucier, L., Pouliot, Y. & Bazinet, L.** (2013). "Impact of water splitting phenomenon during electro dialysis with ultrafiltration membranes on peptide selectivity and migration". *Journal of Membrane Science*, 428, 349-356.
- Doyen, A., Roblet, C., L'Archevêque-Gaudet, A. & Bazinet, L.** (2014). "Mathematical sigmoid-model approach for the determination of limiting and over-limiting current density values". *Journal of Membrane Science*, 452, 453-459.
- Dubois, V., Nedjar-Arroume, N. & Guillochon, D.** (2005). "Influence of pH on the appearance of active peptides in the course of peptic hydrolysis of bovine haemoglobin". *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 35, 85-102.
- Dunn, B. M.** (2002). "Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases". *Chemical Reviews*, 102, 4431-4458.
- Dupont, D., Mandalari, G., Molle, D., Jardin, J., Léonil, J., Faulks, R. M., Wickham, M. S. J., Mills, E. N. C. & Mackie, A. R.** (2010). "Comparative resistance of food proteins to adult and infant *in vitro* digestion models". *Molecular Nutrition and Food Research*, 54, 767-780.
- Eisenberg, D.** (1984). "Three-dimensional structure of membrane and surface proteins". *Annual Review of Biochemistry*, 53, 595-623.
- Epand, R. M. & Vogel, H. J.** (1999). "Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462, 11-28.
- Ernstrom, D. B. & Wongt, N. P.** (1983). *Milk clotting enzymes and cheese chemistry* (T. A. P. C. Inc Ed.).
- Etienne, O.** (2004). *Développement d'interfaces à propriétés antimicrobiennes par la fonctionnalisation de multicouches de polyélectrolytes*. (Thèse de Doctorat), Université Louis Pasteur, Strasbourg I.
- Firdaous, L., Dhulster, P., Amiot, J., Doyen, A., Lutin, F., Vezina, L. P. & Bazinet, L.** (2010). "Investigation of the large-scale bioseparation of an hypertensive peptide from alfalfa white protein hydrolysate by an electromembrane process". *Journal of Membrane Science*, 355, 175-181.
- Firdaous, L., Dhulster, P., Amiot, J., Gaudreau, A., Lecouturier, D., Kapel, R., Lutin, F., Vézina, L.-P. & Bazinet, L.** (2009). "Concentration and selective separation of bioactive peptides from an alfalfa white protein hydrolysate by electro dialysis with ultrafiltration membranes". *Journal of Membrane Science*, 329, 60-67.

- Froidevaux, R., Krier, F., Nedjar-Arroume, N., Vercaigne-Marko, D., Kosciarz, E., Ruckebusch, C., Dhulster, P. & Guillochon, D.** (2001). "Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment". *FEBS Letters*, 491, 159-163.
- Froidevaux, R., Vanhoute, M., Lecouturier, D., Dhulster, P. & Guillochon, D.** (2008). "Continuous preparation of two opioid peptides and recycling of organic solvent using liquid/liquid extraction coupled with aluminium oxide column during haemoglobin hydrolysis by immobilized pepsin". *Process Biochemistry*, 43, 431-437.
- Froidevaux, R., Vercaigne-Marko, D., Kapel, R., Lecouturier, D., Chung, S., Dhulster, P. & Guillochon, D.** (2006). "Study of a continuous reactor for selective solvent extraction of haemorphins in the course of peptic haemoglobin hydrolysis". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 1433-1440.
- Fukui, K., Shiomi, H., Takagi, H., Hayashi, K., Kiso, Y. & Kitagawa, K.** (1983). "Isolation from bovine brain of a novel analgesic peptapeptide, neo-kyotorphin, containing the Tyr-Arg (kyotorphin) unit". *Neuropharmacology*, 22, 191-196.
- Galanakis, C. M.** (2012). "Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications". *Trends in Food Science & Technology*, 26, 68-87.
- Galier, S. & Balmann, H. R.-d.** (2004). "Study of biomolecules separation in an electrophoretic membrane contactor". *Journal of Membrane Science*, 241, 79-87.
- Galier, S. & Balmann, H. R.-d.** (2005). "Electrophoretic membrane contactors". *Chemical Engineering Research and Design*, 83(3), 268-275.
- Gatnau, R., Polo, J. & Robert, E.** (2001). "Plasma protein antimicrobial substitution at negligible risk". *Cahiers Options Méditerranéennes*, 54, 141-150.
- Gennaro, R. & Zanetti, M.** (2000). "Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides". *Biopolymers*, 55(1), 31-49.
- Glamsta, E. L., Meyerson, B., Silberring, J., Terenius, L. & Nyberg, F.** (1991). "Isolation of a hemoglobin-derived opioid peptide from cerebrospinal fluid of patients with cerebrovascular bleedings". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 184, 1060-1066.
- Gomes, I., Dale, C. S., Casten, K., Geigner, M. A., Gozzo, F. C., Ferro, E. S., Heimann, A. S. & Lakshmi, A. D.** (2010). "Hemoglobin-derived peptides as novel type of bioactive signaling molecules". *The AAPS Journal*, 12(4), 658-668.
- Gontard, N.** (2000). *Les emballages actifs* (E. T. D. Lavoisier Ed.).
- Goot, A. J. v. d., Pelgrom, P. J. M., Berghout, J. A. M., Geerts, M. E. J., Jankowiak, L., Hardt, N. A., Keijer, J., Schutyser, M. A. I., Nikiforidis, C. & Boom, R. M.** (2016). "Concepts for further sustainable production of foods". *Journal of Food Engineering*, 168, 42-51.

- Gourley, L., Gauthier, S. F. & Pouliot, Y.** (1995). "Separation of casein hydrolysates using polysulfone ultrafiltration membranes with pH and EDTA treatments applied". *Lait*, 78, 633-646.
- Gourley, L., Gauthier, S. F., Pouliot, Y., Mollé, D., Léonil, J. & Maubois, J. F.** (1998). "Identification of casein peptides interacting with polysulfone ultrafiltration membranes". *Lait*, 78, 633-646.
- Griffith, W. P. & Kaltashov, I. A.** (2003). "Highly asymmetric interactions between globin chains during hemoglobin assembly revealed by electrospray ionization mass spectrometry". *Biochemistry*, 42, 10024-10033.
- Guedidi, S., Yurekli, Y., Deratani, A., Déjardin, P., Innocent, C., Altinkaya, S. A., Roudesli, S. & Yemencioğlu, A.** (2010). "Effect of enzyme location on activity and stability of trypsin and urease immobilized on porous membranes by using layer-by-layer self-assembly of polyelectrolyte". *Journal of Membrane Science*, 365, 59-67.
- Gunders, D.** (2012). *Wasted: How America is losing up to 40 percent of its food from farm to Fork to Landfill* (NRDC ed.).
- Guo, H., Kouzuma, Y. & Yonekura, M.** (2009). "Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly proteins". *Food Chemistry*, 113, 238-245.
- Gwehenberger, G. & Narodoslawsky, M.** (2008). "Sustainable processes - The challenge of the 21st century for chemical engineering". *Process Safety and Environment Protection*, 86, 321-327.
- Hancock, R. E. & Sahl, H. G.** (2006). "Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies". *Nature Biotechnology*, 24(12), 1551-1557.
- Hancock, R. E. & Scott, M. G.** (2000). "The role of antimicrobial peptides in animal defenses". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 97(16), 8856-8861.
- Hartmann, R. & Meisel, H.** (2007). "Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications". *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 163-169.
- Hedhili, K., Dimitrov, K., Vauchel, P., Sila, A., Chataigné, G., Dhulster, P. & Nedjar, N.** (2015). "Valorization of cruor slaughterhouse by-product by enzymatic hydrolysis for the production of antibacterial peptides: focus on α 1-32 family peptides mechanism and kinetics modeling". *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(10), 1867-1877.
- Hedhili, K., Vauchel, P., Dimitrov, K., Kriaa, K., Châtaigné, G., Hani, K., Dhulster, P. & Nedjar-Arroume, N.** (2014). "Mechanism and kinetics modeling of the enzymatic hydrolysis of α 1-32 antibacterial peptide". *Bioprocess Biosyst Eng*, 37, 1315-1323.
- Herriott, R. M.** (1962). "Pepsinogen and pepsin". *The Journal of General Physiology*, 45, 57-76.

- Hirsh, D. J., Hammer, J., Maloy, W. L., Blazyk, J. & Shaefer, J.** (1996). "Secondary structure and location of a magainin analogue in synthetic phospholipid bilayers". *Biochemistry*, 35(39), 12733-12741.
- Howell, N. K. & Lawrie, R. A.** (1987). "Functional aspects of blood plasma proteins". *International Journal of Food Science and Technology*, 22, 145-151.
- Huang, D., Ou, B. & Prior, R. L.** (2005). "The chemistry behind antioxidant capacity assays". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Huang, H. W.** (2000). "Action of antimicrobial peptides: two-state model". *Biochemistry*, 39(29), 8347-8352.
- Hunkapiller, M. W. & Richards, J. H.** (1972). "Studies on the catalytic mechanism of pepsin using a new synthetic substrate". *Biochemistry*, 11, 2829-2839.
- Imaida, K., Fukushima, S., Shirai, T., Ohtami, M., Nakamish, K. & Ito, N.** (1983). "Promoting activities of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on 2-stage urinary carcinogenesis and inhibition of gamma-glutamyl *trans* peptidepositive for development in the liver of rats". *Carcinogenesis*, 4, 895-899.
- Ivanov, V. T., Karelin, A. A., Mikhaleva, I. I., Vaskovsky, B. V., Sviryaev, V. I. & Nazimov, I. V.** (1992). "Isolation, structure and properties of endogenous peptides". *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 1271-1311.
- Ivanov, V. T., Karelin, A. A., Philippova, M. M., Nazimov, I. V. & Pletnev, V. Z.** (1997). "Hemoglobin as a source of endogenous bioactive peptides: the concept of tissue-specific peptide pool". *Biopolymers*, 43, 171-188.
- Jenssen, H., Hamill, P. & Hancock, R. E.** (2006). "Peptide antimicrobial agents". *Clinical Microbiology reviews*, 19(3), 491-511.
- Jr, R. S., Lopes, G. P., Tardioli, P. W., Giordano, R. L. C., Almeida, P. I. F. & Giordano, R. C.** (2004). "Kinetic model for whey protein hydrolysis by alcalase multipointimmobilized on agarose gel particles". *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 21(2), 147-153.
- Kagawa, K., Matsukata, H., Fukuhama, C., Watanaka, Y. & Fujino, H.** (1996). "Globin digest, acidic protease hydrolysate, inhibits dietary hypertlyceridemia and Val-Val-Tyr-Pro, one of its constituents, possesses most superior effects". *Life Sciences*, 58, 1745-1755.
- Kapel, R., Froidevaux, R., Nedjar-Arroume, N., Fertin-Bazus, A., Dhulster, P. & Guillochon, D.** (2003). "Continuous production of a peptidic fraction containing the intermediate opioid peptide LVV-haemorphin-7 (LVVh-7) by peptic hydrolysis of bovine haemoglobin in a continuous membrane reactor". *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 37, 317-324.

- Karam, L., Jama, C., Mamede, A.-S., Boukla, S., Dhulster, P. & Chihib, N.-E.** (2013). "Nisin-activated hydrophobic and hydrophilic surfaces: Assessment of peptide adsorption and antibacterial activity against some pathogens". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(24), 10321-10328.
- Karas, M. & Bahr, U.** (1990). "Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry of Large Biomolecules". *Trends Analytical Chemistry*, 9, 321-325.
- Karas, M. & Hillenkamp, F.** (1988). "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons". *Analytical Biochemistry*, 60, 2299-2301.
- Keil, B.** (1992). *Specificity of proteolysis* (Springer Ed.).
- Keymanesh, K., Soltani, S. & Sardari, S.** (2009). "Application of antimicrobial peptides in agriculture and food industry". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 933-944.
- Kim, S.-J., Cho, A. R. & Han, J.** (2013). "Antioxidant and antimicrobial activities of lealy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation". *Food Control*, 29, 112-120.
- Kiso, Y., Kitagawa, K., Kawai, N., Akita, T., Takagi, H., Amano, H. & Fukui, K.** (1983). "Neo-kyotorphin (Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg), a new analgesic peptide". *FEBS Letters*, 155, 281-284.
- Kolaeva, S. H., Lee, T. F., Wang, L. C. & Paproski, S. M.** (1990). "Effect of intracerebroventricular injection of neokyotorphin on the thermoregulation responses in rats". *Brain Research Bulletin*, 25, 407-410.
- Korhonen, H.** (2009). "Milk-derived bioactive peptides: from science to applications". *Journal of Functional Foods*, 1(2), 177-187.
- Korhonen, H. & Pihlanto, A.** (2003). "Food-derived bioactive peptides - Opportunities for designing future foods". *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1297-1308.
- Korhonen, H. & Pihlanto, A.** (2006). "Bioactive peptides: Production and functionality". *International Dairy Journal*, 16, 945-960.
- Kussmann, M., Nordhoff, E., Rabek-Nielsen, H., Haebel, S., Rossel-Larsen, M., Jakobsen, L., Gobom, J., Mirgorodskaya, E., Kroll-Kristensen, A., Palm, L. & Roepstoff, P.** (1997). "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry sample preparation techniques designed for various peptide and protein analyses". *Journal of Mass Spectrometry*, 32, 593-601.
- Labbé, D. & Bazinet, L.** (2006). "Effect of membrane type on cation migration during green tea electromigration and equivalent mass transported calculation". *Journal of Membrane Science*, 275, 220-228.

- Lafarga, T. & Hayes, M.** (2014). "Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients". *Meat Science*, 98, 227-239.
- Langevin, M.-E., Roblet, C., Moresoli, C., Ramassamy, C. & Bazinet, L.** (2012). "Comparative application of pressure- and electrically-driven membrane processes for isolation of bioactive peptides from soy protein hydrolysate". *Journal of Membrane Science*, 403-404, 15-24.
- Lanigan, R. S. & Yamarik, T. A.** (2002). "Final report on the safety assessment of BHT". *International Journal of Toxicology*, 21(2), 19-94.
- Lantz, I., Glamsta, E. L., Talback, L. & Nyberg, F.** (1991). "Hemorphins derived from hemoglobin have an inhibitory on angiotensin converting enzyme activity". *FEBS Journal*, 287, 39-41.
- Lapointe, J. F., Gauthier, S. F., Pouliot, Y. & Bouchard, C.** (2006). "Selective separation of cationic peptides from a tryptic hydrolysate of β -lactoglobulin by electrofiltration". *Biotechnology and Bioengineering*, 94, 223-233.
- Lebrun, F., Bazus, A., Dhulster, P. & Guillochon, D.** (1998). "Influence of molecular interaction of bovine haemoglobin hydrolysate with an organic membrane". *Journal of Membrane Science*, 146, 113-124.
- Lentsch, S., Aimar, P. & Orozco, J. L.** (1993). "Enhanced separation of albumin-poly(ethylene glycol) by combination of ultrafiltration and electrophoresis". *Journal of Membrane Science*, 80, 221-232.
- Li-Chan, E. C.** (2015). "Bioactive peptides and proteins hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients". *Current Opinion in Biotechnology*, 1, 28-37.
- Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y. & Su, Z.** (2012). "Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application". *Peptides*, 37, 207-215.
- Lignot, B., Froidevaux, R., Nedjar-Arroume, N. & Guillochon, D.** (1999). "Solvent effect on kinetics of appearance of neokytorphin, VVh4 and a bradykinin-potentiating peptide in the course of peptic hydrolysis of bovine haemoglobin". *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 30, 201-207.
- Linden, G. & Lorient, D.** (1994). *Biochimie agro-industrielle. Valorisation de la production agricole.* (Editions Masson ed.).
- Linderstrom-Lang, K.** (1952). *Proteins and Enzymes III* (S. L. M. Lectures Ed.).
- Linderstrom-Lang, K.** (1953). "Les phases initiales de la dégradation des protéines par les enzymes". *Bulletin de la Société de Chimie Biologique*, 35, 100-116.

- Liu, J., Yu, Z., Zhao, Z., Lin, S., Wang, E., Zhang, Y., Hao, H., Wang, Z. & Chen, F.** (2010). "Isolation and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from egg white proteins hydrolysates". *Food Chemistry*, 4, 1159-1163.
- Lopes, S. C. D. N., Fedorov, A. & Castanho, M. A. R. B.** (2005). "Lipidic membranes are potential "catalysts" in the ligand activity of the multifunctional pentapeptide neokyotorphin". *ChemBioChem*, 6, 697-702.
- Maigrot, E. & Sabates, J.** (1890). "Apparat zur Läuterung von Zuckersäften mittels Elektrizität". *German Patent n°50443*.
- Margot, A., Flaschel, E. & Renken, A.** (1997). "Empirical kinetic models for tryptic whey-protein hydrolysis". *Process Biochemistry*, 32(3), 217-223.
- Martinez-Alvarez, O., Chamorro, S. & Brenes, A.** (2015). "Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review". *Food Research International*, 73, 204-212.
- Marx, V.** (2005). "Watching peptides grow up". *Chemical and Engineering News*, 83(11), 17-24.
- Matsuzaki, K.** (1999). "Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462(1-2), 1-10.
- Matsuzaki, K., Harada, M., Funakoshi, S., Fujii, N. & Miyajima, K.** (1991). "Physicochemical determinants for the interactions of magainins 1 and 2 with acidic lipid bilayers". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1063(1), 162-170.
- Michaelis, L. & Menton, M.** (1913). "Die kinetik der invertinwirkung". *Biochem Z*, 49, 333-369.
- Mora, L., Reig, M. & Toldrà, F.** (2014). "Bioactive peptides generated from meat industry by-products". *Food Research International*, 65, 344-349.
- Moravek, L. & Kostka, V.** (1974). "Complete amino acid of hog pepsin". *FEBS Lett.*, 43, 207-211.
- Nanasombat, S., Khanha, K., Phan-im, J., Jitaied, J., Wannasomboon, S., Patradisakorn, S. & Wongsil, A.** (2012). "Antimicrobial and antioxidant activities of thai local fruit extracts: application of a selected fruit extract, *Phyllanthus emblica* linn. as a natural preservative in raw ground pork during refrigerated storage". *The Online Journal Of Science And Technology*, 2(1), 1-7.
- Nedjar-Arroume, N., Dubois-Delval, V., Adje, E. Y., 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.

- Nedjar-Arroume, N., Dubois-Delval, V., Miloudi, K., Daoud, R., Krier, F., Kouach, M., Briand, G. & Guillochon, D.** (2006). "Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin". *Peptides*, 27, 2082-2089.
- Nicolas, P. & Mor, A.** (1995). "Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates". *Annual Review of Microbiology*, 49, 277-304.
- Noudou, V. Y. K., Suwal, S., Amiot, J., Mikhaylin, S., Beaulieu, L. & Bazinet, L.** (2016). "Simultaneous electroseparation of anionic and cationic peptides: Impact of feed peptide concentration on migration rate, selectivity and relative energy consumption". *Separation and Purification Technology*, 157, 53-59.
- Nyberg, F., Sanderson, K. & Glamsta, E. L.** (1997). "The hemorphins: a new class of opioid peptides derived from the blood protein hemoglobin". *Biopolymers*, 43, 147-156.
- Ontiveros, J. F., Froidevaux, R., Dhulster, P., Salager, J.-L. & Pierlot, C.** (2014). "Haem extraction from peptidic hydrolysates of bovine haemoglobin using temperature sensitive C10E4/O/W microemulsion system". *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*.
- Orts, R. J., Liao, T. H., Sartin, J. L. & Bruot, B.** (1978). "Purification of a tripeptide with anti-reproductive properties isolated from bovine pineal glands". *Physiologist*, 21, 87.
- Parish, C. A., Jiang, H., Tokiwa, Y., Berova, N., Nakanishi, K., McCabe, D., Zuckerman, W., Xia, M. M. & Gabay, J. E.** (2001). "Broad-spectrum antimicrobial activity of hemoglobin". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9, 377-382.
- Pentadeo, M. D. V., Lajolo, F. M. & Santos, N. P. D.** (1979). "Functional and nutritional properties of isolated bovine blood proteins". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 30, 809-815.
- Pfaltzgraff, L. A., Bruyn, M. D., Cooper, E. C., Budarin, V. & Clark, J. H.** (2013). "Food waste biomass: a resource for high-value chemicals". *Green Chemistry*, 15, 307-314.
- Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Pilola, K., Tupasela, T. & Korhonen, H.** (2000). "Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins". *International Dairy Journal*, 7, 299-303.
- Pinto, S. E. S. d. C., Neves, V. A. & Medeiros, B. M. M. d.** (2009). "Enzymatic hydrolysis of sweet lupin, chickpea, and lentil 11S globulins decreases their antigenic activity". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(3), 1070-1075.
- Piot, J. M., Guillochon, D. & Thomas, D.** (1986). "Preparation of decolorized peptides from slaughter-house blood". *MIRCEN Journal*, 2, 359-364.
- Piot, J. M., Zhao, Q. Y., Guillochon, D., Ricart, G. & Thomas, D.** (1992). "Isolation and characterization of a bradykinin potentiating peptide from a bovine peptic hemoglobin hydrolysate". *FEBS Letters*, 299, 75-79.

- Pokrovky, V. M. & Osadchiy, O. E.** (1995). "Regulatory peptides as modulators of vagal influence on cardiac rhythm". *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 73, 1235-1245.
- Popova, I. Y., Vinogradova, O. S., Kokoz, Y. M., Ziganshin, R. K. & Ivanov, V. T.** (2003). "Neuropeptide modulation of evoked responses of neurons in the medial septal region of hibernating ground squirrels in conditions of chronic isolation of the medial septal region from preoptic-hypothalamic structures". *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 33, 521-528.
- Poulin, J. F., Amiot, J. & Bazinet, L.** (2006). "Simultaneous separation of acid and basic bioactive peptides by electro dialysis with ultrafiltration membrane". *Journal of Biotechnology*, 123, 314-328.
- Poulin, J. F., Amiot, J. & Bazinet, L.** (2007). "Improved peptide fractionation by electro dialysis with ultrafiltration membrane: influence of ultrafiltration membrane stacking and electrical field strength". *Journal of Membrane Science*, 299, 83-90.
- Pouliot, Y.** (2008). "Membrane processes in dairy technology - From a simple idea to worldwide panacea". *International Dairy Journal*, 18, 735-740.
- Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P. & Shai, Y.** (1992). "Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholip membranes". *Biochemistry*, 31(49), 12416-12423.
- Powers, J.-P. S. & Hancock, R. E. W.** (2003). "The relationship between peptide structure and antibacterial activity". *Peptides*, 24, 1681-1691.
- Prévo, N., Lesueur-Lambert, C., Fertin-Bazus, A., Fertin, B. & Dhulster, P.** (2003). "Development of a pilot process for the production of alfalfa peptide isolate". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78(5), 518-528.
- Pushpanathan, M., Gunasekaran, P. & Rajendhran, J.** (2013). "Antimicrobial peptides: versatile biological properties". *International Journal of Peptides*, 2013, 675931.
- Raja, S., Murty, V. R., Thivaharan, V., Rajasekar, V. & Ramesh, V.** (2011). "Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules - A review". *Science and Technology*, 1(1), 7-16.
- Regnier, J.** (1983). "Enzymatique bleaching of the cruor of slaughterhouses: process and applications of the product". *Revue Technique des Vétérinaires et de l'Alimentation*, 22, 29-35.
- Roblet, C., Doyen, A., Amiot, J. & Bazinet, L.** (2013). "Impact of pH on ultrafiltration membrane selectivity during EDUF purification of soy peptides from a complex matrix". *Journal of Membrane Science*, 435, 207-217.
- Roos, A. L. D., Edens, L., Beckhoven, R. F. V., Duchateau, A. L. & Kloek, J.** (2011). "Peptides containing tryptophan". *US20110086803*.

- Ryle, A. P.** (1984). *Pepsins, gastricsins and their zymogens*.
- Saadi, S., Saari, N., Anwar, F., Hamid, A. A. & Ghazali, H. M.** (2015). "Recent advances in food biopeptides: production, biological functionalities and therapeutic applications". *Biotechnology Advances*, 33(1), 80-116.
- Santos, E. M., Gonzalez-Fernandez, C., Jaime, I. & Rovira, J.** (2003). "Physicochemical and sensory characterization of Morcilla de Burgos, a traditional Spanish blood sausage". *Meat Science*, 65, 893-898.
- Sasakawa, S.** (1961). "Studies on Hemoglobin. VI. Amino acid composition of the fractionated bovine globin α and β ". *Journal of Biochemistry*, 50, 345-351.
- Saxena, A., Tripathi, B. P., Kumar, M. & Shadi, V. K.** (2009). "Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview". *Advances in Colloid and Interface Science*, 145, 1-22.
- Sazonova, O. V., Blishchenko, E. Y., Kalinina, O. A., Egorova, N. S., Surovoy, A. Y., Philippova, M. M., Karelin, A. A. & Ivanov, V. T.** (2003). "Proliferative activity of neokytorphin-related hemoglobin fragments in cell cultures". *Protein and Peptides Letters*, 10, 386-395.
- Sazonova, O. V., Blishchenko, E. Y., Tolmazova, A. G., Khachin, D. P., Leontiev, K. V., Karelin, A. A. & Ivanov, V. T.** (2007). "Stimulation of fibroblast proliferation by neokytorphin requires Ca influx and activation of PKA, CaMK II and MAPK/ERK". *FEBS Journal*, 274, 474-484.
- Schally, A. V., Huang, W. Y., Redding, T. W., Coy, D. H., Chihara, K., Chang, R. C. C., Raymond, V. & Labrie, F.** (1978). "Isolation, structural elucidation and synthesis of a tetradecapeptide with in vitro ACTH-releasing activity corresponding to residues 33-46 of the α -chain of porcine hemoglobin". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 82, 582-588.
- Schechter, L. & Berger, A.** (1967). "On the size of the active site in proteases I. Papain.". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 27, 157-162.
- Segré, A. & Gaiani, S.** (2012). *Transforming food waste into a resource* (R. Publishing Ed. 1st edition ed.).
- Shai, Y.** (1999). "Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462(1-2), 55-70.
- Shai, Y.** (2002). "Mode of action of membrane active antimicrobial peptides". *Biopolymers*, 66(4), 236-248.
- Shroeder, W. A., Shelton, J. R., Shelton, J. B., Robberson, B. & Babin, D. R.** (1967). "A comparison of amino acid sequences in the beta-chains of adult bovine hemoglobins A and B". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 120, 633-638.

- Spellman, D., McEvoy, E., O'Cuinn, G. & Fitzgerald, R. J.** (2003). "Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis". *International Dairy Journal*, 13, 447-453.
- Stewart, K. M., Horton, K. L. & Kelley, S. O.** (2008). "Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine". *Organic and Biomolecular Chemistry*, 6, 2242-2255.
- Strathmann, H.** (1981). "Membrane separation processes". *Journal of Membrane Science*, 9, 121-189.
- Strepel, N., Strehmel, J. & Overhage, J.** (2015). "Potential application of antimicrobial peptides in the treatment of bacterial biofilm infections". *Current Pharmaceutical Design*, 21, 67-84.
- Suwal, S., Roblet, C., Doyen, A., Amiot, J., Beaulieu, L., Legault, J. & Bazinet, L.** (2014). "Electrodialytic separation of peptides from snow crab by-product hydrolysate: Effect of cell configuration on peptide selectivity and local electric field". *Separation and Purification Technology*, 127, 29-38.
- Takagi, H., Shiomi, H., Fukui, K., Hayashi, K., Kiso, Y. & Kigatawa, K.** (1982). "Isolation of a novel analgesic pentapeptide, neo-kyotorphin, from bovine brain". *Life Sciences*, 31, 1733-1736.
- Tanaka, T. & Yada, R. Y.** (2001). "N-terminal portion acts as an initiator of the inactivation of pepsin at neutral pH". *Protein Engineering*, 14, 669-674.
- Tanaka, Y.** (2002). "Water dissociation in ion-exchange membrane electro dialysis". *Journal of Membrane Science*, 203, 227-244.
- Tavano, O. L.** (2013). "Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1-11.
- Tognarelli, D., Tsukamoto, A., Caldwell, J. & Caldwell, W.** (2010). "Rapid peptide separation by supercritical fluid chromatography". *Bioanalysis*, 2(1), 5-7.
- Toke, O.** (2005). "Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections". *Biopolymers*, 80, 717-735.
- Tsou, M.-J., Lin, W., Lu, H., Tsui, Y. & Chiang, W.** (2010). "The effect of limited hydrolysis with neutrase and ultrafiltration on the anti-adipogenic activity of soy protein". *Process Biochemistry*, 45, 217-222.
- Tuck, C. O., Pérez, E., Horvath, I. T., Sheldon, R. A. & Poliakoff, M.** (2012). "Valorization of biomass: deriving more value from waste". *Science*, 337(6095), 695-699.

- Tybor, P. T., Dill, C. W. & Landmann, W. A.** (1973). "Effect of decolorization and lactose incorporation on the emulsification capacity of spray-dried blood protein concentrates". *Journal of Food Science*, 38, 4-6.
- Udenigwe, C. C. & Aluko, R. E.** (2012). "Food protein derived bioactive peptides: production, processing and potential health benefits". *Journal of Food Science*, 71, 11-24.
- Ueda, H., Ge, M., Satoh, M. & Takagi, H.** (1987). "Non-opioid analgesia of the neuropeptide, neo-kyotorphin and possible mediation by inhibition of GABA release in the mouse brain". *Peptides*, 8, 905-909.
- Vanhoute, M., Firdaous, L., Bazinet, L., Froidevaux, R., Lecouturier, D., Guillochon, D. & Dhulster, P.** (2010). "Effect of haem on the fractionation of bovine haemoglobin peptic hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membranes". *Journal of Membrane Science*, 365, 16-24.
- Vanhoute, M., Froidevaux, R., Pierlot, C., Krier, F., Aubry, J.-M. & Guillochon, D.** (2008). "Advancement of foam separation of bioactive peptides using an aeration column with a bubbling-draining method". *Separation and Purification Technology*, 63, 460-465.
- Vercaigne-Marko, D., Kosciarz, E., Nedjar-Arroume, N. & Guillochon, D.** (2000). "Improvement of Staphylococcus aureus-V8-protease hydrolysis of bovine haemoglobin by its adsorption on to a solid phase in the presence of SDS: Peptide mapping and obtention of two haemopoietic peptides". *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31(2), 127-134.
- Vorm, O., Roepstorff, R. & Mann, M.** (1994). "Improved resolution and very high sensitivity in MALDI-TOF of matrix surfaces made by fast evaporation". *Analytical Chemistry*, 66, 3281-3287.
- Wieprecht, T., Dathe, M., Beyermann, M., Krause, E., Maloy, W., MacDonald, D. L. & Bienert, M.** (1997). "Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes". *Biochemistry*, 36(20), 6124-6132.
- Witte, V. C., Krause, G. F. & Baily, M. E.** (1970). "A new extraction method for determining 2-thiobarbituric acid values of pork and beef during storage". *Food Science*, 35, 582-585.
- Woodley, J. M., Breuer, M. & Mink, D.** (2013). "A future perspective on the role of industrial biotechnology for chemicals production". *Chemical Engineering Research and Design*, 91, 2029-2036.
- Xiang, F. & Beavis, R. C.** (1994). "A method to increase contaminant tolerance in protein matrix-assisted laser desorption ionization by the fabrication of thin protein-doped polycrystalline film". *Rapid Communication of Mass Spectrometry*, 8, 199-204.
- Yang, L., Weiss, T. M., Lehrer, R. I. & Huang, H. W.** (2000). "Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin". *Biophysical Journal*, 79, 2002-2009.

- Yeaman, M. R. & Yount, N. Y.** (2003). "Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance". *Pharmacological reviews*, 55, 27-55.
- Zaslhoff, M.** (2002). "Antimicrobial peptides of multicellular organisms". *Nature*, 415(6870), 389-395.
- Zeisel, S. H.** (1999). "Regulation of "nutraceuticals"". *Science*, 285, 1853-1855.
- Zhao, Q. & Piot, J. M.** (1997a). "Neokytorphin formation and quantitative evolution following human hemoglobin hydrolysis with cathepsin D". *Peptides*, 19(4), 759-766.
- Zhao, Q., Piot, J. M., Gautier, V. & Cottenceau, G.** (1996a). "Isolation and characterization of a bacterial growth-stimulating peptide from a peptic bovine hemoglobin hydrolysate". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(6), 778-784.
- Zhao, Q., Sannier, F., Garreau, I., Guillochon, D. & Piot, J. M.** (1994). "Inhibition and inhibition kinetics of angiotensin converting enzyme activity by hemorphins, isolated from peptic bovine hemoglobin hydrolysate". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 204, 216-233.
- Zhao, Q. Y. & Piot, J. M.** (1997b). "Investigation of inhibition angiotensin-converting enzyme (ACE) activity and opioid activity of two hemorphins, LVV-hemorphin-5 and VV-hemorphin-5, isolated from a defined peptic hydrolysate of bovine hemoglobin". *Neuropeptides*, 2, 147-153.
- Zhao, Q. Y., Piot, J. M., Gautier, V. & Cottenceau, G.** (1996b). "Peptic peptide mapping by HPLC, on line with photodiode array detection, of a haemoglobin hydrolysate produced at pilot-plant scale from an ultrafiltration process". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 778-784.
- Zhao, Q. Y., Sannier, F. & Piot, J. M.** (1996c). "Kinetics of appearance of four hemorphins from bovine hemoglobin peptic hydrolysates by HPLC coupled with photodiode array detection". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1295, 73-80.
- Zhao, Q. Y., Sannier, F., Ricart, G. & Piot, J. M.** (1995). "A rapid detection and identification of hemorphins released from bovine hemoglobin enzymatic hydrolysate by use of HPLC coupled with Photodiode Array Detector". *Journal of Liquid Chromatography*, 18(1), 93-103.
- Zumbusch, P. V., Kulcke, W. & Brunner, G.** (1998). "Use of alternating electrical fields as anti-fouling strategy in ultrafiltration of biological suspensions - Introduction of a new experimental procedure for crossflow filtration". *Journal of Membrane Science*, 80, 221-232.

Liste des figures

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de valorisation du sang bovin issu des abattoirs (Bah et al., 2013)	34
Figure 2 : Représentation spatiale de l'hémoglobine bovine.....	35
Figure 3 : Séquence en acides aminés de la chaîne α de l'hémoglobine bovine	35
Figure 4 : Structure secondaire de la chaîne α de l'hémoglobine bovine : représentation linéaire (a) et représentation spatiale (b)	36
Figure 5 : Séquence en acides aminés de la chaîne β de l'hémoglobine bovine	36
Figure 6 : Structure secondaire de la chaîne β de l'hémoglobine bovine : représentation linéaire (a) et représentation spatiale (b)	37
Figure 7 : Structure de l'hème	37
Figure 8 : Représentation spatiale de la pepsine porcine	39
Figure 9 : Séquence en acides aminés de la pepsine porcine et structure secondaire	40
Figure 10 : Nomenclature de Schechter et al. (1967) pour la description des sites actifs des protéases, appliquée à la pepsine porcine.....	40
Figure 11 : Représentation schématique des activités biologiques identifiées pour les peptides issus de l'hémoglobine bovine.....	43
Figure 12 : Représentation schématique des peptides antimicrobiens de la chaîne α de l'hémoglobine bovine	44
Figure 13 : Représentation schématique des peptides bioactifs de la chaîne α de l'hémoglobine bovine hors antimicrobiens	45
Figure 14 : Représentation schématique des peptides antimicrobiens de la chaîne β de l'hémoglobine bovine	46
Figure 15 : Représentation schématique des peptides bioactifs issus de la chaîne β de l'hémoglobine bovine hors antimicrobiens.....	47
Figure 16 : Représentation schématique de la multifonctionnalité des peptides antimicrobiens (Pushpanathan et al., 2013)	52
Figure 17 : Structure secondaire d'un peptide antimicrobien en hélice α amphiphile (Powers et al., 2003).....	54

Figure 18 : Structure secondaire des peptides antimicrobiens organisés en feuillets β (Powers et al., 2003).....	55
Figure 19 : Structure secondaire d'un peptide non structuré (Powers et al., 2003).....	55
Figure 20 : Représentation du modèle en douves de tonneau (Etienne, 2004).....	61
Figure 21 : Représentation du modèle en pores toroïdaux (Etienne, 2004).....	61
Figure 22 : Représentation du modèle en tapis (Etienne, 2004)	62
Figure 23 : Modèle de Shai, Matsuzaki et Yang (Zaslhoff, 2002).....	63
Figure 24 : Structure de l' α 137-141 (Lopes et al., 2005).....	68
Figure 25 : Changement d'orientation du noyau aromatique de la tyrosine de la néokyotorphine après interaction avec une membrane biologique (Lopes et al., 2005)	70
Figure 26 : Schéma global de purification de composés à haute valeur ajoutée à partir de déchets de l'industrie agroalimentaire (Galanakis, 2012) (A) technologies classiques ; (B) technologies émergentes	73
Figure 27 : Les procédés membranaires en industrie laitière (Pouliot, 2008).....	76
Figure 28 : Représentation schématique des procédés baromembranaires et des solutés retenus en fonction du seuil de coupure (Bazinet et Firdaous, 2013).....	77
Figure 29 : Principe de l'ultrafiltration (Saxena et al., 2009)	77
Figure 30 : Principe de l'électro-ultrafiltration (Saxena et al., 2009).....	79
Figure 31 : Schéma d'électrodialyse conventionnelle	80
Figure 32 : Schéma de l'électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration en configuration simultanée (EDUF)	82
Figure 33 : Schéma de fonctionnement d'une chaîne CLHP.....	88
Figure 34 : Gamme étalon de l' α 137-141 par dosage en CLHP-PI.....	91
Figure 35 : Schéma de fonctionnement général d'un spectromètre de masse	92
Figure 36 : Principe de l'ionisation des composés à analyser en MALDI	94
Figure 37 : Schéma du fonctionnement général d'une source ElectroSpray/ IonSpray	95
Figure 38 : Évolution du degré d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine purifiée au cours de son hydrolyse par la pepsine porcine (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11, C _{HB} = 1%, p/v).....	105

Figure 39 : Profils chromatographiques d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine purifiée à 215 nm par CLHP-PI, analysés par colonne de type C ₄ (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11, C _{HB} = 1%, p/v).....	107
Figure 40 : Représentation schématique de l'hydrolyse pepsique du peptide α 107-141 (Catiau et al., 2011b).....	108
Figure 41 : Profils chromatographiques d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine purifiée comparée au cruor bovin à 215 nm par CLHP-PI, analysés par colonne de type C ₄ (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11, C _{HB} = 1%, p/v).....	110
Figure 42 : Comparaison des spectres en dérivée seconde entre (a) le peptide α 137-141 standard et (b) le peptide α 137-141 issu de l'hydrolyse du cruor bovin purifié par CLHP-PI.....	112
Figure 43 : Spectre MALDI-TOF de la fraction suspectée de contenir le peptide α 137-141 au sein de l'hydrolysate de cruor bovin, isolée par CLHP-PI avec une colonne de type C ₄	112
Figure 44 : Profils chromatographiques d'hydrolyses du cruor bovin à 215 nm par CLHP-PI, analysés par colonne de type C ₄ pour différentes concentration initiale en hémoglobine bovine (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11).....	117
Figure 45 : Cinétique d'apparition du peptide α 137-141 au cours de l'hydrolyse pepsique du cruor bovin à différentes concentrations en hémoglobine bovine (p/v) (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11).....	118
Figure 46 : Rendements de production de l' α 137-141 au cours de l'hydrolyse pepsique du cruor bovin à différentes concentrations (p/v) (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11).....	120
Figure 47 : Photographie de la cellule d'électrodialyse utilisée	146
Figure 48 : Schéma de la configuration cationique de l'électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration utilisée	146
Figure 49 : Comparaisons des profils chromatographiques entre hydrolysats complets et hydrolysats décolorés à différents DH	151
Figure 50 : Évolution des conductivités au sein du compartiment de l'hydrolysate d'hémoglobine bovine (1%, p/v) au cours de l'EDUF	152
Figure 51 : Évolution des conductivités au sein de la solution de récupération selon la séparation de différents degrés d'hydrolyse d'hémoglobine bovine (1%, p/v) par EDUF	153
Figure 52 : Représentation schématique de la migration ionique de la solution de récupération au cours de l'EDUF en configuration cationique	154
Figure 53 : Évolution du pH au sein du compartiment de récupération selon la séparation de différents degrés d'hydrolyse d'hémoglobine bovine (1%, p/v) par EDUF.....	156

Figure 54 : Représentation schématique de la migration ionique après dépassement de la densité de courant limite au sein de la solution de récupération au cours de l'EDUF en configuration cationique.....	157
Figure 55 : Évolution de l'intensité du courant électrique au sein de la cellule d'EDUF lors de la séparation de différents degrés d'hydrolyse d'hémoglobine bovine (1%, p/v).....	158
Figure 56 : Profils chromatographiques du compartiment de récupération après 4 heures de séparation en EDUF selon différents degrés d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine (1%, p/v).....	160
Figure 57 : Évolution de la concentration peptidique totale au sein du compartiment de récupération durant 4 heures d'EDUF pour la séparation d'hydrolysats d'hémoglobine bovine (1%, p/v) selon différents degrés d'hydrolyse	166
Figure 58 : Évolution de la concentration en α 137-141 au sein du compartiment de récupération durant 4 heures d'EDUF pour la séparation d'hydrolysats d'hémoglobine bovine (1%, p/v) selon différents degrés d'hydrolyse.....	168
Figure 59 : Évolution des conductivités au sein de la solution de récupération pour la séparation d'un hydrolysats d'hémoglobine bovine (DH de 5% ; 1%, p/v) par EDUF, avec et sans maintien du pH à 4.7	171
Figure 60 : Évolution des conductivités au sein de la solution d'alimentation selon la séparation d'un hydrolysats d'hémoglobine bovine (DH de 5% ;1%, p/v) par EDUF, avec et sans maintien du pH à 4.7	171
Figure 61 : Évolution de l'intensité du courant électrique au sein de la cellule d'EDUF lors de la séparation de l'hydrolysats d'hémoglobine bovine (DH 5% ; 1%, p/v) avec et sans contrôle du pH à 4.7	172
Figure 62 : Évolution de la concentration peptidique totale au sein du compartiment de récupération durant 4 heures d'EDUF pour la séparation d'un hydrolysats d'hémoglobine bovine (DH 5% ; 1%, p/v) avec et sans contrôle du pH à 4.7	173
Figure 63 : Chromatogrammes comparant les solutions de récupération avec et sans contrôle du pH (4.7)	174
Figure 64 : Cartographie peptidique des peptides récupérés à différents pH de travail au sein de l'EDUF.....	178
Figure 65 : Évolution de la concentration en α 137-141 au sein du compartiment de récupération durant 4 heures d'EDUF pour la séparation d'un hydrolysats d'hémoglobine bovine (DH 5% ; 1%, p/v) avec et sans contrôle du pH à 4.7	181
Figure 66 : Évolution de la teneur en 137-141 au sein de la solution de récupération lors de la séparation par EDUF d'un hydrolysats d'hémoglobine bovine (DH 5% ; 1%, p/v), avec et sans maintien du pH à 4.7	182

Figure 67 : Évolution des conductivités au sein de la solution d'alimentation selon la séparation d'un hydrolysate d'hémoglobine bovine (DH de 5% ; 1% p/v) par EDUF à différents pH.....	184
Figure 68 : Évolution des conductivités au sein de la solution de récupération pour la séparation d'un hydrolysate d'hémoglobine bovine (DH de 5% ; 1%, p/v) par EDUF, à différents pH de travail	185
Figure 69 : Évolution de l'intensité du courant électrique au sein de la cellule d'EDUF lors de la séparation de l'hydrolysate d'hémoglobine bovine (DH 5% ; 1% p/v) selon différents pH.....	185
Figure 70 : Évolution de la concentration peptidique totale au sein du compartiment de récupération durant 4 heures d'EDUF pour la séparation d'un hydrolysate d'hémoglobine bovine (DH 5% ; 1%, p/v) à différents pH.....	186
Figure 71 : Chromatogrammes comparant la récupération de peptides après 4 h d'EDUF lors de la séparation d'hydrolysate d'hémoglobine bovine (DH 5% ; 1%, p/v) à différents pH.....	187
Figure 72 : Évolution de la concentration en α 137-141 au sein du compartiment de récupération durant 4 heures d'EDUF pour la séparation d'un hydrolysate d'hémoglobine bovine (DH 5% ; 1%, p/v) à différents pH	189
Figure 73 : Évolution des conductivités au sein de l'hydrolysate (DH 5%) selon différentes concentrations peptidiques (p/v)	192
Figure 74 : Évolution des conductivités au sein du compartiment de récupération selon différentes concentrations peptidiques (p/v)	193
Figure 75 : Évolution des intensités du courant électrique selon différentes concentrations peptidiques (p/v) de l'hydrolysate (DH 5%)	193
Figure 76 : Migration des peptides totaux au sein du compartiment de récupération durant 2 heures d'EDUF	194
Figure 77 : Profils chromatographiques des solutions de récupération obtenues après 2 h d'EDUF à pH 9 et selon différentes concentrations peptidiques en alimentation	195
Figure 78 : Migration de l' α 137-141 au sein du compartiment de récupération durant les 2 h d'EDUF.....	197
Figure 79 : Schéma de la boîte de Pétri utilisée pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne	207
Figure 80 : Évaluation de l'oxydation des lipides de la viande hachée traitée avec le peptide α 137-141 et le BHT aux concentrations de 0.1 et de 0.5% (p/p) durant le stockage sous réfrigération (4°C).....	213

Figure 81 : Évolution de la croissance microbienne totale au sein de la viande non-traitée et traitée avec le BHT et l'α137-141 aux concentrations de 0.1 et 0.5% (p/p) durant 14 jours de conservation sous réfrigération (4°C)	215
Figure 82 : Évolution de la croissance des bactéries coliformes au sein de la viande non-traitée et traitée avec le BHT et l'α137-141 aux concentrations de 0.1 et 0.5% (p/p) durant 14 jours de conservation sous réfrigération (4°C)	215
Figure 83 : Évolution de la croissance des moisissures et des levures au sein de la viande non-traitée et traitée avec le BHT et l'α137-141 aux concentrations de 0.1 et 0.5% (p/p) durant 14 jours de conservation sous réfrigération (4°C).....	216
Figure 84 : Évolution de la croissance des bactéries lactiques au sein de la viande non-traitée et traitée avec le BHT et l'α137-141 aux concentrations de 0.1 et 0.5% (p/p) durant 14 jours de conservation sous réfrigération (4°C)	217
Figure 85 : Évaluation de l'oxydation des lipides de la viande hachée traitée avec la fraction d'EDUF, le BHT et l'α137-141 à 0.5% (p/p) durant le stockage sous réfrigération (4°C).....	219
Figure 86 : Évolution de la croissance bactérienne totale au sein de la viande non-traitée et traitée avec le BHT, l'α137-141 et la fraction d'EDUF à la concentration de 0.5% (p/p) durant 14 jours de conservation sous réfrigération (4°C).....	220
Figure 87 : Évolution de la croissance des bactéries coliformes au sein de la viande non-traitée et traitée avec le BHT, l'α137-141 et la fraction d'EDUF à la concentration de 0.5% (p/p) durant 14 jours de conservation sous réfrigération (4°C).....	221
Figure 88 : Évolution de la croissance des levures et moisissures au sein de la viande traitée et non-traitée avec le BHT, l'α137-141 et la fraction d'EDUF à la concentration de 0.5% (p/p) durant 14 jours de conservation sous réfrigération (4°C)	222
Figure 89 : Évolution de la croissance des bactéries lactiques au sein de la viande traitée et non-traitée avec le BHT, l'137-141 et la fraction d'EDUF à la concentration de 0.5% (p/p) durant 14 jours de conservation sous réfrigération (4°C).....	223

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1 : Peptides opioïdes issus de l'hémoglobine bovine	48
Tableau 2 : Peptides hématopoïétiques issus de l'hémoglobine bovine.....	49
Tableau 3 : Peptides potentialisateur de la bradykinine, hypolipidémiant, stimulateur de la croissance bactérienne, anti-hypertenseurs et coronaro-constricteurs issus de l'hémoglobine bovine	50
Tableau 4 : Peptides antimicrobiens issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine	65
Tableau 5 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de peptides purs issus de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine isolés par CLHP-PI (Catiau et al., 2011b; Nedjar-Arroume et al., 2008; Nedjar-Arroume et al., 2006)	69
Tableau 6 : Procédés de fractionnement d'hydrolysats et critères de sélectivité mis à profit	72
Tableau 7 : Concentrations du peptide α 137-141 (mg.L^{-1}) au cours de l'hydrolyse du cruor bovin à différentes concentrations en hémoglobine bovine (p/v) (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11).....	119
Tableau 8 : Répartition des masses molaires (Da) des peptides d'hydrolysats d'hémoglobine bovine ou du cruor bovin à différents degrés d'hydrolyse et évolution du nombre total de peptides générés au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine porcine (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11).....	122
Tableau 9 : Séquences peptidiques identifiées au sein de l'hydrolysats d'hémoglobine bovine à un DH de 3% (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11)	123
Tableau 10 : Séquences peptidiques identifiées au sein de l'hydrolysats d'hémoglobine bovine à un DH de 5% (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11)	125
Tableau 11 : Séquences peptidiques identifiées au sein de l'hydrolysats d'hémoglobine bovine à un DH de 10% (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11)	128
Tableau 12 : Séquences peptidiques identifiées au sein de l'hydrolysats d'hémoglobine bovine à un DH de 13% (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11)	132
Tableau 13 : Séquences peptidiques identifiées au sein de l'hydrolysats d'hémoglobine bovine à un DH de 18% (pH 3.5, 23°C, E/S = 1/11)	136

Tableau 14 : Répartition des masses moléculaires (Da) des peptides ayant migré au sein du KCl après 4 heures d'EDUF lors de la séparation d'hydrolysats d'hémoglobine bovine (1%, p/v) selon différents degrés d'hydrolyse	161
Tableau 15 : Séquences peptidiques identifiées au sein du compartiment de récupération lors de la séparation par EDUF de l'hydrolysats d'hémoglobine bovine (1%, p/v) à un DH de 3%	161
Tableau 16 : Séquences peptidiques identifiées au sein du compartiment de récupération lors de la séparation par EDUF de l'hydrolysats d'hémoglobine bovine (1%, p/v) à un DH de 5%	162
Tableau 17 : Séquences peptidiques identifiées au sein du compartiment de récupération lors de la séparation par EDUF de l'hydrolysats d'hémoglobine bovine (1%, p/v) à un DH de 10%	163
Tableau 18 : Séquences peptidiques identifiées au sein du compartiment de récupération lors de la séparation par EDUF de l'hydrolysats d'hémoglobine bovine (1%, p/v) à un DH de 13%	164
Tableau 19 : Séquences peptidiques identifiées au sein du compartiment de récupération lors de la séparation par EDUF de l'hydrolysats d'hémoglobine bovine (1%, p/v) à un DH de 18%	165
Tableau 20 : Tableau récapitulatif de la migration de l' α 137-141 après 4 heures d'EDUF.....	167
Tableau 21 : Identification des peptides au sein des solutions de récupération selon le contrôle du pH lors de la séparation d'un hydrolysats d'hémoglobine bovine (DH 5%, 1%, p/v).....	175
Tableau 22 : Peptides identifiés au sein de la solution KCl lors de la séparation d'hydrolysats d'hémoglobine bovine (DH 5% ; 2, 5 et 8%, p/v)	196
Tableau 23 : Dénombrement des souches bactériennes par mesure de la densité optique ...	207
Tableau 24 : Activité antimicrobienne du peptide actif 137-141, de l'hydrolysats total à un DH de 5% et de la fraction d'EDUF par mesure du halo d'inhibition (en mm).....	210
Tableau 25 : Activités antimicrobiennes des peptides retrouvés au sein de la fraction d'EDUF	211
Tableau 26 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour les peptides retrouvés au sein de la fraction d'EDUF.....	212
Tableau 27 : Comparaison des croissances microbiennes sur la viande hachée lors de l'application de l' α 137-141 à 0.1% (p/p) et de la fraction d'EDUF à 0.5% (p/p) à 14 jours	224

Annexes

Available at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jff

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

Assaâd Sila ^{a,b,*}, Karima Hedhili ^b, Rémi Przybylski ^b,
Semia Ellouz-Chaabouni ^a, Pascal Dhulster ^b, Ali Bougatef ^a,
Naima Nedjar-Arroume ^b

^a Unité Enzymes et Bioconversion, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, Université de Sfax, PB 1173, Sfax 3038, Tunisia

^b Institut Charles Viollette, équipe ProBioGEM, Polytech'Lille, Boulevard Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 July 2014

Received in revised form 30

September 2014

Accepted 2 October 2014

Available online

Keywords:

Peptides

Antibacterial activity

Mode of action

Membrane permeability

Listeria monocytogenes

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 toward six strains and their hemolytic activity toward 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.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

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 & Vane, 2007).

* Corresponding author. Unité Enzymes et Bioconversion, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, Université de Sfax, PB 1173, Sfax 3038, Tunisia. Tel.: +216 97 013 118; fax: +216 74 275 595.

E-mail address: assaadsila@gmail.com (A. Sila).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.006>

1756-4646/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

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 1600 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 hemoglobin (Catiau et al., 2011; Daoud et al., 2005; Nedjar-Arroume et al., 2008; Yaba Adje et al., 2011). Antibacterial peptides derived from marine organisms by enzymatic treatment have been described (Beaulieu, Thibodeau, Bonnet, Bryl, & Carbonneau, 2013; Doyen, Saucier, Beaulieu, 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 M Ω . 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 18 h of incubation to 30 °C in nutrient broth, for *M. luteus*, and 37 °C for the other bacterial strains, the bacterial cultures were centrifuged at 26,800 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 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 μ l) to wells punched in the agarose layer allowed to diffuse in the layer and incubated in a humidified close container during 3 h at 4 °C for *M. luteus* and at 37 °C for other strains. Following this diffusion period, 10 ml of 1% Agar and 42 g/l Muller–Hinton were added as a top layer and plates were incubated 24 h at 37 °C. With *M. luteus*, no top layer was used and plates were incubated 24 h at 30 °C.

The antibacterial activity was measured as the diameter of the clear zone of growth inhibition compared with a positive control, 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 determined 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 μ l) was distributed in a microtiter plate well and 100 μ l of the peptide was 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 μ l of a suspension of 10^6 CFU/ml. After 24 h of incubation at 37 °C the cells concentration was around 10^9 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 h. After incubation, the culture was centrifuged for 15 min at 26,800 g at 4 °C (Beckman J2-21M centrifuge) in order 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 5 g/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 5 g/l (PIPES buffer pH 6.5) was added after 5 min 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 was 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 min. The samples

were filtered at 0.45 μ m. Each 500 μ l sample was added to 4.5 ml of sulphuric acid with 1M/ClCs 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 in 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 was added and incubated at 4 °C for 1 h. 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. Hemolytic 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 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. Antibacterial activity

We recently isolated 10 new antibacterial peptides from the barbel muscle proteins and their molecular masses and amino acid 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 toward 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

Table 2 – Structural characteristics of the pure antibacterial peptides.

Peptides	Masses (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>).

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

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 (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 portions 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, QLGTSHAQVPVF and

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

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	+	–	++	+	+	++

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

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 barbel 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 antimicrobial peptides (except: Gly-Val-His) show a significant antimicrobial activity with a low MIC. Among the seven antimicrobial 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 concentration 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 antimicrobial 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 (Lou & Yousef, 1999; Murphy & Meullenet, 2006). 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 (Lou & Yousef, 1999; Murphy & Meullenet, 2006).

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. Fig. 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^+ (Fig. 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 *Petinus 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. Fig. 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

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

–: no activity.

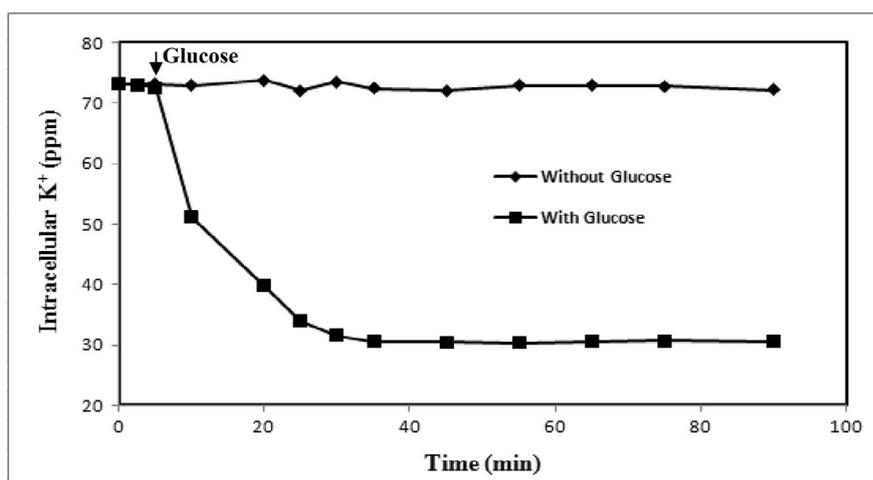


Fig. 1 – Effect of glucose addition on intracellular potassium of cell suspensions of *L. monocytogenes*.

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 toward *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 no 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 Fig. 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

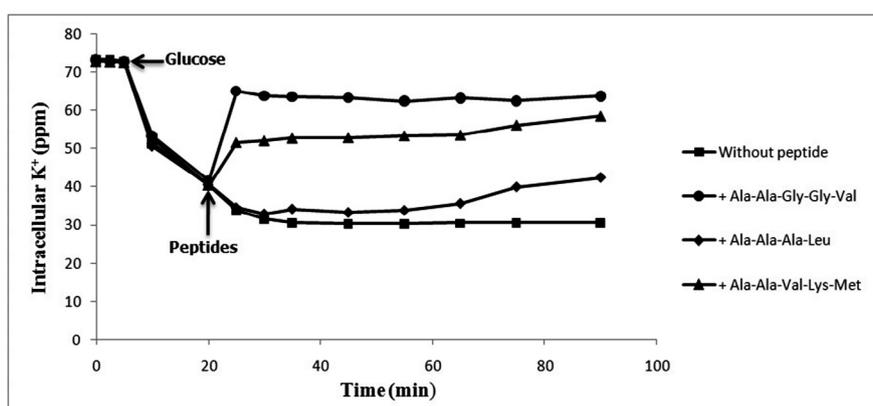


Fig. 2 – Effect of barbel peptides addition on intracellular potassium of cell suspensions of *L. monocytogenes*.

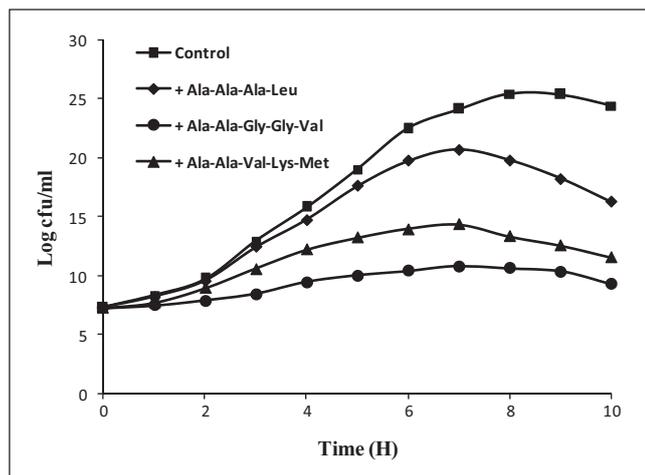


Fig. 3 – Determination of the antibacterial activity of barbel peptides. Activity against *L. monocytogenes* in liquid culture medium.

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. Hemolytic activity of antibacterial peptides

Hemolysis of erythrocytes was measured to assess the cytotoxicity of peptides against normal mammalian cells. Barbel peptides did not cause hemolysis. The hemolytic activity of most active peptides was tested on bovine erythrocytes. Several concentrations for each peptide were tested (Ala-Ala-Ala-Leu (1.6–16 μM); Ala-Ala-Gly-Gly-Val (0.37–10 μM); Ala-Ala-Val-Lys-Met (0.25–14 μM)). 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 hemolysis 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, Scientific Research and Information and Communication Technologies, Tunisia and also by CMCU project (12G0915).

REFERENCES

- Beaulieu, L., Thibodeau, J., Bonnet, C., Bryl, P., & Carbonneau, 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, 633–638.
- 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 membrane active 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). Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. *FEBS Letters*, 491, 159–163.
- Ganz, T., & Lehrer, R. I. (1998). Antimicrobial peptides of vertebrates. *Current Opinion in Immunology*, 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. In E. T. Ryser & E. H. Marth (Eds.), *Listeria, listeriosis, and food safety* (2nd ed., pp. 131–224). New York: Marcel Dekker Inc.
- 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, 969–977.
- 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., McCabe, D., Zuckerman, W., Xia, M. M., & Gabay, J. E. (2001). Broad-spectrum antimicrobial activity of hemoglobin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9, 377–382.
- 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, 1681–1691.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jff

Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein concentrate

Abir Mokni Ghribi ^a, Assaâd Sila ^{b,c}, Rémi Przybylski ^c,
Naima Nedjar-Arroume ^c, Ines Makhlouf ^a, Christophe Blecker ^d,
Hamadi Attia ^a, Pascal Dhulster ^c, Ali Bougatef ^b, Souhail Besbes ^{a,*}

^a Université de Sfax, Laboratoire Analyses Alimentaires, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, route Soukra, Sfax 3038, Tunisia

^b Unité Enzymes et Bioconversion, Ecole nationale d'Ingénieurs, Université de Sfax, Sfax 3038, Tunisia

^c Institut Régional de Recherche en Agroalimentaire et Biotechnologie: Charles Viollette, EA1026, Equipe ProBioGEM, Université Lille 1, France

^d Université de Liège, Gembloux Agro Bio-Tech, Unité de Technologie des Industries Agro-Alimentaires, passage des Déportés 2, Gembloux 5030, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2014

Received in revised form 4

December 2014

Accepted 5 December 2014

Available online

Keywords:

Chickpea

Protein concentrate

Antioxidant activity

Peptide

Mass spectrometry

ABSTRACT

Enzymatic hydrolysis of chickpea protein concentrate (CP) by Alcalase® and some physicochemical and antioxidant properties of the resulting hydrolysate (CPH) were characterised. CPH displayed higher antioxidant activity than CP. This hydrolysate was fractionated by size exclusion chromatography on a Sephadex G-25 into four major fractions (Fra.I, Fra.II, Fra.III, and Fra.IV). Fraction III, which exhibited the highest DPPH scavenging activity (54% at 1 mg/ml), was then fractionated by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). Eleven antioxidant fractions were isolated and two peptide sub-fractions show antioxidant activity (P3 and P8). The P8 displayed the highest DPPH radical-scavenging activity (67%; at 200 µg/ml) among these peptides subfractions. The molecular masses and amino acids sequences of the purified peptides were determined using ESI-MS and ESIMS/MS, respectively. Their structures were identified as Asp-His-Gly and Val-Gly-Asp-Ile. These peptides did not show haemolytic activity towards bovine erythrocytes. The results suggest that CPH are good source of natural antioxidants.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Oxidation of biomolecules has many undesirable impacts on food because it is a major cause of deleterious quality changes

that can influence the colour, flavour and texture. Furthermore, oxidative stress can also modify proteins, DNA and small cellular molecules, and it is thought to have a significant role in the occurrence of diseases, such as cancer, arteriosclerosis, cardiovascular diseases, diabetes mellitus, neurological

* Corresponding author. Laboratoire Analyses Alimentaires, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, Université de Sfax, route Soukra, Sfax 3038, Tunisia. Tel.: +216 26 65 15 54; fax: +216 74675761.

E-mail address: besbes.s@voila.fr (S. Besbes).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.011>

1756-4646/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

disorders and Alzheimer's disease (Halliwell, 2002; Stadtman, 2006). Recently, hydrolysis of proteins from plants and animals to generate bioactive peptides has attracted much attention. Antioxidative peptides have been purified from many protein hydrolysates such soybean (Moure, Domínguez, & Parajó, 2006), rice bran (Parrado et al., 2006), canola (Cumby, Zhong, Naczek, & Shahidi, 2008), Chinese leek (Hong, Chen, Hu, Yang, & Wang, 2014), sweet potato (Zhang, Mu, & Sun, 2014) and fish protein (Bougatef et al., 2010).

Peptides derived from natural sources have been the focus of great interest because of their potential health benefits associated with low molecular weight, low cost and high activity (Sarmadi & Ismail, 2010). These antioxidants can act as inhibitors of lipid peroxidation, as direct scavengers of free radicals and as agents to chelate the transition metal ions that catalyse the generation of radical species (Zhang, Sun et al., 2011).

Chickpea seeds are considered a good source of dietary proteins because of their well-balanced amino acid composition, high protein bioavailability, and relatively low levels of antinutritional factors (Friedman, 1996). Various biological activities, including antioxidant activity, antifungal activity, reduction of antigenic activity, metal-chelating ability and angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibition, have been reported for chickpea protein hydrolysate (Kou et al., 2013; Torres-Fuentes, Alaiz, & Vioque, 2011; Yust et al., 2003; Zhang, Li, Miao, & Jiang, 2011). Moreover, the use of natural protein hydrolysates have been the subject of several research works, because of their antioxidant potential. However, to the best of our knowledge, there is little information concerning the antioxidant properties of chickpea protein hydrolysate and the sequence of chickpea-derived peptides.

Therefore, the objective of the present study was to identify the antioxidative potentials and the structure (molecular weight and amino acid sequence) of peptides derived from chickpea. For this purpose, the extracted chickpea was enzymatically hydrolysed to obtain antioxidant peptides, and the antioxidant potential of chickpea hydrolysate (CPH) was investigated using several measurements, including scavenging activity on DPPH, the reducing power, metal-chelating activity and β -carotene bleaching inhibition activity. Furthermore, two new antioxidative peptides were isolated from the hydrolysate and their amino acid composition was also evaluated to elucidate their relationship with antioxidant activity.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Common chemicals and solvents of analytical grade were obtained from different commercial sources. Chemicals required for the assays including 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) a butylated hydroxyanisole (BHA), β -carotene, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and linoleic acid were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Sephadex G-25 was purchased from Pharmacia (Uppsala, Sweden). Water was obtained from a Culligan system; the resistivity was approximately 18 M Ω . All other chemicals and reagents used were of analytical grade.

2.2. Enzyme

The serine protease "Alcalase" from *B. licheniformis* (Novozymes®, Bagsvaerd, Denmark) was used for the production of hydrolysate. Protease activity was determined according to the method of Kumbhavi, Kulkarni, and Pant (1993) using casein as a substrate. One unit of protease activity was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 μ g of tyrosine per min under the experimental conditions used.

2.3. Preparation of protein concentrates (CP)

One hundred grams of chickpea flours were placed in a dark flask and homogenised using Ultra-Turrax T25 homogeniser set at 17.500 rpm (Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, Germany) with 300 ml of hexane. After mixing for 4 h in a shaker (Selecta, Barcelona, Spain) at a rate of 180 rpm/min, the mixture was centrifuged for 15 min at 3000 g at ambient temperature (20 °C). The extraction procedure was repeated twice and the pellet was used to produce protein extract. One hundred grams of defatted flour were mixed with water and adjusted to pH 9.0 with 1 M NaOH, to facilitate protein solubilisation. After centrifugation using a refrigerated centrifuge (Hettich Zentrifugen, ROTINA 380R, Tuttlingen, Germany), the supernatant was adjusted to pH 4.0 to precipitate the protein concentrate. To eliminate all soluble components, the pellet was washed with distilled water. The protein was resuspended in distilled water and adjusted to pH 7.0.

2.4. Preparation of chickpea protein hydrolysate (CPH)

Chickpea protein concentrate (500 g) was first 'resuspended' in 500 ml distilled water and then was cooked at 80 °C for 5 min to inactivate endogenous enzymes. The cooked protein sample was then homogenised at high speed for about 2 min using a Moulinex R62 homogeniser (Organotechnie, Courneuve, France). The sample was adjusted to pH 8.0 and 50 °C for optimal Alcalase activity.

The protein solutions were allowed to equilibrate for 30 min before hydrolysis was initiated. After the equilibrium was reached, the hydrolysis reaction was started by the addition of the enzyme at a 1:1 (U/mg) enzyme/protein ratio. The protein content of CP was determined by the Kjeldahl method. The reaction was conducted at 50 °C and pH 8.0 for 210 min. During the reaction, the pH of the mixture was maintained at the desired value by continuous addition of NaOH (4 M). After the required digestion time, the enzymatic hydrolysis was stopped by heating the solution for 20 min at 80 °C to inactivate enzyme. Protein hydrolysates were then centrifuged at 5000 g for 20 min to separate soluble and insoluble fractions. Finally, the soluble fractions, referred to as protein hydrolysates, were freeze-dried at -50 °C and 121 mbar (CHRIST, ALPHA 1-2 LD plus, Osterode am Harz, Germany).

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:

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

where B is the amount of NaOH consumed (ml) to keep the pH constant during the proteolysis of the substrate. Nb is the normality of the base, MP is the mass (g) of the protein (N × 6.25: 'N' content of the CPH was determined by the Kjeldahl method), and α represents the average degree of dissociation of the α -NH₂ groups in the protein substrate expressed as:

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

where pH and pK are the values at which the proteolysis was conducted. The total number of peptide bonds (h_{tot}) in the protein substrate was assumed to be 7.22 mmol/g (Kou et al., 2013).

2.6. Antioxidant activity

2.6.1. DPPH radical-scavenging capacity

The DPPH radical-scavenging capacity of samples was determined as described by Bersuder, Hole, and Smith (1998). A volume of 500 μ l of each sample at different concentrations was added to 375 μ l of 99% ethanol and 125 μ l of DPPH solution (0.02% in ethanol) as free radical source. The mixtures were shaken and then incubated for 60 min in a dark room at room temperature. Scavenging capacity was measured spectrophotometrically (UV mini 1240, UV/VIS spectrophotometer, SHIMDZU, Kyoto, Japan) 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 anti-radical compound. Lower absorbance of the reaction mixture indicated higher DPPH free radical-scavenging activity. BHA was used as positive control. DPPH radical-scavenging capacity was calculated as follows:

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

where A blank is the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the sample) and A sample is the absorbance of Bersuder (with the DPPH solution). The experiment was carried out in triplicate and the results are mean values.

2.6.2. Reducing power assay

The ability of samples to reduce iron (III) was determined according to the method of Yildirim, Mavi, and Kara (2001). An aliquot of 1 ml sample of each hydrolysate at different concentrations (1–5 mg/ml) was mixed with 2.5 ml of 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6) and 2.5 ml of 1% (w/v) potassium ferricyanide solution. The mixtures were incubated for 30 min at 50 °C. After incubation, 2.5 ml of 10% (w/v) TCA was added and the reaction mixtures were then centrifuged for 10 min at 10,285 g. Finally, 2.5 ml of the supernatant solution from each sample mixture were mixed with 2.5 ml of distilled water and

0.5 ml of 0.1% (w/v) ferric chloride. After a 10 min reaction time, the absorbance of the resulting solutions was measured spectrophotometrically (UV mini 1240, UV/VIS spectrophotometer, SHIMDZU) 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. Values presented are the mean of triplicate analyses. BHA was used as reference antioxidant.

2.6.3. Antioxidant assay using the β -carotene bleaching method

The ability of the chickpea concentrate and hydrolysate to prevent the bleaching of β -carotene was determined as described by Koleva, van Beek, Linssen, de Groot, and Evstatieva (2002). Briefly, 0.5 mg β -carotene in 1 ml chloroform was mixed with 200 μ l of Tween-40 and 25 μ l of linoleic acid. The chloroform was completely evaporated under vacuum (rotary evaporator, Heidolph, Schwabach, Germany) at 45 °C, then 100 ml of double distilled water was added and the resulting mixture was vigorously stirred. The emulsion obtained was freshly prepared before each experiment. An aliquot (2.5 ml) of the β -carotene–linoleic acid emulsion was transferred to tubes containing 0.5 ml of each sample at different concentrations. The tubes were placed in water bath and incubated at 50 °C for 2 h. Thereafter, the absorbance of each sample was measured at 470 nm. A blank consisted of 0.5 ml of distilled water instead of the sample solution. BHA was used as positive standard.

2.6.4. Metal chelating activity

The chelating activities of the sample towards ferrous ion (Fe^{2+}) were determined according to the methods of Decker and Welch (1990) with slight modifications. A volume of 0.1 ml of each sample at different concentrations was mixed with 0.1 ml of 2 mM $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and 0.2 ml of 5 mM 3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulphonic acid)-1,2,4-triazine (ferrozine). The blank was conducted in the same manner except that distilled water was used instead of the sample. EDTA was used as reference. The metal ion chelating activity exhibited by the sample was calculated by the following equation

$$\text{Chelating activity (\%)} = \left[1 - \frac{A_{562} \text{ of sample}}{A_{562} \text{ of blank}} \right]$$

2.7. Purification of antioxidant peptides

2.7.1. Fractionation of protein hydrolysate with Sephadex G-25 gel filtration

The lyophilised hydrolysate (1 g), with a final DH of 14.67%, obtained by treatment with Alcalase[®] for 210 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 (5 ml) were collected at a flow rate of 30 ml/h. Fractions (5 ml each) were collected and elution curves were obtained by measuring absorbance at 280 nm using an online spectrophotometer. Fractions that showed antioxidant activity were pooled and lyophilised (CHRIST, ALPHA 1–2 LD plus, Osterode am Harz, Germany).

2.7.2. Reversed-phase high pressure liquid chromatography
The most active fraction was dissolved in Milli Q water, filtered through 0.22 µm filters, and then separated by reverse-phase high-pressure liquid chromatography (RP-HPLC) on a Waters C18 column (4.6 mm × 250 mm) (XBridg™, Dublin, 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 antioxidant activities of the eluted peaks were determined. The liquid chromatographic system consisted of a Waters 600E automated gradient controller pump module, a Waters Wisp 717 automatic sampling device and a Waters 996 photodiode array detector. Spectral and chromatographic data were stored on a NEC Image 466 computer. Millennium software was used to plot, acquire and analyse chromatographic data.

2.8. Identification of antioxidant peptides

The molecular mass and peptide sequencing were conducted in a positive ion mode using electrospray ionisation-mass spectrometry (ESI-MS) and the tandem mass spectrometry (MS/MS), respectively. Concerning the ESI mass spectrometry, it was performed using a triple quadrupole instrument Applied Biosystems API 3000 (PE Sciex, Toronto, ON, 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. The interpretations of MS-MS spectra were performed 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, MA, USA) with a flow rate of 5 µl/min. The potential of ionisation was of 5000 V in a positive mode. At the time of the recording of the spectrum, 30 scans on average were added (MCA mode) for each spectrum. The used gases (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 optimisation of the machine. The peptide sequence was determined from the CID spectrum of the protonated analysis $[M + H]^+$ by MS/MS experiments. Peptide sequences were determined using the bioanalyst software (Applied Biosystems, South San Francisco, CA, USA).

2.9. Haemolytic activity

The haemolytic activity of the active peptide fractions was determined by method of [Dathe et al. \(1996\)](#). Five millilitres of bovine blood was centrifuged at 1260 g for 10 min to isolate erythrocytes, which were then washed three times with sodium phosphate (10 mM), containing NaCl 9 g/l, pH 7.5. The cell concentration stock suspension was adjusted to 10^9 cells/ml. The cell suspension (12 µl) along with varying amounts of

fractions stock solution and the buffer were placed into tubes to give a final volume of 50 µl. The tubes with 2.5×10^8 cells/ml were then incubated at 37 °C during 40 min. After centrifugation (2570 g, 5 min), 30 µl of supernatant was diluted in 500 µl water. The absorbance of the diluted solution was measured at 420 nm. The absorbance obtained after treating erythrocytes with only NaCl/Pi and SDS (0.2%) was taken as 0% and 100%, respectively.

2.10. Statistical analysis

Analytical values were carried out using three independent determinations. Results were expressed as mean values ± standard error of three independent determinations. Statistical analyses were determined using a statistical software program (SPSS for Windows version 11.0). The data were subjected to analysis of variance using the general linear model to determine significant differences between samples ($p < 0.05$).

3. Results and discussion

3.1. Production of CPH

Alcalase®, an inexpensive endopeptidase, has been used for the production of protein hydrolysates with better functional and nutritional characteristics than the original proteins and for the generation of bioactive peptides ([Yust et al., 2003](#)).

The hydrolysis curve of defatted chickpea proteins after 220 min of incubation is shown in [Fig. 1](#). Hydrolysis of chickpea proteins extract with Alcalase® was characterised by a high rate of hydrolysis during the initial 30 min. The rate of enzymatic hydrolysis was subsequently decreased, and then the enzymatic reaction reached a plateau when no apparent hydrolysis took place. After 220 min of hydrolysis, the DH value was 14.67%. The shape of hydrolysis curves is similar to those previously published for hydrolysates from buckwheat ([He Tang, Peng, Zhen, & Chen, 2009](#)), wheat germ ([Zhu, Zhou, & Qian, 2006](#)) and pumpkin oil cake ([Vaštag, Popović, Popović, Krimer, & Peričin, 2011](#)).

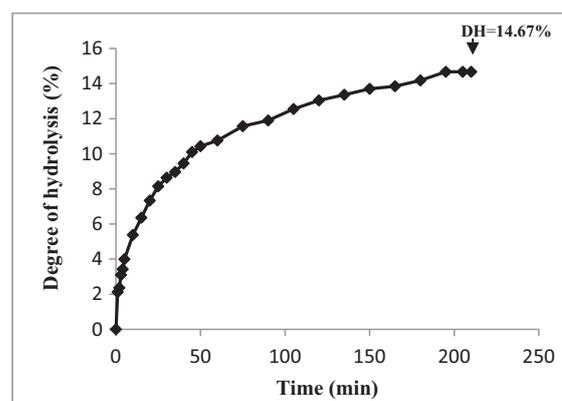


Fig. 1 – Hydrolysis curve of chickpea protein extract treated with Alcalase® from *B. licheniformis*. Hydrolysis was conducted at the following conditions: enzyme (U)/protein (mg) ratio of 1:1, pH 8.0 and at 50 °C.

Table 1 – Chemical composition of chickpea flours, protein extract and protein hydrolysates obtained by treatment with Alcalase®.

	Flour of chickpea	Protein extract	Hydrolysate
Dry matter (%)	92.96 ± 0.15 ^a	93.75 ± 0.1 ^b	95.13 ± 0.14 ^c
Protein (%)	24.51 ± 0.27 ^a	78.53 ± 0.7 ^b	83.75 ± 0.86 ^c
Crude fat (%)	8.20 ± 0.87 ^a	4.5 ± 0.5 ^b	1.14 ± 0.05 ^c
Carbohydrates (%)	57.11 ± 0.92 ^a	6.19 ± 0.1 ^b	4.1 ± 0.13 ^b
Ash (%)	3.14 ± 0.07 ^a	4.53 ± 0.23 ^b	6.14 ± 0.16 ^b

All the data are expressed as mean ± SD and are the mean of three replicates.

Means with the different superscript letters within the same line are significantly different ($p < 0.05$).

3.2. Chemical composition

Table 1 shows the chemical composition of protein isolate compared with the composition of the original chickpea flour and protein hydrolysates obtained by treatment with Alcalase®. Flour of chickpea contains 24% of protein. From this flour, about 70% of total proteins were extracted at pH 9, at a solid-to-water ratio of 1:10 (w/v). The protein content data of CP are lower than that reported by Torres-Fuentes et al. (2011) but higher than that by Arcan and Yemencioğlu (2007). Hydrolysates contained higher protein content than chickpea protein extract but lower moisture and lipid contents that might significantly contribute to their stability during storage. Ash content was higher in the hydrolysates due to the addition of NaOH to keep the pH constant during hydrolysis. These results are similar to those of other published studies on fish protein hydrolysates (Bougatef et al., 2010; Hmidet et al., 2011).

3.3. Antioxidant activity of chickpea protein hydrolysate

Due to the diversity of antioxidant action of protein hydrolysates and oxidation processes, many methods were used to evaluate antioxidant activity and provide a clear idea about their real antioxidant potential. Therefore, four chemical in vitro assays based on different antioxidant mechanisms were used in this study to evaluate the antioxidant activity of the chickpea protein extract and chickpea protein hydrolysates obtained by treatment with Alcalase®.

3.3.1. DPPH free radical-scavenging activity

The DPPH radicals, which are stable in ethanol, show maximum absorbance at 517 nm and have widely been used in the evaluation of antioxidant capacity. The resulting hydrolysate was freeze-dried and assayed for antioxidant activity using DPPH radical-scavenging activity. The radical scavenging activities of the CP and CPH, tested at different concentrations, are shown in Fig. 2A.

The results (Fig. 2A) clearly indicated that hydrolysate obtained by treatment with Alcalase® exhibited a strong DPPH free radical-scavenging activity. In the range of concentration tested, DPPH radical scavenging activity of chickpea protein was lower than protein hydrolysates. This result shows that proteins have the ability to act as an antioxidative compound but because of their large size, they cannot cross cellular

membranes. Therefore, hydrolysis is required to generate smaller peptides that possess biological activity. The antioxidant activity of chickpea protein hydrolysate increased with increasing CPH concentration. This activity was lower than that of BHA at all concentrations tested but higher than that of protein isolate of chickpea. Our findings are in line with previous works reported by He Tang et al. (2009) who reported that the DPPH-scavenging activity increased with increasing buckwheat protein hydrolysates concentrations.

3.3.2. Reducing power

Reducing power is used to evaluate the capacity of antioxidant to donate an electron to free radical and to convert them into more stable compounds. In this assay, the ability of CP and CPH to reduce the Fe³⁺/ferric cyanide complex to the ferrous form was determined. Therefore, the Fe²⁺ complex can be monitored by measuring the formation of Perl's Prussian blue at 700 nm.

Fig. 2B shows the reducing power activities (as indicated by the absorbance at 700 nm) of the CP and CPH compared with BHA as standard. The highest reducing power was found in BHA, followed by CPH and CP, respectively. Chickpea protein hydrolysate possessed reducing power with concentration-dependent effects. Compared with wheat germ protein hydrolysate, the reducing power of the chickpea protein hydrolysate was much higher (Zhu et al., 2006). Chickpea hydrolysate may exhibit donating capacity by neutralising and converting free radicals to more stable products and, thereby, may terminate the chain reactions initiated by free radicals (Ardestani & Yazdanparast, 2007).

The reducing power increased with increasing the concentrations. A similar observation has been reported on wheat germ protein hydrolysate (Zhu et al., 2006) and on chickpea protein (Li, Jiang, Zhang, Mu, & Liu, 2008).

3.3.3. β -carotene bleaching inhibition activity

Lipid oxidation products react with proteins causing their oxidation. Carbohydrates are also susceptible to oxidation, but they are less sensitive than lipids and proteins (Zhuang, Tang, & Yuan, 2013). In this study, lipid peroxidation inhibition activity of CP and CPH was determined by assessing their ability to inhibit oxidation of linoleic acid in an emulsified model system.

The antioxidative activities of CP and CPH measured by the β -carotene bleaching assay are represented in Fig. 2C. All hydrolysates inhibited the oxidation of β -carotene at different degrees. CPH showed significantly ($p < 0.05$) higher antioxidant activities (66.92%) than CP, and BHA displayed a better antioxidant activity than all hydrolysates at the same concentration. The antioxidant activity index of peptides or proteins in the free radical-mediated lipid peroxidation system is influenced by molecular size, chemical properties and electron transferring ability of amino acid residues in the sequence (Qian, Jung, & Kim, 2008).

3.3.4. Chelating activity

EDTA, a known metal ion chelator, was therefore used as reference to compare with it the chelating effect of CP and CPH. The ferrous ion-chelating effects of CP, CPH and EDTA are shown in Fig. 2D. The CPH displayed between 21.15% and 50.45%

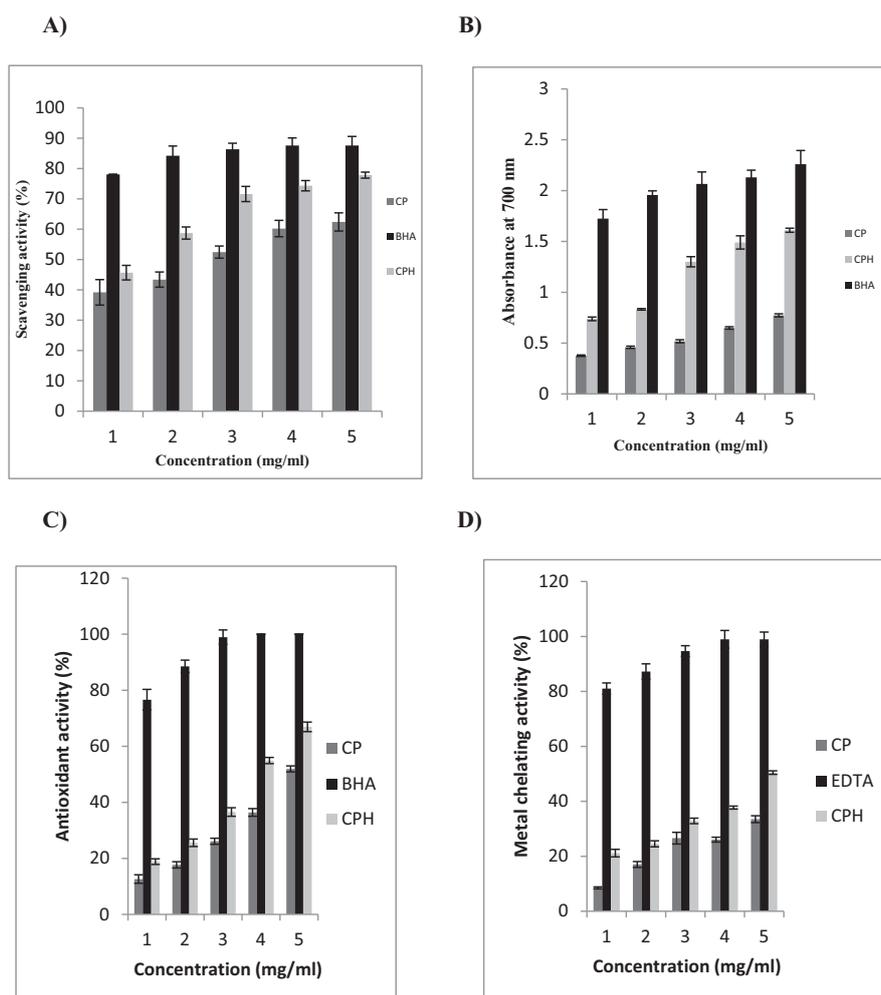


Fig. 2 – Antioxidant activities of CP and CPH at different concentrations. (A) DPPH scavenging activities. (B) Reducing power. (C) β -carotene bleaching inhibition. (D) Metal chelating activities. BHA and EDTA were used as positive controls (2 mM). All values are means \pm standard deviation (\pm SD) of three determinations.

chelating effects on ferrous ion. Further, results reported in Fig. 2D show that metal chelating activity increased with increasing concentrations of hydrolysates and chickpea protein. However, the chelating ability was slightly lower than that of EDTA. For example at 5 mg/ml, the metal chelating activities of protein hydrolysate and EDTA were 50.45% and 98.96%, respectively. Although the chemical EDTA exhibited the highest ($p < 0.05$) metal chelating ability, natural antioxidants are of growing interest. Indeed, the incorporation of protein hydrolysate to foods could confer desirable nutritional and functional properties (Kim, Je, & Kim, 2007).

3.4. Fractionation with Sephadex G-25 gel filtration

During hydrolysis, a wide variety of smaller peptides and free amino acids are generated. Changes in size, level and composition of free amino acids and small peptides affect antioxidant activity (Kou et al., 2013).

The chickpea protein hydrolysate, obtained with a DH of 14.67%, was fractionated on a Sephadex G-25 gel filtration chromatography. As reported in Fig. 3, there are four major absorbance peaks (Fra._I, Fra._{II}, Fra._{III} and Fra._{IV}) at 280 nm. Fractions

associated with each peak were collected, concentrated by lyophilisation and then evaluated for antioxidant activity. All fractions (1 mg/ml) displayed antioxidant activities. Fraction Fra._{III} possessed the highest radical-scavenging activity (54%) among all fractions. At the same concentration of 1 mg/ml, Fra._I, Fra._{II} and Fra._{IV} exhibited 1.21, 33.38 and 5.78% hydroxyl radical-scavenging activity, respectively. Because the direct correlation between antioxidant activity and reducing power of certain bioactive compounds, the reducing power test was investigated to evaluate the antioxidant activity of Fra._{II} and Fra._{III}. At a concentration of 1 mg/ml, the absorbance at 700 nm was 0.857 for Fra._{III} followed by Fra._{II} ($A_{700} = 0.621$).

3.5. Purification of the antioxidant peptides by HPLC

Fraction Fra._{III}, which exhibited the highest antioxidant activity, was further separated by RP-HPLC on a Waters C18 column and fractionated into 11 major sub-fractions (P₁–P₁₁). The elution profile of the peptides is shown in Fig. 4A. Fractions were collected separately through repeated chromatography using reversed-phase HPLC column and concentrated in vacuum prior

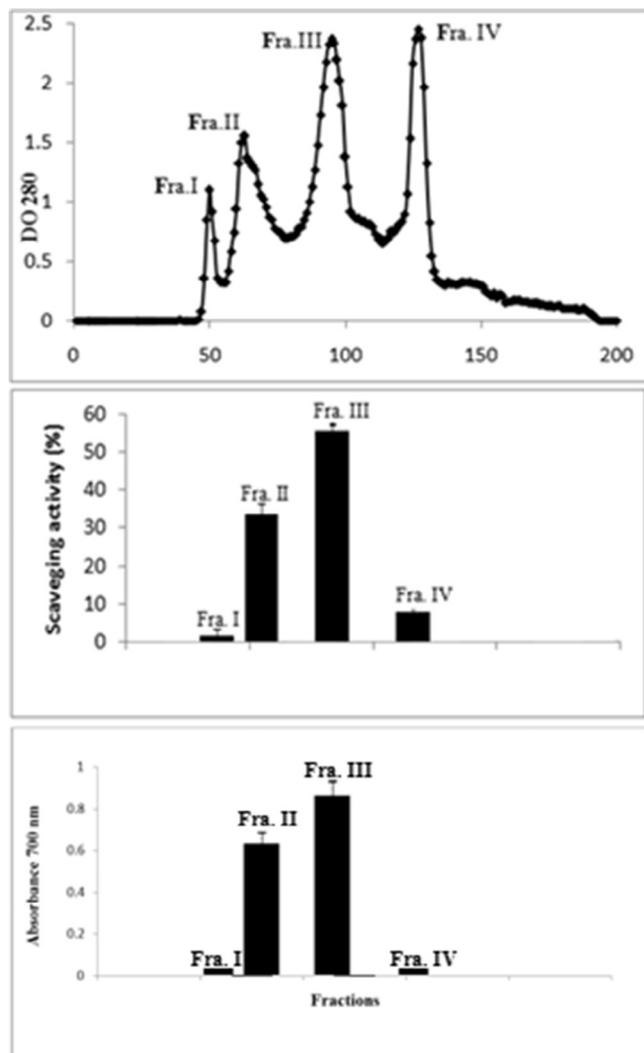


Fig. 3 – Elution profile of chickpea protein hydrolysates separated by size exclusion chromatography on Sephadex G-25 (upper panel) and the DPPH radical-scavenging activities and reducing power of the separated fractions (lower panel). The column (5.2 × 56 cm) was equilibrated and eluted with distilled water at a flow rate of 30 ml/h. Values presented are the mean of triplicate analyses.

to testing the antioxidant activities. As reported in Table 2, only two peptide sub-fractions showed antioxidant activity and were designated P₃ and P₈. At 200 µg/ml, The P₈ had the highest DPPH radical-scavenging (67.32%). The other sub-fraction also showed

Table 2 – Amino acid composition and antioxidant activity of HPLC fractions P₃ and P₈, at 200 µg/ml. The antioxidant activity was measured by DPPH radical-scavenging effect.

HPLC fractions	Amino acid composition	Molecular weight (Da)	DPPH scavenging (%)
P ₃	Asp-His-Gly	327,33	51.66
P ₈	Val-Gly-Asp-Ile	402,49	67.32

good DPPH radical-scavenging activities (51.66%). These sub-fractions were further analysed for peptide identification.

3.6. Mass spectrometry analysis

Antioxidative properties are related to composition, structure, hydrophobicity and amino acid sequence of the peptide.

Peptides in sub-fractions P₃ and P₈ were analysed by ESI-MS for molecular mass determination and ESI-MS/MS for the characterisation of peptides. Mass spectrum and ESI/MS/MS analysis of the purified antioxidant peptides from sub-fractions P₃ and P₈ were presented in Fig. 4B.

Two purified peptides were identified in sub-fractions P₃ (Asp-His-Gly) and P₈ (Val-Gly-Asp-Ile) (Table 2). Bioactive peptides usually contain 2–20 amino acid residues that could cross the intestinal barrier and exert biological effects (Shahidi & Zhong, 2008). Val-Gly-Asp-Ile displayed the highest DPPH radical-scavenging activity (67.32% at 200 µg/ml). In addition, sub-fraction P₈ contains two hydrophobic peptides with Val at the N-terminal in the sequence. Hydrophobic peptides have the ability to enhance the solubility of peptide in lipid which facilitates the accessibility to hydrophobic radical species. Moreover, presence of valine at the N-terminal of peptide sequence has been reported to be antioxidative in an oil system (Chen, Muramoto, & Yamauchi, 1995). P₃ contained histidine residue within the sequence. Antioxidative activity of histidine-containing peptides has been reported (Murase, Nagao, & Terao, 1993; Park, Jung, Nam, Shahidi, & Kim, 2001; Uchida & Kawakishi, 1992). This activity may be attributed to the ability of this amino acid to convert radicals to stable molecules by donating electron via resonance structure (Rajapakse, Mendis, Jung, Je, & Kim, 2005). Both P₃ and P₈ contained aspartic acid. This acidic amino acid play an important role in the antioxidant activity by carboxyl groups in their side chains (Suetsuna, Ukeda, & Ochi, 2000). Previous research have also purified and identified the short-chain antioxidant peptides, e.g. peptides from Zizyphus jujuba protein hydrolysates (678.36 and 482.27 Da) (Memarpoor-Yazdi, Mahaki, & Zare-Zardini, 2013), corn gluten hydrolysates (375.46, 488.64 and 522.64 Da) (Zhuang et al., 2013) and sweet potato protein hydrolysates (640–930 Da) (Zhang et al., 2014). A peptide from chickpea protein hydrolysates with molecular weight of 717.37 Da and its amino acid sequence was identified as Asn-Arg-Tyr-His-Glu by Zhang, Li et al. (2011). These differences could be related to the origin of the used enzyme and hydrolysis conditions.

3.7. Haemolytic activity of antioxidant peptides

The haemolytic activity of all fractions was tested on bovine erythrocytes. Several concentrations for each peptide were tested. For all peptides, no haemolysis was observed. These results show that these peptides would be non-toxic even if used at high concentrations.

4. Conclusion

In this study, we purified and characterised, for the first time, two antioxidant peptides from chickpea protein isolates

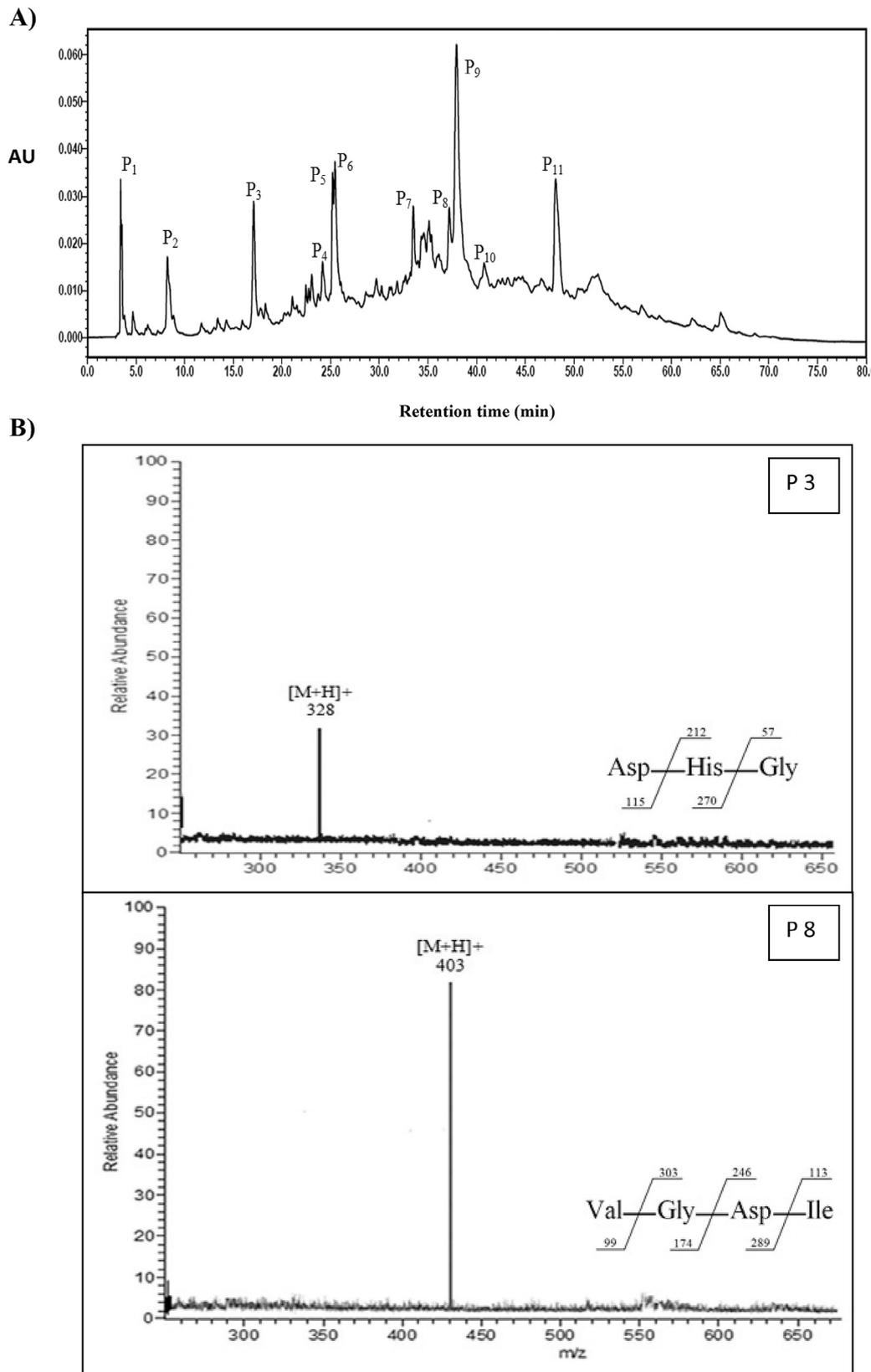


Fig. 4 – HPLC and MS spectrums: (A) Reversed-phase HPLC pattern on a Vydac C18 column of the Fraction.III obtained from Sephadex G-25 gel filtration. Flow rate, 1 ml/min; monitoring absorbance, 215 nm. (B) Mass spectrum and ESI/MS/MS analysis of the purified antioxidant peptides from sub-fractions P₃ and P₈.

hydrolysed by Alcalase®. The results of the present work indicate that Fra_{III} possessed high free radical scavenging activity and was fractionated into 11 major sub-fractions by HPLC. The molecular masses and amino acids sequences of the purified peptides were identified using ESI-MS and ESI-MS/MS, as Asp-His-Gly (327 Da) and Val-Gly-Asp-Ile (402 Da). The two purified peptides are new potent free radical scavengers that can be used as natural antioxidants in preventing the oxidation of related food. These results suggest that the peptide may be a promising antioxidant as functional food ingredients. However, further studies are required to investigate the *in vivo* antioxidant activities.

REFERENCES

- Adler-Nissen, J. (1986). A review of food hydrolysis specific areas. In *Enzymic hydrolysis of food proteins* (p. 57–109). Copenhagen: Elsevier Applied Science Publishers.
- Arcan, I., & Yemenicioğlu, A. (2007). Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans. *Food Chemistry*, 103, 301–312.
- Ardestani, A., & Yazdanparast, R. (2007). Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chemistry*, 104, 21–29.
- Bersuder, P., Hole, M., & Smith, G. (1998). Antioxidants from a heated histidine glucose model system. I: Investigation of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by high performance liquid chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 181–187.
- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., & Nasri, M. (2010). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chemistry*, 118, 559–565.
- Chen, H. M., Muramoto, K., & Yamauchi, F. (1995). Structural analysis of antioxidative peptides from soybean-Conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 574–578.
- Cumby, N., Zhong, Y., Naczek, M., & Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 109, 144–148.
- 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.
- Decker, E. A., & Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 674–677.
- Friedman, M. (1996). Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 6–29.
- Halliwell, B. (2002). Effect of diet on cancer development: Is oxidative DNA damage a biomarker. *Free Radical Biology & Medicine*, 32, 968–974.
- He Tang, C., Peng, J., Zhen, D. W., & Chen, Z. (2009). Physicochemical and antioxidant properties of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 115, 672–678.
- Hmidet, N., Balti, R., Nasri, R., Sila, A., Bougatef, A., & Nasri, M. (2011). Improvement of functional properties and antioxidant activities of cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle proteins hydrolyzed by *Bacillus mojavensis* A21 proteases. *Food Research International*, 44, 2703–2711.
- 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.
- 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.
- Koleva, I. I., van Beek, T. A., Linssen, J. P. H., de Groot, A., & Evtatieva, L. N. (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*, 13, 8–17.
- Kou, X., Gao, J., Xue, Z., Zhang, Z., Wang, H., & Wang, X. (2013). Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates. *LWT – Food Science and Technology*, 50, 591–598.
- Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., & Liu, J. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chemistry*, 106, 444–450.
- Memarpour-Yazdi, M., Mahaki, H., & Zare-Zardini, H. (2013). Antioxidant activity of protein hydrolysates and purified peptides from *Zizyphus jujuba* fruits. *Journal of Functional Foods*, 5, 62–70.
- Moure, A., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2006). Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. *Process Biochemistry*, 41, 447–456.
- Murase, H., Nagao, A., & Terao, J. (1993). Antioxidant and emulsifying activity of N-(long-chain-acyl) histidine and N-(long-chain-acyl) carnosine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1601–1604.
- Park, P. J., Jung, W. K., Nam, K. S., Shahidi, F., & Kim, S. K. (2001). Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, 651–656.
- Parrado, J., Miramontes, E., Jover, M., Gutierrez, J. F., de Teran, L. C., & Bautista, J. (2006). Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. *Food Chemistry*, 4, 742–748.
- Qian, Z. J., Jung, W. K., & Kim, S. K. (2008). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Bioresource Technology*, 99, 1690–1698.
- Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W. K., Je, J. Y., & Kim, S. K. (2005). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*, 38, 175–182.
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31, 1949–1956.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2008). Bioactive peptides. *Journal of AOAC International*, 91, 914–931.
- Stadtman, E. R. (2006). Protein oxidation and aging. *Free Radical Research*, 40, 1250–1258.
- Suetsuna, K., Ukeda, H., & Ochi, H. (2000). Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11, 128–131.
- Torres-Fuentes, C., Alaiz, M., & Vioque, J. (2011). Affinity purification and characterization of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 129, 485–490.
- Uchida, K., & Kawakishi, S. (1992). Sequence-dependant reactivity of histidine containing peptides with copper(II)/ascorbate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 13–16.

- Vaštag, Ž., Popović, L., Popović, S., Krimer, V., & Peričin, D. (2011). Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. *Food Chemistry*, 124, 1316–1321.
- Yildirim, A., Mavi, A., & Kara, A. A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4083–4089.
- Yust, M. M., Pedroche, J., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., & Vioque, J. (2003). Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. *Food Chemistry*, 81, 363–369.
- Zhang, M., Mu, T. H., & Sun, M. J. (2014). Purification and identification of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase. *Journal of Functional Foods*, 7, 191–200.
- Zhang, T., Li, Y. H., Miao, M., & Jiang, B. (2011). Purification and characterisation of a new antioxidant peptide from chickpea (*Cicer arietium* L.) protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 128, 28–33.
- Zhang, Y. P., Sun, G., Yang, M. L., Wu, H. H., Zhang, J. Z., Song, S. I., Ma, E. B., & Guo, Y. P. (2011). Chronic accumulation of cadmium and its effects on antioxidant enzymes and malondialdehyde in *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acridoidea). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 1355–1362.
- Zhu, K., Zhou, H., & Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, 41, 1296–1302.
- Zhuang, H., Tang, N., & Yuan, Y. (2013). Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal. *Journal of Functional Foods*, 5, 1810–1821.



Production of an antimicrobial peptide derived from slaughterhouse by-product and its potential application on meat as preservative



Rémi Przybylski*, Loubna Firdaous, Gabrielle Châtaigné, Pascal Dhulster, Naïma Nedjar

Univ. Lille, EA 7394 – ICV – Charles Viollette Institute, F-59000 Lille, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 October 2015

Received in revised form 4 April 2016

Accepted 12 May 2016

Available online 13 May 2016

Keywords:

Antimicrobial peptides

Bovine hemoglobin

Cruor

Hydrolysis

Preservative

ABSTRACT

Bovine cruor, a slaughterhouse by-product, contains mainly hemoglobin, broadly described as a rich source of antimicrobial peptides. In the current context of food safety, bioactive peptides could be of interest as preservatives in the distribution of food products. The aim of this work was to study the α 137–141 fragment of hemoglobin (Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg), a small (653 Da) and hydrophilic antimicrobial peptide. Its production was fast, with more 65% finally produced at 24 h already produced after 30 min of hydrolysis with pepsin. Moreover, increasing substrate concentration (from 1 to 8% (w/v)) resulted in a proportional augmentation of α 137–141 production (to $807.95 \pm 41.03 \text{ mg L}^{-1}$). The α 137–141 application on meat as preservative (0.5%, w/w) reduced the lipid oxidation about 60% to delay meat rancidity. The α 137–141 peptide also inhibited the microbial growths under refrigeration during 14 days. These antimicrobial effects were close to those of the butylated hydroxytoluene (BHT).

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Recently, the pharmaceutical and food industries have taken interest in peptides derived from proteins (Bah, Bekhit, Carne, & McConnell, 2013; Castro & Sato, 2015; Clare & Swaisgood, 2000; Danquah & Agyei, 2012; Hartmann & Meisel, 2007). In the current context of food safety, the antimicrobial peptides derived from industrial wastes could be used as preservatives for the storage and distribution of food products (Agyei & Danquah, 2011; Lafarga & Hayes, 2014). The main benefit is to add a value to proteins from wastes (Bah et al., 2013; Goot et al., 2016; Lafarga & Hayes, 2014). Then, antimicrobial peptides represent a promising alternative to synthetic preservatives. Moreover, some of them, like butylated hydroxyanisole (BHA) or butylated hydroxytoluene (BHT), are suspected to induce pathological and toxic effects (Bauer, Dwyer-Nield, Hankin, Murphy, & Malkinson, 2001; Imaida et al., 1983; Lanigan & Yamarik, 2002). However, these synthetic additives are widely used to protect food, reducing lipid oxidation and microbial growths during food storage. These two

last factors are typically involved in the reduction of meat shelf-life and rancidity (Chaâbane et al., 2014; Kim, Cho, & Han, 2013; Weiss, Gibis, Schuh, & Salminen, 2010). Therefore, the peptides derived from food proteins could be natural potential candidates for the substitution of the synthetic compounds (Sakanaka, Tachibana, Ishihara, & Juneja, 2005; Sun, Luo, Shen, Li, & Yao, 2012; Wang, Huang, Chen, Huang, & Zhou, 2015).

In this context, bovine blood is a slaughterhouse waste and its valorization could be interesting by producing antimicrobial peptides (Bah et al., 2013; Lafarga & Hayes, 2014). Raw bovine blood is essentially divided into two by-products after centrifugation: plasma, the colorless part, and cruor, the red fraction. The plasma valorization is effective due to its high protein content, like thrombin, fibrinogen, immunoglobulin G or bovine serum-albumin (Bah et al., 2013). About cruor, it is the fraction which gives blood its red color, representing 45% of the whole blood, and it contains mainly hemoglobin, a globular tetramer (64,500 Da) composed of four protoporphyrin groups, each including an iron atom in their center. This protein is broadly described as a rich source of bioactive peptides after enzymatic hydrolysis (Adje et al., 2011; Gomes et al., 2010; Nedjar-Arroume et al., 2008). The most described activity is antimicrobial (Choisnard et al., 2002; Daoud et al., 2005; Froidevaux et al., 2001). Nevertheless, the peptide production is often poorly mastered or controlled and represents a limiting factor for bioactive peptides generation at large scale or high concentrations.

Our study is focused on the α 137–141 fragment (Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg), a small (653 Da) and hydrophilic peptide with two

Abbreviations: $A_{\alpha 137-141}$, α 137–141 area peak; BH, bovine hemoglobin; BHT, butylated hydroxytoluene; $C_{\alpha 137-141}$, α 137–141 concentration; C_{BH} , bovine hemoglobin concentration; CFU, colony-forming unit; DH, degree of hydrolysis; MA, match angle; MT, match threshold; PA, purity angle; PT, purity threshold; RP-HPLC, reversed-phase high performance liquid chromatography; TBARS, thiobarbituric acid-reactive substances.

* Corresponding author.

E-mail address: remi.przybylski@live.fr (R. Przybylski).

positive charges at pH 7 (Catiau et al., 2011), which has a large antibacterial spectrum, especially against pathogenic bacteria commonly responsible for food alteration, such as *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* or *Staphylococcus aureus* (Borch & Arinder, 2002; Catiau et al., 2011). However, many studies have shown the enzymatic mechanism involved in the peptide generation for the purified bovine hemoglobin. Hence, the α 137–141 production is not investigated into the cruor, the by-product slaughterhouse. Moreover, for its potential valorization, it is important to control the process at high initial substrate concentrations. Additionally, it is necessary to quantify the α 137–141 generation during the course of hydrolysis.

Hence, the first aim of this work was to study the α 137–141 production during the bovine cruor hydrolysis to understand the involved mechanisms. Its production quantification was investigated for several substrate concentrations (from 1 to 8%, w/v). Therefore, the α 137–141 application as food preservative was studied and the α 137–141 antimicrobial effects were identified on meat during food storage.

2. Materials and methods

2.1. Reagents, solvents and standards used

All chemicals and solvents were of analytical grade from commercial suppliers: Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) or Flandres Chimie (Villeneuve d'Ascq, France). The ultrapure water was prepared using a Milli-Q system. Bovine cruor was supplied by Vapran SA (Plemet, France). The standard α 137–141 was provided by Genecust (Luxembourg). The beef meat was obtained from a local purveyor.

2.2. Hydrolysate preparation

2.2.1. Stock solution preparation

A stock solution was prepared by adding 15 g of purified bovine hemoglobin (BH) or bovine cruor into 100 mL of ultrapure water. After centrifugation at 4000 min⁻¹ for 30 min, the supernatant was recovered and the real BH concentration (C_{BH}) was dosed with the Drabkin's method established by Crosby, Munn, and Furth (1954). After that, the stock solution of purified bovine hemoglobin or bovine cruor was diluted to obtain a solution with a given C_{BH} : 1, 2, 5 and 8% (w/v).

2.2.2. Hydrolysis process

In the stock solution, the BH was native. To denature the hemoglobin without the addition of a chemical denaturant, the hydrolysis took place in sodium acetate and acetic acid buffer (0.5 M) at pH 3.5 (Dubois, Nedjar-Arroume, & Guillochon, 2005). The BH was digested by pepsin from porcine gastric mucosa (EC 3.4.23.1, 3200–4500 units mg⁻¹ protein) which was prepared in acetic acid and sodium acetate buffer (0.1 M; pH 3.5) at 23 °C, with the ratio enzyme/substrate = 1/11 (mole/mole). Sampling was performed during the hydrolysis at 0, 1, 2.5, 5, 10, 15, 30 min and 1, 2, 3, 10 and 24 h, corresponding to different degrees of hydrolysis. The peptic hydrolysis was stopped by addition of sodium hydroxide 5 M up to a final pH of 10 which denatured the enzyme. The samples were placed at -20 °C to avoid basic hydrolysis. They have been carried out in triplicate.

2.3. Determination of the degrees of hemoglobin hydrolysis

The degree of hydrolysis (DH) is defined as the ratio of the number of peptide bonds cleaved to the total number of peptide bonds of BH (i.e. 568) and is expressed in percentage. The cleavage of pep-

tide bonds was adapted from the *ortho*-phthaldialdehyde (OPA) method by Church, Swaisgood, Porter, and Catignani (1983).

2.4. RP-HPLC analyses

2.4.1. Materials, software and elution program used

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 an NEC image 466 computer. Millennium software was used to plot, acquire and analyze chromatographic data. All the chromatographic processes were performed with a Vydac C₄ column (250 mm × 4.6 mm, internal diameter of 3 mm). The mobile phases were ultrapure water/trifluoroacetic acid (1000:1, v/v) as eluent A, and acetonitrile/ultrapure water/trifluoroacetic acid (600:400:1, v/v/v) as eluent B. Samples were filtered through 0.20 μm filters and then injected. Online UV absorbance scans were performed between 200 and 390 nm at a rate of one spectrum per second with a resolution of 1.2 nm. Chromatographic analyses were completed with Millennium software (Choisnard et al., 2002; Zhao, Piot, Gautier, & Cottenceau, 1996). The injection volume was 10 μL. The flow rate was 0.6 mL min⁻¹. The gradient applied was 100% (v/v) A over 5 min, 0–67% (v/v) B over 30 min, then 67–87% (v/v) B over 35 min.

2.4.2. Spectral comparison and assessment of peak purity by peptide spectral library

Rapid identifications of expected peptides from the very complicated hemoglobin peptic hydrolysates were carried out by UV-spectral comparison as described previously for the haemorphins (Choisnard et al., 2002; Zhao, Sannier, Ricart, & Piot, 1995). The spectrum of the standard peptide was taken as a norm in the Millennium library. Two types of mathematical analyses were established: an assessment of peak purity and a comparison between the spectrum of sample peak and the standard spectrum. Mathematical analyses were quantitatively expressed using the following criteria.

For the differences between any two spectra, two criteria were expressed. (I.i) The Match Angle (MA) is a measurement of the difference in spectral shapes between an unknown spectrum and a library spectrum. The MA can range from 0 to 90 degrees. Lower values indicate that spectra are similar. Larger values indicate greater degrees of spectral difference. (I.ii) The Match Threshold (MT) indicates the sensitivity of the measurement. It can range from 0 to 180 degrees. Larger values indicate lower measurement sensitivity. In general, if the MA is higher than the MT, it indicates that the two spectra are different. If the MA is lower than the MT, it indicates that the two spectra are the same or similar (Zhao et al., 1995). Therefore, identical spectra allow us to identify expected peptides.

Nevertheless, a second measurement was applied. Two criteria were expressed to assess the peak purity from chromatographic profiles. (II.i) The Purity Angle (PA) represents the relative spectral homogeneity across the peak for each purity pass. This value can range from 0 to 90 degrees with 0 indicating a perfect spectral homogeneity. The Purity Threshold (PT) includes noise, high sample concentration, photometric error and/or solvent and may cause a largest PA which is calculated for each purity pass. If the PA is lower than the PT, spectra are homogeneous within the noise of measurements, but that cannot be used to prove chemical purity.

For each measurement, the lower values of each parameter were researched, respecting the MA lower than the MT and the PA lower than the PT. With that, the α 137–141 measurement was the most realistic and avoided the inclusion of other compounds in the assessment of α 137–141 quantity from samples.

2.4.3. Qualification and quantification of α 137–141 in the hydrolysates

A standard curve was established by injections of α 137–141 standard at concentrations ranging between 0 and 1 mg mL⁻¹. The areas under the peak were taken from a chromatographic profile at 215 nm and established a linear relation between the α 137–141 concentration in the sample and the area surface from each chromatographic profile for any hydrolysate by using the following equation ($R^2 = 0.999$): $C_{\alpha 137-141} = 4419.6 A_{\alpha 137-141}$, where $C_{\alpha 137-141}$ being the α 137–141 concentration (mg L⁻¹) and $A_{\alpha 137-141}$ being the area peak (μ V s).

In addition, the standard injection indicated the α 137–141 retention time. It allowed the peptide identification in chromatographic profile hydrolysates.

2.5. Mass spectrometry analyses

Data were acquired using UltraFlex II MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a Smartbeam™ laser. Direct profiling data were performed in positive reflectron mode, for a mass range from m/z 500–6000 Da or from m/z 3000–20,000. A total of 1000 spectra were acquired at each spot at a laser frequency of 100 Hz.

FlexImaging™ 2.1 software was used to record the data. Standards for spectral calibration consisted in a mix solution of peptides ranging between m/z 500–3500.

Two matrices were used (UV absorber): the first consisted of a solution of 10 mg mL⁻¹ cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) in a mixture of water and acetonitrile (30/70, v/v) with 0.1% TFA, and the second corresponded to sinapinic acid (SA) solution 10 mg mL⁻¹ prepared in a mixture 25/75 (v/v) of water and acetonitrile with 0.1% TFA.

Deposit of the sample on the target can be achieved by the method of the thin layer: 1 μ L of matrix and 1 μ L of each HPLC fraction were deposited. The samples were dried before being analyzed. 1000 laser shots at each target have generally been accumulated to produce the final mass spectrum. Processing software of the spectra has allowed to detect each peak and has determined the corresponding masses in positive mode. The accuracy in the mass is 0.01%.

2.6. Application of samples on ground beef

2.6.1. Meat sample preparation and experiment monitoring

To ensure the good reproducibility of preservation by the peptide, the experiment was repeated at least in triplicate with different meat samples purchased on different dates. The beef patties were composed with commercial beef containing 0.28% (w/w) of salt, 14% (w/w) of fat and about 18% of proteins. The meat sample preparation was realized under strong aseptic conditions to avoid contaminations. Three conditions of storage were studied: (1) the control being the meat without additive; (2) the meat with different BHT concentrations (0.1 and 0.5% (w/w)); and (3) the meat with different α 137–141 concentrations (0.1 and 0.5 (w/w)). The preservative powder was added into the meat and the all was mixed by blending. After that, the patties were wrapped with polyethylene film and kept at 4 °C for fourteen days.

2.6.2. Lipid oxidation evaluation

The lipid oxidation was quantified by the measurement of the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) as described by Witte, Krause, and Baily (1970). Five grams of minced meat were added to 12.5 mL of solution containing trichloroacetic acid (20% w/v) and phosphoric acid (2 M). After that, all the solution was transferred to 25 mL of ultrapure water and filtered. 5 mL of this filtrate was added to 5 mL of 2-thiobarbituric acid (0.005 M). The results were read at the absorbance of 520 nm after 17 h at room

temperature and were expressed as malondialdehyde equivalents per meat kilogram (mg MDA/kg meat).

2.6.3. Microbiological analyses

The microbial counts were carried out at days 0, 2, 4, 7, 9, 11 and 14 of storage at 4 °C. Five grams of beef patty were added to 45 mL of sterilized peptone water (0.1% w/v) in a sterile stomacher bag. The homogenization took place at 300 rpm for 2 min. Aliquots in peptone water (0.1% w/v) were prepared at decimal dilutions (10^{-1} – 10^{-5}) and 100 μ L of the appropriate dilutions were spread out on different selective media. Plate count agar (PCA) for total viable counts, potato dextrose agar (PDA) for yeasts and molds counts, Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar for lactic acid bacteria and violet red bile lactose (VRBL) agar for coliform counts were used. All agar plates were incubated at 37 °C for 24 h and the results of microbial counts were expressed as the log₁₀ of colony-forming units per gram of patty (log₁₀ CFU/g).

2.6.4. Statistical analysis

Mean values for various parameters were calculated and compared by analysis of variance by XLSTAT Pro Software 2015 1.01 (New-York, United States). Statistical significance was identified at the p -value ≤ 0.05 .

3. Results and discussion

3.1. Crur peptic hydrolysis

The first aim of this study was to confirm the great similarities between the purified bovine hemoglobin hydrolysis and the bovine crur hydrolysis (Catiau et al., 2011). Different DH were investigated. Indeed, the DH did not show a linear relation with the hydrolysis time. Respectively, the DH was 1, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 8, 10, 13 and 18% when the hydrolysis time was 1, 2.5, 5, 10, 15, 30 min, 1, 2, 3, 10 and 24 h in these conditions.

In acetate sodium acetic acid buffer at pH 3.5 and 23 °C, the hemoglobin was denatured (Dubois et al., 2005) explaining the “zipper” mechanism of pepsin, described for the first time by Linderstrom-Lang (1952). In this case, the hemoglobin subunits were rapidly hydrolyzed to intermediate peptides which are converted to final peptides, smaller and generally more hydrophilic than intermediate peptides. Also, these conditions have shown an important accumulation of antimicrobial peptides, explained by the “zipper” mechanism, and a higher α 137–141 concentration was observed compared to the other working pH (Dubois et al., 2005).

The Fig. 1 shows the RP-HPLC chromatograms from the peptic purified bovine hemoglobin and crur hydrolysis under these conditions, at a C_{BH} of 1%. The most striking fact was that the chromatograms were the same, for a given DH. The first known fraction was α 137–141 and it was present in all hydrolysis degrees. Two other fractions were identified and represent α 133–141 peptide and α 107–141 peptide. These two last peptides, according to Catiau et al. (2011), were α 137–141 precursors and showed the same kinetics compared to the purified bovine hemoglobin. In fact, α 107–141 disappeared rapidly during the hydrolysis (DH = 10%) because it was an intermediate peptide. Moreover, it was hydrolyzed to intermediate peptide, α 133–141, produced from α 107–141 and appeared early during the crur hydrolysis. Its concentration increased up to 10% of DH and decreased after, according to the kinetic described by Dubois et al. (2005) for purified bovine hemoglobin. About α 137–141, it appeared early (DH = 1%) and its concentration increased throughout the hydrolysis, so α 137–141 was accumulated during the process. Therefore, it was a final peptide: it was not hydrolyzed to a smaller peptide, in agreement with

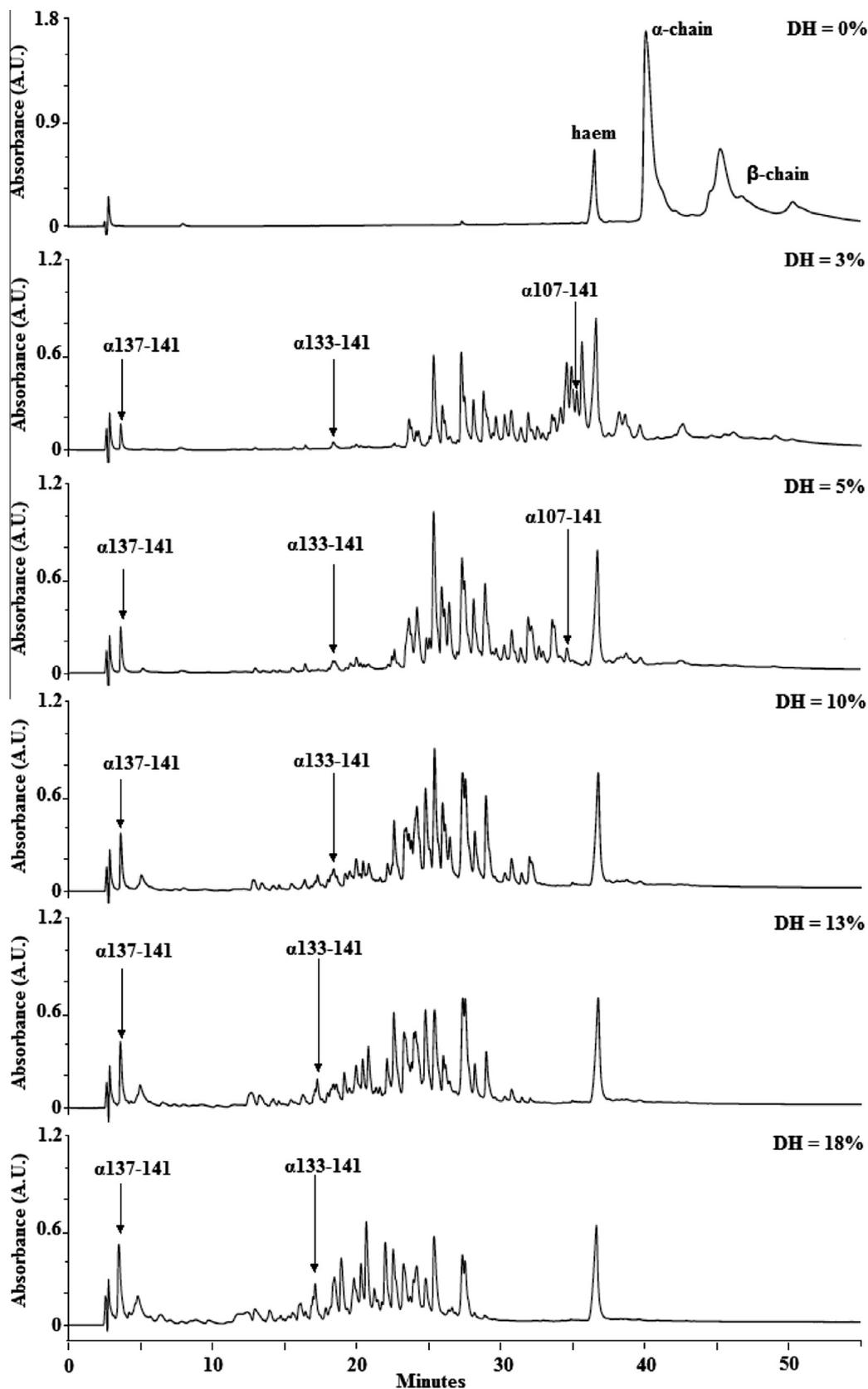


Fig. 1. Chromatographic profiles of bovine cruor hydrolysis at 215 nm by RP-HPLC with a C_4 column at different hydrolysis degrees. Peptic hydrolysis was performed at 23 °C in sodium acetate acetic acid buffer (0.5 M, pH 3.5) for 24 h.

Lignot, Froidevaux, Nedjar-Arroume, and Guillochon (1999) which specified that α 137–141 was a final peptide at 23 °C.

On chromatographic profiles (Fig. 1), many fractions were observed containing other intermediate peptides which were not

involved in the α 137–141 production. These peptides were hydrolyzed to final peptides during the hydrolysis of hemoglobin contained in cruor.

To conclude, the bovine cruor hydrolysis showed the same enzymatic mechanism as the purified bovine hemoglobin hydrolysis. Hence, bovine cruor is an interesting potential source to produce antimicrobial peptides.

3.2. α 137–141 identification by Millenium software

To ensure good identification of α 137–141, two parameters have been considered: retention time and real-time spectrum of peak thanks to HPLC coupled with photodiode array detector. This method has been used with efficiency to identify and quantify four hemorphins (VV-5, LVV-5, VV-7 and LVV-7) and an antimicrobial α 1-23 peptide (Choisnard et al., 2002; Zhao, Sannier, & Piot, 1996; Zhao et al., 1995).

The standard α 137–141 had a retention time of about 4 min. Then, the peptide from hydrolysate was analyzed by comparing it to its own spectrum and the standard spectrum. With the four parameters (MA, MT, PA and PT) and the retention time, the peak was identified as α 137–141. The analyses indicated that the identification was nearly unaffected by the C_{BH} . For all tests, PA was inferior to PT and MA was lower than MT, making out a good idea of peak purity and the spectrum similarity with α 137–141.

Furthermore, a second-order derivative spectral analysis of peptides testified of the presence (or absence) of aromatic amino acids (Zhao et al., 1995). In our case, the presence of tyrosine was estimated according to α 137–141 sequence peptide (Catiau et al., 2011). The specific minima at 276 and 283.5 nm indicated this amino acid. The Fig. 2 shows the spectra comparison between α 137–141 standard and α 137–141 from cruor hydrolysates in second-order derivate. Many similarities showed us that this peak contained α 137–141.

3.3. α 137–141 characterization by MALDI-TOF

To confirm the α 137–141 peak purity, the α 137–141 standard and the α 137–141 from cruor hydrolysates were analyzed by MALDI-TOF. The spectrum of α 137–141 from cruor is displayed in the Fig. 3. According to the approximated monoisotopic α 137–141 molecular mass (653.35 Da by Peptide mass on ExPASy.org), the α 137–141 purified by RP-HPLC was pure and was the alone peptide in this peak. Hence, the accurate relative molecular mass was deduced from the m/z value. A molecular mass was obtained, 654.37 Da, corresponding to value of $[M+H]^+$. This result confirmed the first approach by Millenium Software about purity and similarity spectra.

3.4. α 137–141 enzymatic production

By the fact that the α 137–141 peak was pure, the peptide dosage was made by RP-HPLC, respecting parameters defined in Materials and Methods section (§ 2.4.3.). Also, to evaluate the peptide production at pilot-scale, it was necessary to raise the C_{BH} and verify the α 137–141 production at higher hemoglobin concentration. Likewise, the test could confirm the ability of pepsin to hydrolyze at high substrate concentrations. This measurement was made with different C_{BH} from cruor (1, 2, 5 and 8%) and DH (0–18%).

The Fig. 4 presents the α 137–141 kinetic appearance depending on DH and C_{BH} . For C_{BH} = 1% (w/v), at DH = 18%, $C_{\alpha 137-141}$ was 96.27 ± 14.58 mg L⁻¹. Thus, the C_{BH} was doubled. By this fact, the $C_{\alpha 137-141}$ was about 2-fold than 1% (w/v): 183.87 ± 17.36 mg L⁻¹. With C_{BH} = 5% (w/v), the α 137–141 generation allowed a production of 502.13 ± 37.81 mg L⁻¹ which means 5-fold than 1% (w/v). Finally, C_{BH} = 8% (w/v) was tested and $C_{\alpha 137-141}$ was 807.95 ± 41.03 mg L⁻¹ which was 8-fold than 1% (w/v). Consequently, the produced α 137–141 evolved proportionally with the C_{BH} . Therefore, we are able to say that the enzyme keeps the same hydrolysis mechanism, independently of cruor concentration, for all tested concentrations. Moreover, this figure shows a quick mechanism because the α 137–141 production was fast. Whatever C_{BH} tested, the shape of kinetics remained the same. Indeed, after a DH = 10%, the α 137–141 apparition slowed down and the kinetics tended to reach a plateau. This result confirmed that α 137–141 was a final peptide in these hydrolysis conditions (Lignot et al., 1999).

To prove the fast α 137–141 production, it was important to point out that already $67.18 \pm 4.14\%$ of finally generated α 137–141 had been produced at 30 min of hydrolysis. These data could be interesting for a reflection of profitability at pilot-scale production.

3.5. Lipid oxidation evolution during the storage

Lipid oxidation is an important factor involved in meat rancidity. During the storage under refrigeration, the lipid oxidation has been measured by TBARS method (Witte et al., 1970) and the results are shown in the Fig. 5. The TBARS are produced through the second stage of autoxidation during which peroxides are oxidized to aldehydes and ketones such as malondialdehyde (i.e. MDA). For all meat samples, the TBARS values increased throughout the fourteen days experiment. As expected, the effect was the most striking for the control (i.e. without additives) and it had the highest TBARS value than all tested conditions at the end of storage ($p \leq 0.05$). However, no significant effect between the four treated groups has been observed during the first seven days of the experiment, but their TBARS-values were significantly lower than the control from day 2, about 2-fold. From day 9, the α 137–141 at 0.1% (w/w) was higher (0.90 ± 0.06 mg MDA/kg) than the

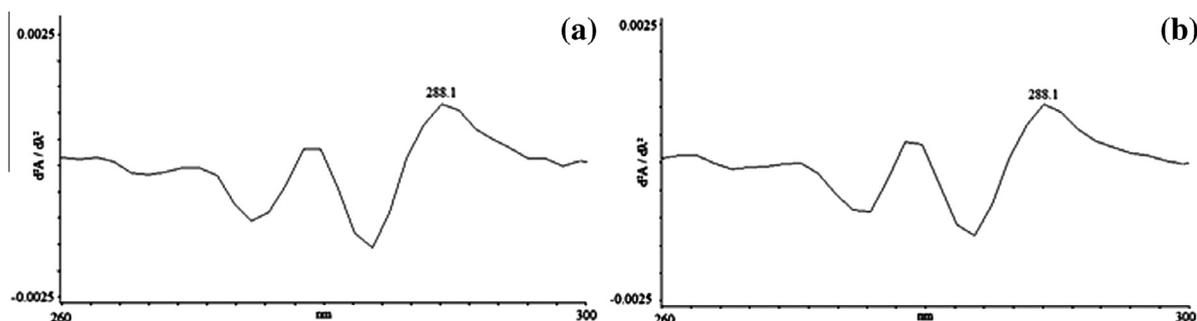


Fig. 2. Comparison of second-order derivative spectra between standard α 137–141 and α 137–141 from bovine cruor hydrolysate purified by RP-HPLC with C_4 column.

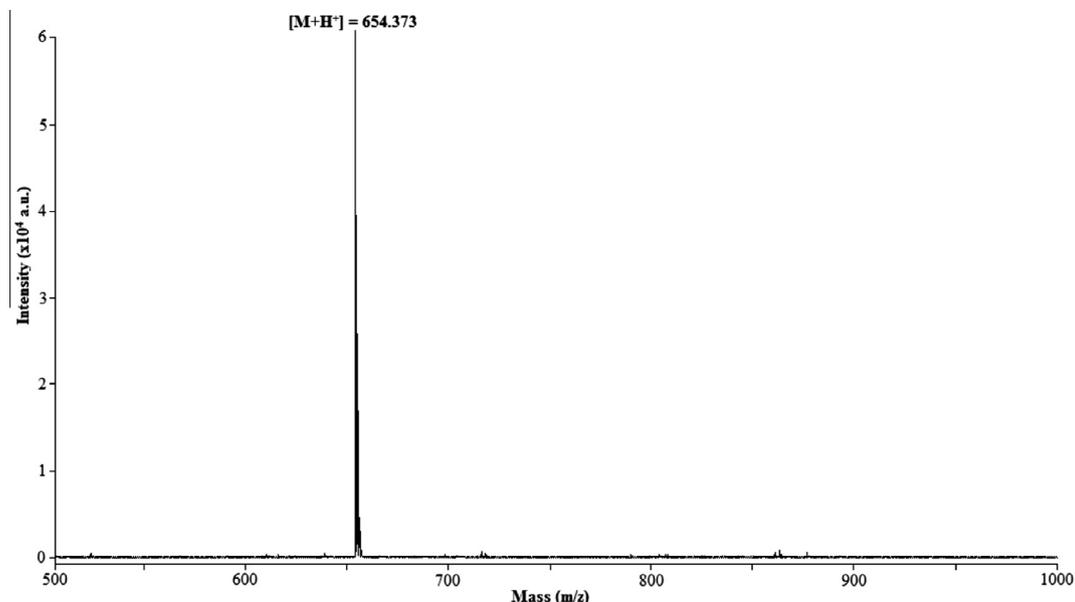


Fig. 3. MALDI-TOF spectrum of fraction suspected to contain α 137–141 from cruor hydrolysate, isolated by RP-HPLC with C_4 column.

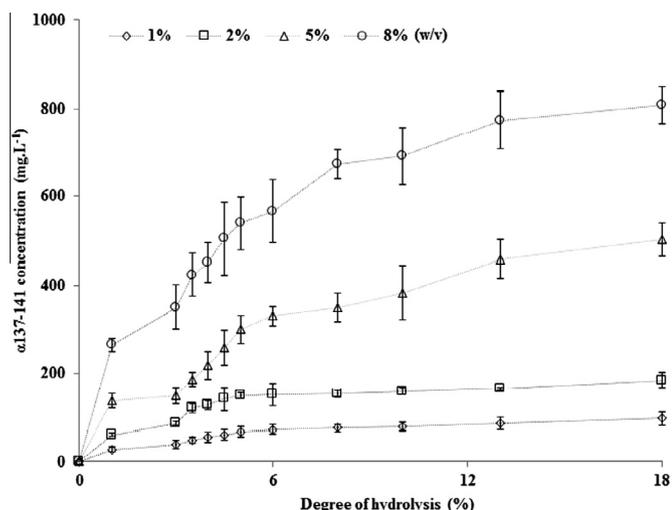


Fig. 4. Kinetics of α 137–141 appearance in the course of bovine cruor peptic hydrolysis with the ratio enzyme/substrate = 1/11, at different bovine hemoglobin concentrations.

other three treated groups (with an average value of 0.60 ± 0.06 mg MDA/kg) but remained lower than the control (1.43 ± 0.14 mg MDA/kg). This tendency continued until the end of the experiment. At day 14, the BHT at 0.1 and 0.5% (w/w) and α 137–141 at 0.5% (w/w) had no significant difference to protect the phenomenon of lipid oxidation with a TBARS-value about of 0.70 mg MDA/kg meat. Consequently, the BHT at 0.1 and 0.5% (w/v) and α 137–141 at 0.5% (w/w) reduced the lipid oxidation on meat of 60%. Furthermore, the α 137–141 at 0.1% (w/w) reduced the lipid oxidation of 42%.

These results showed that the α 137–141 peptide has a positive effect on meat protection by reducing the lipid oxidation. Hence, we can suggest that the studied peptide has an antioxidant activity. That was probably due to its tyrosine (Y). Indeed, this aromatic residue can quench free radicals by direct electron transfer to act as an antioxidant (Huang, Ou, & Prior, 2005). Moreover, it was also reported that the lysine (K) and arginine (R) residues at the C-terminal of a peptide showed a high antioxidant activity (Guo, Kouzuma, & Yonekura, 2009). Therefore, the α 137–141 peptide would be a potential candidate to protect meat against rancidity.

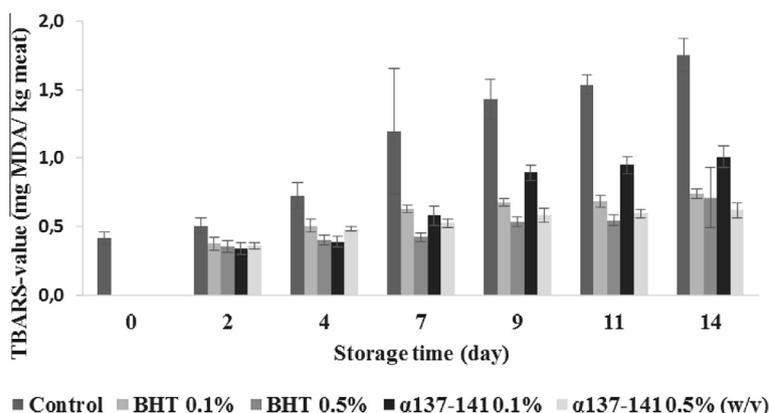


Fig. 5. Lipid oxidation evaluation of the meat treated with BHT and α 137–141 at concentrations of 0.1 and 0.5% (w/w) during storage under refrigeration.

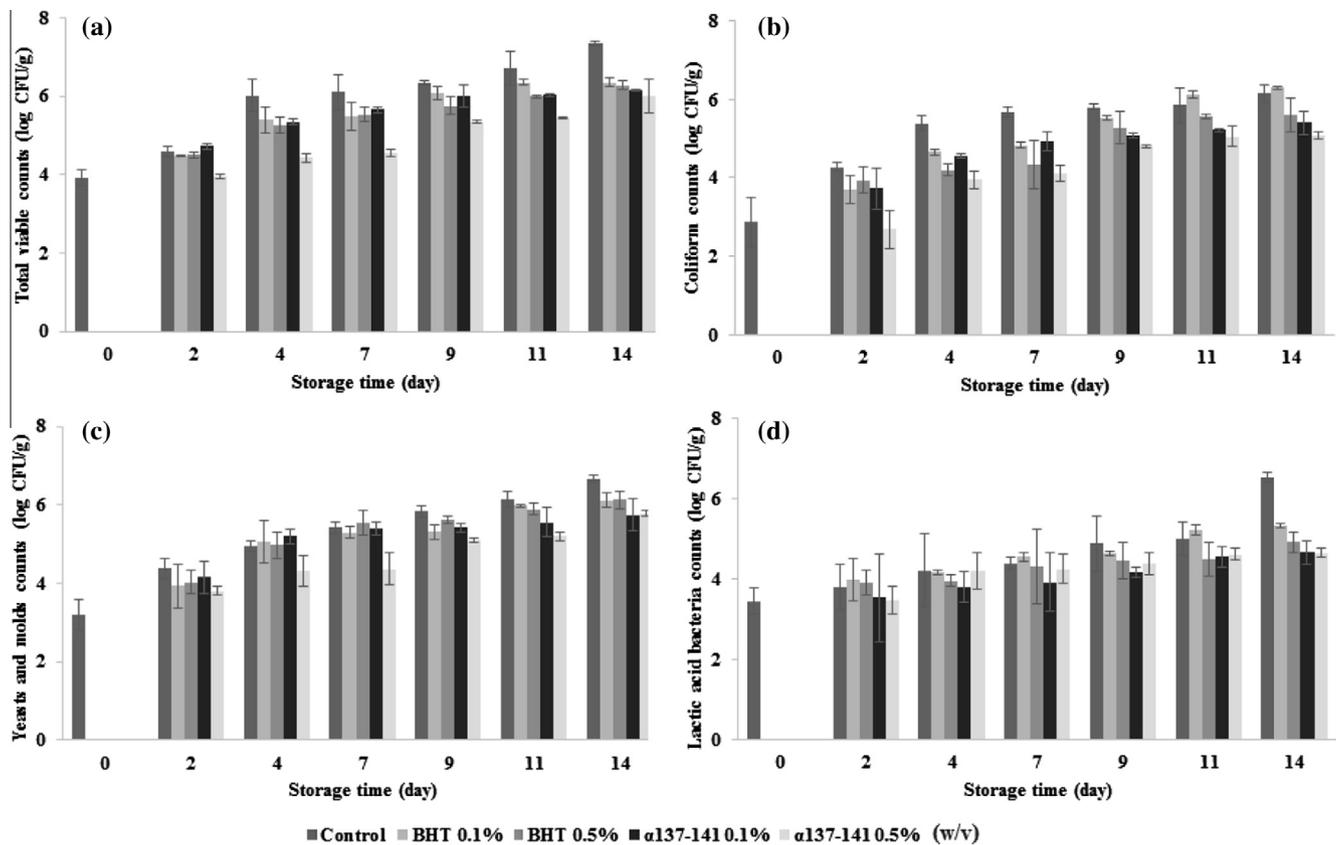


Fig. 6. Microbial changes in meat treated with BHT and α 137-141 at concentrations of 0.1 and 0.5% (w/w) during storage under refrigeration. (a) Total viable counts, (b) coliform counts, (c) yeasts and molds counts, (d) lactic acid bacteria counts.

3.6. Microbiological growths on meat during the storage

To testify of the effect of α 137-141 addition on the meat, several counts have been carried out during the storage at 4 °C and the results are shown in the Fig. 6.

The total microbial population (Fig. 6a) decreased significantly with the presence of additives. In fact, the group without treatment had a higher total of viable colonies than the groups treated with additives at the end of the experiment ($p \leq 0.05$). However, no significant difference has been observed between the four treated groups with additives (from 6.01 ± 0.42 to 6.35 ± 0.12 log CFU/g). Nevertheless, the group with α 137-141 at 0.5% (w/w) showed the slowest increase in the number of total viable colonies. For each measurement, this group was significantly lower than the others, except for the fourteenth day.

For the coliform bacteria (Fig. 6b), the most effective additives were the α 137-141 at 0.1 and 0.5% (w/w), with the coliform counts of 5.41 ± 0.30 and 5.07 ± 0.09 log CFU/g, respectively, at day 14. These effects were similar to BHT 0.5% (w/w) (no significant difference). On the other hand, the groups treated with BHT 0.1% (w/w) and without additive presented no significant difference at days 11 and 14, with the coliform counts superior than 6.1 log CFU/g, compared to day 0 with 2.87 ± 0.62 log CFU/g.

Then, the yeasts and molds growths (Fig. 6c) were not significantly inhibited from day 0 to day 9, except for α 137-141 at 0.5% (w/w) for the seventh day. At this time, the microbial counts were of 5.42 ± 0.16 log CFU/g for the untreated group and of 4.37 ± 0.42 log CFU/g for the group treated with the α 137-141 at 0.5% (w/w). After 7 days, all treated groups showed a significant difference with the negative control group. Once again, the most effective group was the α 137-141 at 0.5% (w/w).

At last, for the growth of lactic acid bacteria (Fig. 6d), no effect of additives has been recorded. Only the fourteenth day showed a significant difference between the untreated group and all treated groups. Nevertheless, the effects of α 137-141-groups were similar to the BHT-groups.

To sum up, the α 137-141 showed interesting effects against microbial proliferation in meat stored at 4 °C, particularly with the concentration of 0.5% (w/w). The most striking effect was recorded on coliform growth. Moreover, this peptide effect was close to the tested BHT. These results confirmed the antimicrobial effects previously described by Catiau et al. (2011) and demonstrated the α 137-141 potentiality to be a preservative for meat and its derived products.

4. Conclusion

Bovine cruor is an interesting slaughterhouse by-product to recover antimicrobial peptides. It can be hydrolyzed at high hemoglobin concentrations (from 1 to 8% (w/v)) enabling the fast production of the α 137-141 antimicrobial peptide. This final peptide can reach the maximal concentration of 807.95 ± 41.03 mg L⁻¹ from which more 60% were generated in 30 min. By its application on meat, the α 137-141 peptide reduced the lipid oxidation by about 60% with a concentration of 0.5% (w/w). The α 137-141 antimicrobial effects as a food preservative have been also demonstrated. The α 137-141 peptide inhibited the growths of total viable colonies, yeasts and molds, but the most striking effect was on the proliferation of the coliform bacteria.

Given the current context of food safety and food protection by means of natural products, the α 137-141 peptide derived from

crucor would be a promising natural preservative for the substitution of the synthetic additives widely used to protect meat during its storage and distribution.

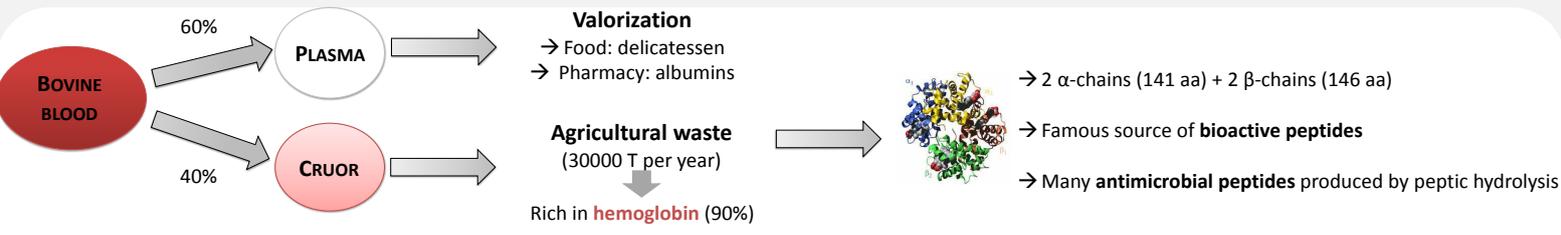
Acknowledgments

We thank Christine Vanuxem from University of Lille I and Aurore Robilliart for assisting in the review of this manuscript. We are grateful to Geneviève Giguère and Nicolas Prudon for technical assistance in antimicrobial activity.

References

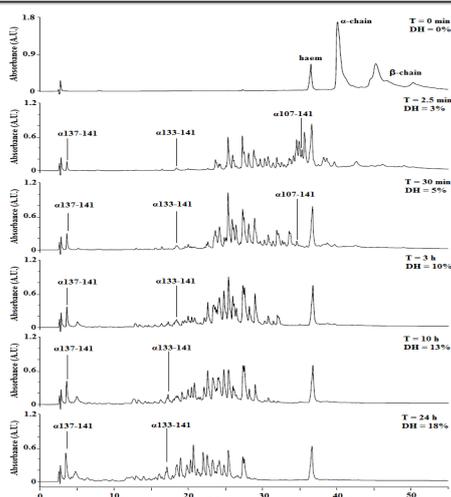
- Adje, E. Y., Balti, R., Kouach, M., Dhulster, P., Guillochon, D., & Nedjar-Arroume, N. (2011). Obtaining antimicrobial peptides by controlled peptic hydrolysis of bovine hemoglobin. *International Journal of Biological Macromolecules*, *49*, 143–153.
- Agyei, D., & Danquah, M. (2011). Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, *29*, 272–277.
- Bah, C. S. F., Bekhit, A. E.-D. A., Carne, A., & McConnell, M. A. (2013). Slaughterhouse blood: An emerging source of bioactive compounds. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *12*, 314–331.
- Bauer, A. K., Dwyer-Nield, L. D., Hankin, J. A., Murphy, R. C., & Malkinson, A. M. (2001). The lung tumor promoter, butylated hydroxytoluene (BHT), causes chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant CXB4 mice. *Toxicology*, *169*, 1–15.
- Borch, E., & Arinder, P. (2002). Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well as control measures. *Meat Science*, *62*, 381–390.
- Castro, R. J. S. D., & Sato, H. H. (2015). Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International*, *74*, 185–198.
- Catiou, L., Traisnel, J., Delval-Dubois, V., Chihib, N.-E., Guillochon, D., & Nedjar-Arroume, N. (2011). Minimal antimicrobial peptide sequence from hemoglobin alpha-chain: KYR. *Peptides*, *32*, 633–638.
- Chaâbane, M., Maktouf, S., Nadhem, S., Zouari, S., Zeghal, N., & Ghorbel, R. E. (2014). Antioxidant and antimicrobial properties of the extracts from *Nitraria retusa* fruits and their applications to meat product preservation. *Industrial Crops and Products*, *55*, 295–303.
- Choisnard, L., Froidevaux, R., Nedjar-Arroume, N., Lignot, B., Vercaigne-Marko, D., Krier, F., ... Guillochon, D. (2002). Kinetic study of the appearance of an antibacterial peptide in the course of bovine haemoglobin peptic hydrolysis. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *36*, 187–194.
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H., & Catignani, L. (1983). Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, *66*, 1219–1227.
- Clare, D. A., & Swaisgood, H. E. (2000). Bioactive milk peptides: A prospectus. *Journal of Dairy Science*, *83*, 1187–1195.
- Crosby, W. H., Munn, J. L., & Furth, F. W. (1954). Standardizing a method for clinical hemoglobinometry. *US Armed Forces Medical Journal*, *5*, 693–703.
- Danquah, M., & Agyei, D. (2012). Pharmaceutical applications of bioactive peptides. *OA Biotechnology*, *1*(2), 5–9.
- Daoud, R., Dubois, V., Bors-Dodita, L., Nedjar-Arroume, N., Krier, F., Chihib, N.-E., ... Guillochon, D. (2005). New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin. *Peptides*, *26*, 713–719.
- Dubois, V., Nedjar-Arroume, N., & Guillochon, D. (2005). Influence of pH on the appearance of active peptides in the course of peptic hydrolysis of bovine haemoglobin. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, *35*, 85–102.
- Froidevaux, R., Krier, F., Nedjar-Arroume, N., Vercaigne-Marko, D., Kosciarz, E., Ruckebusch, C., ... Guillochon, D. (2001). Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. *FEBS Letters*, *491*, 159–163.
- Gomes, I., Dale, C. S., Casten, K., Geigner, M. A., Gozzo, F. C., Ferro, E. S., ... Lakshmi, A. D. (2010). Hemoglobin-derived peptides as novel type of bioactive signaling molecules. *The AAPS Journal*, *12*(4), 658–668.
- Goot, A. J. V. D., Pelgrom, P. J. M., Berghout, J. A. M., Geerts, M. E. J., Jankowiak, L., Hardt, N. A., ... Boom, R. M. (2016). Concepts for further sustainable production of foods. *Journal of Food Engineering*, *168*, 42–51.
- Guo, H., Kouzuma, Y., & Yonekura, M. (2009). Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly proteins. *Food Chemistry*, *113*, 238–245.
- Hartmann, R., & Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: From research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, *18*, 163–169.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(6), 1841–1856.
- Imaida, K., Fukushima, S., Shirai, T., Ohtami, M., Nakamish, K., & Ito, N. (1983). Promoting activities of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on 2-stage urinary carcinogenesis and inhibition of gamma-glutamyl trans peptide positive for development in the liver of rats. *Carcinogenesis*, *4*, 895–899.
- Kim, S.-J., Cho, A. R., & Han, J. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. *Food Control*, *29*, 112–120.
- Lafarga, T., & Hayes, M. (2014). Bioactive peptides from meat muscle and by-products: Generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Science*, *98*, 227–239.
- Lanigan, R. S., & Yamarik, T. A. (2002). Final report on the safety assessment of BHT. *International Journal of Toxicology*, *21*(2), 19–94.
- Lignot, B., Froidevaux, R., Nedjar-Arroume, N., & Guillochon, D. (1999). Solvent effect on kinetics of appearance of neoyotorphin, VVh4 and a bradykinin-potentiating peptide in the course of peptic hydrolysis of bovine haemoglobin. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *30*, 201–207.
- Linderstrom-Lang, K. (1952). *Proteins and enzymes III*.
- Nedjar-Arroume, N., Dubois-Delval, V., Adje, E. Y., Traisnel, J., Krier, F., Mary, P., ... Guillochon, D. (2008). Bovine hemoglobin: An attractive source of antibacterial peptides. *Peptides*, *29*, 969–977.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N., & Juneja, L. R. (2005). Antioxidant properties of casein calcium peptides and their effects on lipid oxidation in beef homogenates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 464–468.
- Sun, Q., Luo, Y., Shen, H., Li, X., & Yao, L. (2012). Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide from porcine haemoglobin hydrolysate. *International Journal of Food Science and Technology*, *47*, 148–154.
- Wang, L.-S., Huang, J.-C., Chen, Y.-L., Huang, M., & Zhou, G.-H. (2015). Identification and characterization of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of duck meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*, 3437–3444.
- Weiss, J., Gibis, M., Schuh, V., & Salminen, H. (2010). Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. *Meat Science*, *86*, 196–213.
- Witte, V. C., Krause, G. F., & Baily, M. E. (1970). A new extraction method for determination 2-thiobarbituric acid values of pork and beef during storage. *Food Science*, *35*, 582–585.
- Zhao, Q. Y., Piot, J. M., Gautier, V., & Cottenceau, G. (1996). Peptic peptide mapping by HPLC, on line with photodiode array detection, of a haemoglobin hydrolysate produced at pilot-plant scale from an ultrafiltration process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *45*, 778–784.
- Zhao, Q. Y., Sannier, F., & Piot, J. M. (1996). Kinetics of appearance of four hemorphins from bovine hemoglobin peptic hydrolysates by HPLC coupled with photodiode array detection. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1295*, 73–80.
- Zhao, Q. Y., Sannier, F., Ricart, G., & Piot, J. M. (1995). A rapid detection and identification of hemorphins released from bovine hemoglobin enzymatic hydrolysate by use of HPLC coupled with Photodiode Array Detector. *Journal of Liquid Chromatography*, *18*(1), 93–103.

INTRODUCTION AND OBJECTIVE



The aim of this work is to study the production and the antimicrobial activity of **neokyotorphin (NKT)**, a small (653 Da) and hydrophilic antimicrobial peptide with two positive charges at pH 7, corresponding to **α137-141** fragment (Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg). These precursors (**α107-141** and **α133-141**) are also identified.

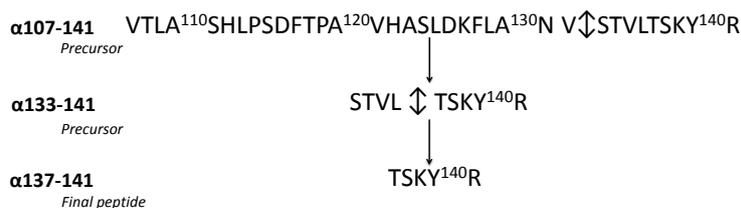
PRODUCTION OF NEOKYOTORPHIN



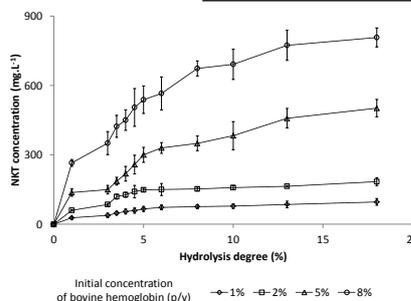
Conditions of hydrolysis:
 - [HB] = 1% (p/v)
 - E/S = 1/11 (mole/mole)
 - pH 3.5

At low degrees of hydrolysis (DH) yielded several intermediate peptides fractions. All the denatured hemoglobin molecules were rapidly converted to the intermediate peptides, which were degraded more slowly to final products: the observed mechanism is named «zipper».

Schematic representation of the α107-141 peptide peptic hydrolysis



Production of NKT during the hydrolysis



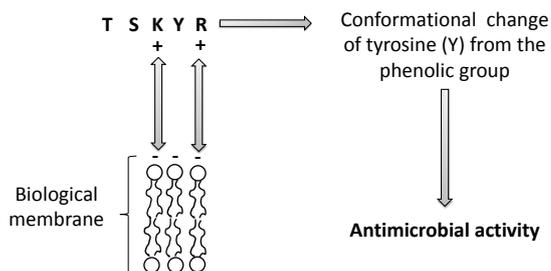
At these conditions of hydrolysis, the production of NKT is fast.

The generated quantity of NKT evolves proportionally with the initial concentration of bovine hemoglobin.

STUDY OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY

Mechanism of antimicrobial activity of NKT

NKT is different from the classical antimicrobial peptide: it is small, positively charged (+2 at pH 7), without hydrophobic residues and presents a random coil structure. These properties give a non-classical mechanism of action. Generally, the mechanism is: 1) adsorption by electrostatic interaction on the membrane and 2) by the hydrophobic part, insertion of the structured peptide in the membrane which involves pores formation.



Minimal Inhibitory Concentration (MIC) values (μM) of the pure antimicrobial peptides obtained after hydrolysis

	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. innocua</i>	<i>M. luteus</i>
α137-141	9	4.6	1	1	9
α107-141	87	87	43	43	87
α107-136	76	76	nd	38	76
α1-23	54	27	nd	54	100
α1-32	154	nd	nd	38	90

These results indicate that NKT is more active against all the tested bacterial strains than its precursors. Its MIC values are from **10 to 40-fold higher**.

Compared to others known peptides from bovine hemoglobin hydrolysis (α1-23 and α1-32), which are more long peptides and have a secondary structure involved in antibacterial mechanism, NKT is more effective.

CONCLUSION

Neokyotorphin is produced rapidly during hydrolysis and has **powerful antimicrobial activities**. In the current context of food safety and food protection by the way of natural products, using antimicrobial peptides from cruor could be of interest as a **preservative for storage and distribution of food products** like meat and its derived products.

Antibacterial Activities of Enzymatic Hydrolysis Products from Fish Proteins Against Pathogenic Bacteria

Assaâd SILA^{1,2,*}, Rémi PRZYBYLSKI¹, Ali BOUGATEF², Pascal DHULSTER¹ and Naima NEDJAR-ARROUME¹

- Institut Charles Violette, équipe ProBioGEM, Polytech'Lille, Boulevard Paul Langevin, 59655 VILLENEUVE D'ASCQ, France
- Unité Enzymes et Bioconversion, Ecole Nationale d'Ingénieurs, PB 1173, Sfax 3038, Tunisie. assaadsila@gmail.com

Introduction

Foodborne pathogens are a major concern to the food industry and consumers but they may be controlled with antimicrobials. Naturally occurring antimicrobials may be isolated from a variety of plant, animal and microbial sources. 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 antimicrobial peptides. Previous studies have demonstrated that peptides isolated from enzyme hydrolyzed proteins may have in vivo and in vitro antimicrobial activity. Such compounds could be of use as inhibitors of foodborne pathogens.

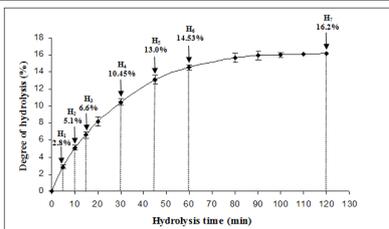
The objective of the present study was to isolate and characterize peptides from the protein hydrolysates of barbel muscle with antibacterial activity against Gram-positive (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* and *Bacillus cereus*) and Gram-negative (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter sp*) bacteria.

The Barbel



The Barbel (*Barbus callensis*) is a ray-finned fish species in the family Cyprinidae. Its natural habitats are rivers, freshwater lakes, and water storage areas. The barbel samples used in the present work were obtained from Barrage Sidi Saad, TUNISIA. The samples were placed in ice and transported to the laboratory within 2 h after collection.

Results

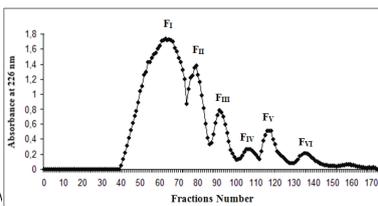


Hydrolysis curve of barbel muscle treated with Alcalase®
Hydrolysis was conducted at the following conditions:
enzyme (U)/protein (mg) ratio of 1:1, pH 8.0 and at 50 °C for 2 h.

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
Antibacterial activity of barbel muscle protein hydrolysates.

⇒ Barbel muscle protein hydrolysate with a DH of 6.6% (H₃) showed a strong antibacterial activity toward eight strains.

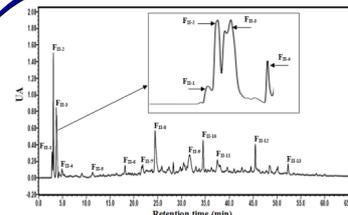
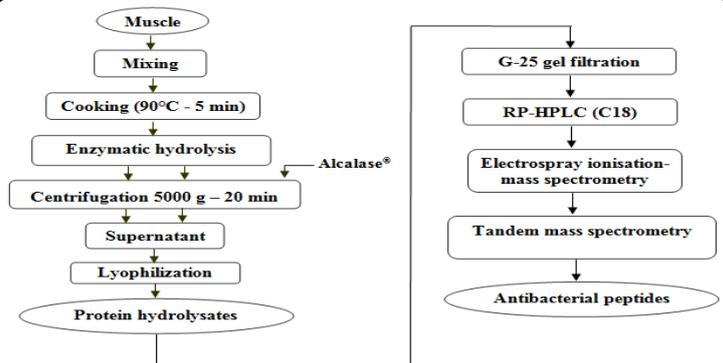


Antibacterial activity of fractions of hydrolysate H₃

⇒ Fraction F_{II} was the most active against tested bacterial species.

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>	-	++	-	-	-	-

Preparation of protein hydrolysates



Elution profile of fraction F_{II} separated by RP-HPLC

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>	+	-	+	+

Antibacterial activity of sub-fractions F_{II-1}, F_{II-2}, F_{II-3} and F_{II-4}.



Antibacterial activity of sub-fractions F_{II-1}, F_{II-2}, F_{II-3} and F_{II-4}

Peptide fractions	Molecular masses (Da)	Amino acid sequences	Hydrophobic ratio (%)
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-Ser	33
	314	Ala-Ser-Ser-Ser	25

Peptides identified by MS/MS in sub-fractions separated by RP-HPLC

Conclusion

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.

SELECTIVE SEPARATION OF AN ANTIMICROBIAL PEPTIDE FROM BOVINE HEMOGLOBIN HYDROLYSATES BY ELECTRODIALYSIS WITH ULTRAFILTRATION MEMBRANES

R. PRZYBYLSKI, L. FIRDAOUS*, L. BAZINET, P. DHULSTER, N. NEDJAR-ARROUME

Charles Viollette Institute, ProBioGEM Laboratory, Bâtiment Polytech'Lille, Boulevard Paul Langevin, 59655 VILLENEUVE D'ASCO, FRANCE

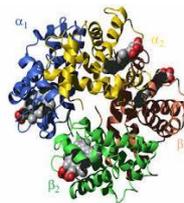
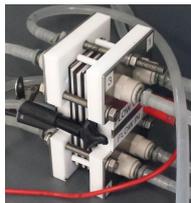
*corresponding author : loubna.firdaous@univ-lille1.fr



INTRODUCTION AND OBJECTIVE

Electrodialysis with ultrafiltration membranes (EDUF)

- Innovative membrane technology based on the separation mechanisms of **membrane filtration (size)** and **electrophoresis (electrical charge)**.
- Technology recently patented (Bazinet *et al.*, International Patent WO 082495A1, 2005).
- **Eco-friendly** and suitable for the large-scale fractionation of valuable molecules from complex feedstocks.



Bovine hemoglobin

- From **cruur** which represents the red fraction of blood (40% v/v).
- **Cruur** is a waste from food industry (30000 T per year).
- Rich source of bioactive peptides.
- Many **antimicrobial peptides** produced by peptic hydrolysis.

The aim of this work is to study the selective separation of **neokytorphin (NKT)**, a small peptide (653 Da) with two positive charges at pH 7, corresponding to **α137-141** fragment (Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg) from bovine hemoglobin hydrolysates by EDUF.

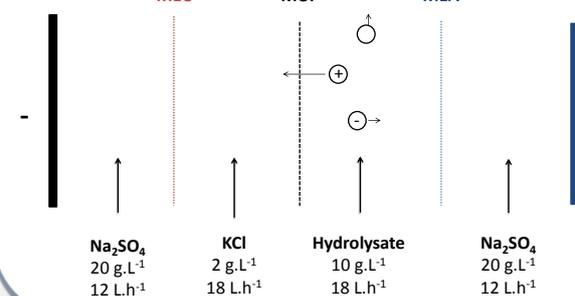
PRINCIPLE

Cationic configuration of EDUF

Membrane surface area: 10 cm²

Electrical field: 9V.cm⁻¹

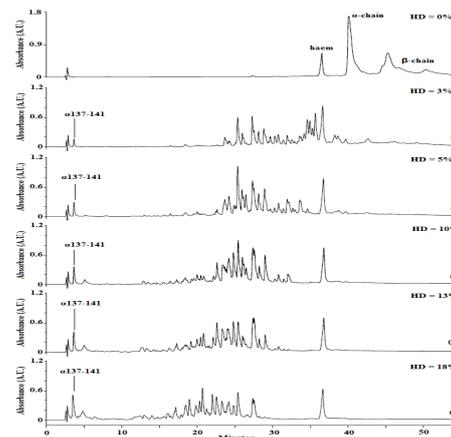
MEC MUF MEA



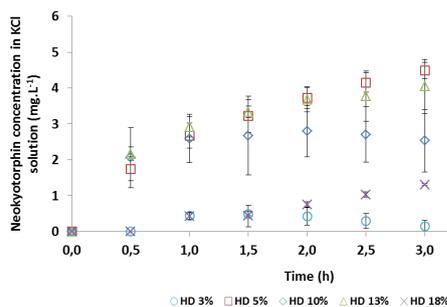
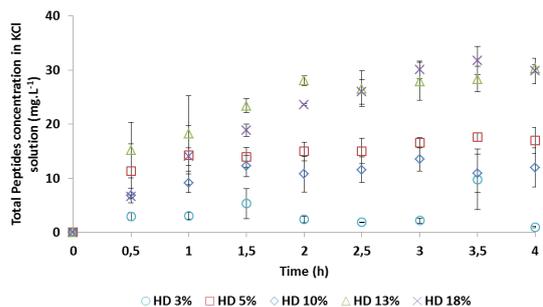
Five hydrolysis degrees (HD) were selected to provide different peptidic populations around the NKT so as to study the influence of DH on separation of NKT.

Peptic hydrolysis allows generation of different populations of peptides by its enzymatic mechanism called «**zipper**». In fact, at each degree of hydrolysis corresponds a different peptidic population.

Low hydrolysis degrees (HD) yielded several **intermediate peptides fractions**. All the denatured hemoglobin molecules were rapidly converted to the intermediate peptides, which were degraded more slowly to **final products**.



INFLUENCE OF HYDROLYSIS DEGREE ON NKT SEPARATION

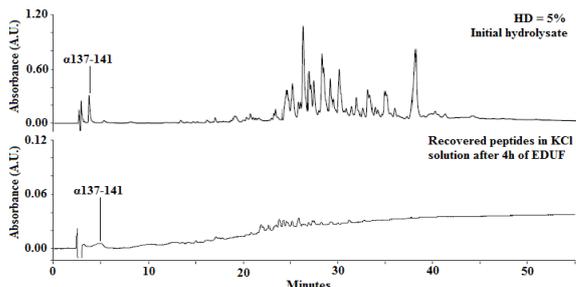


→ With the lowest tested HD (3% ○), the migration of NKT is braked by undigested sub-units of hemoglobin.

→ At the highest HD (18% ×), the migration of total peptides was the most effective. It is supposed that this peptidic transfer (composed in majority by little positively charged peptides) has braked the migration of NKT.

→ After 4h of EDUF, the most effective NKT transfer in KCl solution was recorded with a HD of 5% (□). The maximum transport rate for NKT was 2,67 g/h. m².

Evolution of total peptides and neokytorphin concentrations in the KCl solution as a function of time during electrodialysis



NKT proportion = 0,3%
Total peptides > 70

NKT proportion = 10,3%
Total peptides = 17

RP-HPLC chromatogram of the initial hydrolysate and the KCl solution obtained after 4h of EDUF

→ After 4h of experiment, the proportion of NKT in the total peptidic population was higher to 30-fold compared to the initial hydrolysate.

→ The other recovered peptides in the KCl solution were in accordance with the used cell configuration: peptides positively charged with molecular mass inferior than the cut-off weight membrane of ultrafiltration.

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

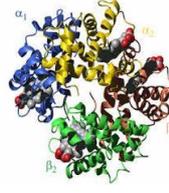
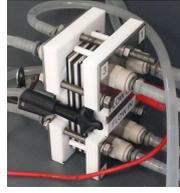
- EDUF is a **suitable method** to fractionate bovine hemoglobin hydrolysates and to separate selectively the NKT peptide.
- The most appropriate HD is 5% to separate NKT. The **enrichment factor in NKT** was superior than **30-fold** compared to the initial hydrolysate.
- The perspectives are to increase the yield of recovery and the NKT proportion in the recovery compartment.

INTRODUCTION AND OBJECTIVE

Electrodialysis with ultrafiltration membranes (EDUF)

→ Innovative membrane technology based on the separation mechanisms of **membrane filtration (size)** and **electrophoresis (electrical charge)**.

→ **Eco-friendly** and suitable for the large-scale fractionation of valuable molecules from complex feedstocks.



Bovine hemoglobin

→ From **cruur** which represents the red fraction of blood (40% v/v).

→ **Cruur** is a waste from food industry (30000 T per year).

→ Rich source of bioactive peptides.

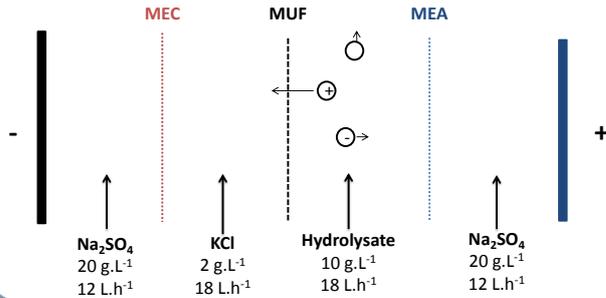
The **aim of this work** is to study the selective separation of **neokytorphin (NKT)**, a small peptide (653 Da) with two positive charges at pH 7, corresponding to **α137-141** fragment (Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg) from bovine hemoglobin hydrolysates by EDUF.

PRINCIPLE

Cationic configuration of EDUF

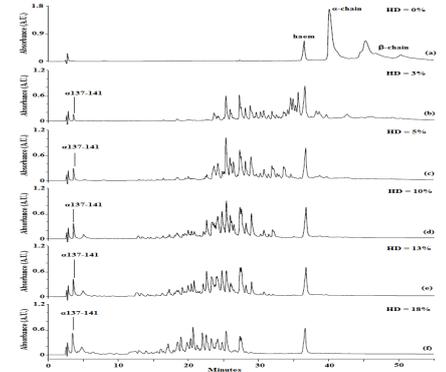
Membrane surface area: 10 cm²

Electrical field: 9V.cm⁻¹

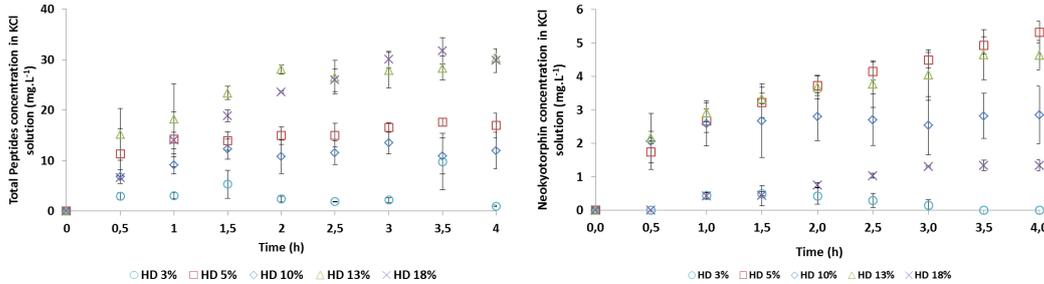


Five hydrolysis degrees (HD) were selected to provide different peptidic populations around the NKT so as to study the influence of DH on separation of NKT.

Peptic hydrolysis allows generation of different populations of peptides by its enzymatic mechanism called «**zipper**». In fact, at each degree of hydrolysis corresponds a different peptidic population.



EFFECT OF HYDROLYSIS DEGREE ON NKT SEPARATION



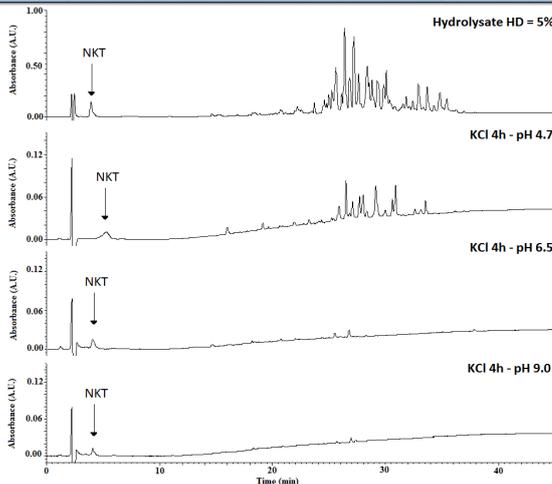
→ With the lowest tested HD (3%), the migration of NKT is braked by undigested sub-units of hemoglobin.

→ At the highest HD (18%), the migration of total peptides was the most effective. It is supposed that this peptidic transfer (composed in majority by little positively charged peptides) has braked the migration of NKT.

→ After 4h of EDUF, the most effective NKT transfer in KCl solution was recorded with a **HD of 5%** (2.67 g/m².h).

Evolution of total peptides and neokytorphin concentrations in the KCl solution as a function of time during EDUF

EFFECT OF PH-CONTROLLING ON NKT SEPARATION



NKT proportion = 0.3%
Total peptides > 70

NKT proportion = 11.6%
Total peptides = 23

NKT proportion = 42.5%
Total peptides = 10

NKT proportion = 56.5%
Total peptides = 4

→ Selecting a pH of 9.0 increased NKT purity about 150-fold compared to the initial hydrolysate. Also, only 4 peptides at significant concentrations were recovered in the permeate (KCl solution) from the initial feed which contained more than 70 peptides.

→ The other recovered peptides in the KCl solution were in accordance with the used cell configuration: peptides positively charged with molecular mass inferior than the cut-off weight membrane of ultrafiltration.

CONCLUSIONS

→ EDUF is a **suitable method** to fractionate bovine hemoglobin hydrolysates and to separate selectively the NKT peptide.

→ The most appropriate HD is 5% to separate NKT. The **enrichment factor in NKT was superior than 30-fold** compared to the initial hydrolysate.

→ Selecting a pH of 9.0 increased NKT purity about 150-fold compared to the initial hydrolysate.

SELECTIVE SEPARATION OF AN ANTIMICROBIAL PEPTIDE FROM BOVINE HEMOGLOBIN HYDROLYSATES BY ELECTRODIALYSIS WITH ULTRAFILTRATION MEMBRANES

Congress: ECAB3

Topic: Agro-food biotechnology

Presenting author: Rémi Przybylski

Authors and affiliations : Rémi Przybylski:ProBioGEM laboratory,Charles Viollette Institute,Villeneuve d'Ascq,France | Loubna Firdaous:ProBioGEM laboratory,Charles Viollette Institute,Villeneuve d'Ascq,France | Laurent Bazinet:Institute of Nutrition and Functional Foods,University of Laval,Laval,Canada | Pascal Dhulster:ProBioGEM laboratory,Charles Viollette Institute,Villeneuve d'Ascq,France | Naïma Nedjar-Arroume:ProBioGEM laboratory,Charles Viollette Institute,Villeneuve d'Ascq,France

Abstract:

Many previous studies demonstrated that bovine hemoglobin is a rich source of antimicrobial peptides [1]. In the current context of food safety, it would be interesting to valorize them as preservatives for storage of food products. However, isolation of target peptides by conventional pressure-driven processes is difficult due to close molecular weight of peptides in the hydrolysates [2]. Likewise, chromatography techniques require solvents and chemical reagents which are too expensive. In this study, we investigated the selective separation of neokyotorphin (NKT), a small (653 Da) and hydrophilic antimicrobial peptide (Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg) from bovine hemoglobin hydrolysates by an innovative and environmentally clean membrane technology: electro dialysis with ultrafiltration membranes (EDUF) [3]. This technology is based on the separation mechanisms of membrane filtration and electrophoresis.

Firstly, the effect of five hydrolysis degrees (3, 5, 10, 13 and 18%) of bovine hemoglobin was studied on the process selectivity and the migration rate of NKT. Our results showed that the most appropriated hydrolysis degree was of 5% which allowed maximum NKT transfer rate of 2.67 g/m².h. After that, the NKT purity in the permeate was improved by controlling and selecting the pH to remove migration of other peptides except NKT. Selecting a pH of 9.0 increased NKT purity about 150-fold compared to the initial hydrolysate. Also, only 4 peptides were recovered in the permeate from the initial feed which contained more than 70 peptides.

It was well established that EDUF is a suitable method to separate selectively NKT. At our knowledge, it is the first time that the effect of hydrolysis degree of a protein is studied to preferentially separate one peptide.

Reference 1: Nedjar-arroume n. Et al., peptides, 29, 969-977, 2008

Reference 2 : Bazinet L. and Firdaous L., Recent Patents on Biotechnology, 7, 9-27, 2013

Reference 3 : Bazinet L. et al., International Patent WO 082495A1, 2005

Reference 4 :

Highlight 1: We studied the effect of five hydrolysis degrees on NKT separation in EDUF.

Highlight 2: We increased the NKT purity by controlling and selecting the pH.

Highlight 3: We improved the NKT purity about 150-fold compared to the initial hydrolysate.

Électroséparation d'un peptide antimicrobien à partir d'un co-produit des abattoirs

*Rémi Przybylski^a, Loubna Firdaous^a, Laurent Bazinet^b, Mostafa Kouach^c,
Jean-François Goossens^c, Pascal Dhulster^a, Naïma Nedjar^a*

(a) Institut Charles Viollette – Univ. Lille 1 – Lille, France

(b) Institute of Nutrition and Functional Foods – Laval Univ. – Québec, Canada

(c) Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses – Univ. Lille 2 – Loos, France

Aujourd'hui, l'industrie agroalimentaire se tourne peu à peu vers la valorisation de ses déchets, encore riches en composés bioactifs et dont le potentiel permettrait d'en faire des produits de haute valeur ajoutée. Dans ce contexte, le sang bovin issu des abattoirs représente une riche source de peptides antimicrobiens obtenus par hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine et pouvant se positionner comme des conservateurs naturels de la viande et de ses dérivés, comme le peptide α 137-141 (TSKYR, 653 Da, pI de 10.5). Son large spectre antimicrobien lui permet d'agir contre des bactéries pathogènes impliquées dans la contamination alimentaire. Cependant, la difficulté majeure de la production d'un tel peptide bioactif est sa séparation à partir de l'hydrolysate complexe, contenant généralement plus de 100 peptides. Récemment brevetée, l'électrodialyse couplée avec des membranes d'ultrafiltration (EDUF) est une technologie hybride et éco-responsable, séparant les composés selon leur charge (par application d'un champ électrique comme force motrice) et leur masse molaire (*via* le seuil de coupure de la membrane utilisée).

Afin d'obtenir la plus haute teneur en α 137-141 et donc la plus importante bioactivité effective, la stratégie de purification par EDUF a tout d'abord consisté à étudier l'influence du degré d'hydrolyse (DH de 3, 5, 10, 13 et 18%) de l'hémoglobine bovine sur la séparation sélective de l' α 137-141. La meilleure récupération d' α 137-141 fut obtenue lors de la séparation du DH de 5%, mettant en avant que sa séparation était préférentielle dans un hydrolysate où la proportion de peptides dans la même gamme de masses molaires que l' α 137-141 était faible et où les sous-unités de la protéine étaient totalement hydrolysées. Pour augmenter sa pureté, l'influence du pH de travail (4.7, 6.5 et 9) au sein de l'EDUF a été étudiée et a permis d'enrichir 75 fois en α 137-141, le récupérant avec une pureté de plus de 50%. Enfin, afin de valoriser au mieux le co-produit, la concentration peptidique a ensuite été augmentée de 1 à 8% (p/p), permettant de récupérer jusqu'à 4 fois plus d' α 137-141 tout en conservant un facteur d'enrichissement supérieur à 25 fois en comparaison de l'hydrolysate initial.

L'activité antimicrobienne des fractions recueillies a montré des résultats prometteurs, avec des activités aussi efficaces que celles obtenues avec un conservateur synthétique (le BHT) par application sur matrice alimentaire de type viande hachée. Ce dernier aspect laisse à penser qu'une *scale-up* du procédé serait intéressant pour envisager à plus large échelle la production de ces peptides bioactifs comme conservateurs naturels des aliments.

