

UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES  
DE LILLE

59653 VILLENEUVE D'ASCQ

TEL : 03 28 76 73 90

# HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

---

En Sciences Naturelles

2008

Par

**FROIDEVAUX Rénato**

**Maître de Conférences à l'Université des Sciences et Technologies de Lille I  
(64<sup>ème</sup> section)**

UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES  
DE LILLE

59653 VILLENEUVE D'ASCQ

TEL : 03 28 76 73 90

# HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

---

En Sciences Naturelles

2008

Par

**FROIDEVAUX Rénato**

**Maître de Conférences à l'Université des Sciences et Technologies de Lille I  
(64<sup>ème</sup> section)**

# **I. CURRICULUM VITAE**

## I.1. Etat civil

Rénato Froidevaux  
28 rue Roger Salengro  
59490 BRUILLE Lez MARCHIENNES  
Tél : 03.27.97.22.91  
E-mail : [renato.froidevaux@univ-lille1.fr](mailto:renato.froidevaux@univ-lille1.fr)

Né le 25 Janvier 1973 à Arras (62)  
Marié, deux enfants  
Service national accompli d'octobre 1996 à juillet 1997 dans la Brigade Franco-Allemande à IMMENDINGEN (ALLEMAGNE)

Maître de conférences classe normale 3<sup>ème</sup> échelon  
Enseignement à l'IUT « A » de Lille I dans le Parcours IUP Qualité et Environnement des Productions Industrielles - Bd Paul Langevin – Cité Scientifique - 59653 VILLENEUVE D'ASCQ - Tel /Fax : 03. / e-mail : [iup-qepi@univ-lille1.fr](mailto:iup-qepi@univ-lille1.fr)

Recherche au Laboratoire de Procédés Biologiques en Génie Enzymatique et Microbien – UPRES-EA 1026 du MEN - Polytech'Lille - Bd Paul Langevin – Cité Scientifique - 59653 VILLENEUVE D'ASCQ - Tel : 03.28.76.73.90 / Fax : 03.28.76.73.

## I.2. Formation et titres universitaires

- 1991-1994 : D.U.T de Biologie Appliquée option Industrie Agroalimentaire et Biologique à l'IUT « A » département de Génie Biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille.
- 1994-1995 : Licence de Biochimie à l'Université de Reims (51).
- 1995-1996 : Maîtrise de Biochimie option Biochimie Structurale et Analytique à l'Université des Sciences et Technologies de Lille.
- 1997-1998 : DEA de Génie Enzymatique, Bioconversion et Microbiologie à l'Université des Sciences et Technologies de Lille.  
Sujet : « *Hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine en solvants organiques biphasiques : études préliminaires sur la préparation de peptides opioïdes dans un réacteur ouvert* » dans le Laboratoire de Technologie des Substances Naturelles dirigé par la Pr . Didier GUILLOCHON à l'IUT « A » département de Génie Biologique.

1998-2001 : Thèse de Doctorat de Génie Enzymatique, Bioconversion et Microbiologie réalisée dans le cadre d'une convention MENRT sous la direction du Pr D. GUILLOCHON au Laboratoire de Technologies des Substances Naturelles.  
Sujet : « *Mise en oeuvre de la pepsine de porc dans un système de solvants biphasiques pour la préparation de peptides opioïdes à partir de l'hémoglobine bovine* »

### **I.3. Carrière scientifique**

1998-2001     Moniteur de l'enseignement supérieur dans le département de Génie Biologique à l'IUT « A » de Lille I.

Octobre 2001     Maître de Conférences classe normale 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> échelon à l'UFR de Biologie de l'Université des Sciences et Technologies de Lille. Laboratoire de Technologies des Substances Naturelles, directeur : Pr. D. GUILLOCHON

Juillet 2004     Maître de Conférences classe normale 3<sup>ème</sup> échelon à l'UFR de Biologie de l'Université des Sciences et Technologies de Lille.

**II. ACTIVITES ADMINISTRATIVES  
ET  
RESPONSABILITES COLLECTIVES**

## **II.1. Au niveau de l'enseignement**

- Depuis 2001 responsable pédagogique de la 1<sup>ère</sup> année (Bac+1) de l'IUP Qualité et Environnement des Productions Industrielles (Resp. Pr A. LEPRETRE).
- Dans le cadre de la réforme Licence-Master-Doctorat des universités en 2005-2006, mise en place de l'année Licence 3 aménagée du Parcours IUP QEPI avec les Licences de Biochimie et de Chimie.
- Depuis 2006 responsable pédagogique de l'année Licence 3 aménagée du Parcours IUP QEPI de l'Université des Sciences et Technologies de Lille.
- Dans le cadre de la réforme Licence-Master-Doctorat des universités en 2005-2006, participation à la mise en place du Master Professionnel Hygiène Sécurité Qualité Environnement (HSQE) du Parcours IUP QEPI.

## **II.2. Au Laboratoire ProBioGEM**

- Co-responsable de la maintenance technique du matériel chromatographique de la plate-forme de Chromatographie Liquide de Haute Performance de phase inverse (CLHP de PI).
- Depuis 2001 participation à la formation des étudiants stagiaires sur la plate-forme Chromatographie Liquide de Haute Performance de phase inverse.
- Responsable de la gestion de l'élimination des déchets d'origine chimique vers l'unité « Déchets » de l'université.

### **III. ACTIVITES D'ENCADREMENTS PEDAGOGIQUES**

J'ai commencé mes activités d'enseignement en tant que Moniteur d'Initiation à l'Enseignement Supérieur dans le département de Génie Biologique à l'IUT « A » de Lille I (1998-2001). En 2001, j'ai été recruté comme Maître de Conférences à l'UFR de Biologie de Lille I dans la formation IUP Qualité et Environnement des Productions Industrielles dirigée par le Pr. A. LEPRETRE.

La nature de mes enseignements, ainsi que les formations concernées sont :

- des cours de Biochimie et de Chimie Alimentaire en 1<sup>ère</sup> année du Parcours IUP QEPI (année L3) ;
- des cours dans l'UE « Mise en œuvre des protéases en milieux micro-aqueux » en 2<sup>ème</sup> année du Master Recherche Biotechnologie et Biologie Végétale (Resp. Pr P. DHULSTER) de l'Université des Sciences et Technologies de Lille ;
- des travaux dirigés de Biochimie en 1<sup>ère</sup> année du Parcours IUP QEPI (année L3) ;
- des travaux pratiques de Biochimie et de Chimie Alimentaire en 1<sup>ère</sup> année du Parcours IUP QEPI (année L3) ;
- des travaux pratiques de Biochimie en 2<sup>ème</sup> année de Master Professionnel Biologie Cellulaire et Moléculaire (Resp. Mme A. CHOTTEAU) de l'Université des Sciences et Technologies de Lille.

## **III.1. Enseignements réalisés en Licence 3 du Parcours IUP QEPI**

### **III.1.1. Cours, TD et TP de biochimie**

Ces enseignements sont destinés à des étudiants provenant d'une formation de chimie (IUT et BTS de chimie) et visent à apporter des connaissances sur la structure et les propriétés physico-chimiques des glucides, lipides et protides, ainsi que les techniques de dosage et de séparation de ces macromolécules.

Volume horaire : 20 H de cours, 15 H de TD et 18 H de TP

### **III.1.2. Cours et TP de chimie alimentaire**

Cet enseignement doit permettre aux étudiants de connaître :

- les principaux groupes alimentaires (céréales, fruits et légumes, œufs et ovoproduits, lait et produits laitiers, viandes et produits carnés) ;
- les procédés de transformations de ces groupes alimentaires dans les Industries AgroAlimentaires (malerie-brasserie, panification, produits extrudés, amidons, saccharose, réaction de Maillard, process salaison, mousses, émulsification... ) ;
- certaines techniques de dosage (dosage des sucres réducteurs dans le lait par la méthode de Bertrand ; dosage de l'azote protéique dans le lait par la méthode de Kjeldhal ; détermination de la qualité de matières grasses par la détermination des indices I<sub>i</sub>, I<sub>s</sub>, I<sub>e</sub>, I<sub>a</sub> ; détermination de la qualité des produits carnés et poissons (degré de conservation) par la détermination de l'ABVT ; ...)

Volume horaire : 20 H de cours et 21 H de TP

## **III.2. Enseignements réalisés en 2<sup>ème</sup> année du Master Recherche Biologie et Biotechnologie Végétale**

Cours sur la mise en œuvre de la pepsine immobilisée dans un réacteur de type Continuous-Stirred-Tank-Reactor dans le but de préparer en continu deux peptides opioïdes, au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine immobilisée, dans un système biphasique eau/octan-1-ol – butan-2-ol.

Volume horaire : 4 H de cours

## **III.3. Enseignements réalisés en 2<sup>ème</sup> année du Master Professionnel de Génie Cellulaire et Moléculaire de Lille I**

Cet enseignement concerne des Travaux pratiques d'extraction et de purification d'une enzyme, la  $\beta$ -galactosidase.

Ces travaux pratiques doivent permettre aux étudiants de mettre en œuvre quelques techniques d'extraction et de purification d'une enzyme intracellulaire, la  $\beta$ -galactosidase. Utilisation des techniques de sonication, de précipitation par le sulfate d'ammonium, de la chromatographie sur lit fixe (par échange d'ions) et sur lit expansé ; suivi de la procédure

d'extraction et de purification par SDS-PAGE et par la détermination de l'activité spécifique et du facteur de purification grâce aux dosages des protéines totales et de la  $\beta$ -galactosidase.

Volume horaire : 96 H de TP

### **III.4. Enseignements réalisés en 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> année du Master Professionnel Hygiène Sécurité Qualité Environnement de Lille I**

Encadrement de projets tuteurés en relation avec une problématique environnementale dans une entreprise de productions (tous secteurs confondus).

Exemple de projets encadrés :

- Mise en place de la question du tri des déchets
- Bruit: étude et mise en conformité
- Analyse de risques
- Etude nuisance sonore, étude circulation, amélioration de l'accueil sécurité
- Gestion des déchets microbiologiques, animaliers, cartons, normaux. Construction d'un local à poubelles
- ...

Volume horaire : 50 H de TD

### **III.5. Projets et stages**

- Responsable de deux unités d'enseignements incluant des projets tuteurés à réaliser en entreprise dans le cadre du Master Professionnel Hygiène Sécurité Qualité et Environnement du Parcours IUP QEPI.
- Suivi de stages en entreprise dans le cadre du Master Professionnel HSQE du Parcours IUP QEPI.

### **III.6. Jurys**

- Responsable de jury de l'année L3 du Parcours IUP QEPI.
- Membre de jury du Master Professionnel HSQE du Parcours IUP QEPI.
- Membre du jury des Licences de Biochimie et de Chimie de l'Université des Sciences et Technologies de Lille.

## **IV. ACTIVITES DE RECHERCHE**

**Etude de la sélectivité de la protéolyse enzymatique  
et de la séparation  
pour la production de peptides à activités biologiques**

## **IV.1. Contexte scientifique**

L'hydrolyse poussée, dite « extensive », des protéines a pris de l'importance depuis une vingtaine d'années avec la préparation d'hydrolysats peptidiques à destination des aliments et des boissons, de la formulation d'aliments infantiles hypoallergéniques (Cordle *et coll.*, 1991 et 1994 ; Kleinmann *et coll.*, 1991) et de la nutrition thérapeutique (Cordano et Cook, 1985). De nouvelles approches se sont également développées pour identifier et isoler, à partir de protéines agro-alimentaires, des peptides à activités biologiques. Ces peptides, purifiés ou au sein de fractions peptidiques, intéressent les industries pharmaceutiques et l'alimentation fonctionnelle (aliments-santé). Ainsi, des peptides ont été isolés à partir d'hydrolysats de caséines (Schlimme et Meisel, 1995), de protéines de soja (Gunther, 1979), de gluten (Zioudrou *et coll.*, 1979) etc.... Ces séquences peptidiques recouvrent de nombreuses activités telles que immunostimulantes (Werner *et coll.*, 1986), antithrombotiques (Bouhallab et Touzé, 1995), anti-microbiennes (Bellamy *et coll.*, 1993), opioïdes (Fiat et Jolles, 1989) etc...

Les sources protéiques le plus souvent utilisées pour préparer des hydrolysats peptidiques sont le lait, le soja et les céréales. Le sang des abattoirs représente pour l'industrie une source non conventionnelle attrayante. L'hémoglobine bovine est un substrat protéique exceptionnel par son homogénéité (le cruor, fraction globulaire du sang des abattoirs, comprend plus de 90 % d'hémoglobine) et sa définition ; l'hémoglobine est l'une des protéines les mieux caractérisées de la nature. Des études menées dans notre laboratoire sur la préparation à l'échelle pilote d'un hydrolysat pepsique d'hémoglobine bovine (Piot *et coll.*, 1988), et sur son utilisation pour la nutrition thérapeutique des prématurés (Léké, 1994), ont montré l'intérêt des hydrolysats peptidiques d'hémoglobine. Il a également été montré que l'hémoglobine bovine donne, après hydrolyse par la pepsine ou la trypsine, des peptides qui présentent des activités analgésiques, potentialisateur de la Bradykinine, opioïdes etc... (Ivanov *et coll.*, 1997). Au laboratoire, nous avons mis en évidence et caractérisé, dans un hydrolysats pepsique d'hémoglobine, de nombreux peptides actifs, tels que des peptides opioïdes (Piot *et coll.*, 1992a), hématopoïétiques (Vercaigne-Marko *et coll.*, 2000), anti-microbiens (Nedjar-Arroume *et coll.*, 2008).

La préparation de peptides à activités biologiques, ou de fractions peptidiques enrichies en ces peptides, à partir de protéines issues de l'agro-alimentaire, présente un grand intérêt industriel. Cependant, cet objectif est difficile à atteindre pour plusieurs raisons :

- l'hydrolyse des protéines comprend généralement de nombreuses étapes irréversibles consécutives et parallèles, c'est-à-dire que la composition de la population peptidique finale obtenue en milieu aqueux est sous contrôle cinétique ;
- de ce fait, l'obtention de peptides actifs ou de fractions peptidiques enrichies en ces peptides, à partir de telles protéines, est mal maîtrisée car ce sont fréquemment des peptides intermédiaires et leurs concentrations dans les hydrolysats protéiques finaux sont faibles ;
- de plus, l'isolement de tels peptides, à partir d'hydrolysats protéiques complexes, contenant souvent plus d'une centaine de peptides, doit être réalisé par des techniques de fractionnement et de purification lourdes mettant en œuvre plusieurs étapes chromatographiques.

Plusieurs équipes ont alors exploité les propriétés physico-chimiques (taille moléculaire, charge, hydrophobie) des peptides pour élaborer des procédés d'obtention sélectifs de peptides antithrombotiques (Bouhallab *et coll.*, 1992), opioïdes (Zhao et Piot, 1998a), antimicrobiens (Bargemann *et coll.*, 2000 et 2002) et antihypertensifs (Lapointe *et coll.*, 2006), au cours de l'hydrolyse enzymatique de protéines agroalimentaires.

La stratégie développée au cours de mes travaux s'inscrit dans cette démarche, en prenant en compte les propriétés hydrophobes de peptides présentant une activité opioïde et générés au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine. Des études concernant l'effet de l'environnement sur les cinétiques d'apparition de ces peptides, la

recherche d'un système de solvants organiques capable de les solubiliser au cours de l'hydrolyse par la pepsine insolubilisée ont permis la conception d'un réacteur ouvert pour préparer en continu deux peptides opioïdes dans un système biphasique eau/alcools.

Le chapitre suivant concerne des rappels bibliographiques sur la mise en évidence et l'isolement de peptides actifs à partir de l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine bovine, qui permettent d'appréhender le rôle de l'hémoglobine comme source potentielle de nombreux peptides actifs, puis sur l'évolution actuelle des recherches de procédés d'obtention sélective de peptides à activités biologiques à partir de protéines agroalimentaires.

## **IV.2. Rappels bibliographiques**

L'hémoglobine bovine a été choisie comme modèle protéique d'étude de la sélectivité de la protéolyse enzymatique et de la séparation pour la production de peptides à activités biologiques. Il semblait donc important de connaître les peptides à activités biologiques recensés jusqu'à aujourd'hui à partir de cette protéine, puis l'évolution actuelle des recherches en matière de nouveaux concepts d'obtention sélective de ces peptides actifs à partir de protéines agroalimentaires.

#### **IV.2.1. Mise en évidence et isolement de peptides à activités biologiques à partir de l'hémoglobine bovine**

De nombreux travaux ont été menés sur l'isolement de peptides actifs, à partir d'extraits d'organes de porcs ou de bovins (hypothalamus, cerveau...) (Schally *et coll.* 1978, Ivanov *et coll.* 1993). Les investigations se situent dans le cadre de la recherche d'un lien entre ces peptides et une fonction de l'organe, dans le but de produire un test pour évaluer la fonction de l'organe, après fractionnement des extraits contenant ces peptides actifs. Cette démarche a permis d'isoler et d'identifier de nombreux peptides à activités biologiques (analgésique, hématopoïétique, coronaro-constricteur, opioïde...).

Les séquences de certains peptides actifs ont été retrouvées dans les chaînes de l'hémoglobine bovine, et c'est Brantl *et coll.* (1986) qui ont isolé pour la première fois des peptides à activités biologiques à partir de l'hydrolyse enzymatique *in vitro* d'hémoglobine bovine.

Par la suite, d'autres équipes ont isolé des peptides actifs, à partir de l'hydrolyse *in vitro* de l'hémoglobine bovine (Piot *et coll.* 1992a, Ivanov *et coll.* 1997, Fogaça *et coll.*, 1999, Vercaigne-Marko *et coll.* 2000, Nedjar-Arroume *et coll.*, 2008).

Aujourd'hui, à partir de l'hémoglobine bovine, plus de 150 fragments ont été isolés, et les activités biologiques de plus de 40 d'entre eux ont été déterminées (A.A. Karelin *et coll.* 1995, Ivanov *et coll.* 1997, Nedjar-Arroume *et coll.*, 2008). Les études systématiques sur la reconnaissance de fragments actifs dans l'hémoglobine sont résumées dans les tableaux suivants. Ces tableaux décrivent : la séquence du peptide actif et la chaîne où cette séquence est retrouvée dans l'hémoglobine ; la source à l'origine de son premier isolement ; si le peptide a déjà été isolé à partir de l'hémoglobine bovine ; le mode d'hydrolyse *in vitro* (enzymatique ou chimique) utilisé pour son isolement. Dans ces tableaux, les séquences mises en évidence à ce jour ont été classées par grandes familles d'activités biologiques.

#### IV.2.1.1. Famille des kyotorphines

L'appellation "kyotorphines" vient de leur action sur la libération de la Met-Encéphaline, peptide opioïde.

Séquence	Localisation	Origine	Enzyme	Activité(s)	Références
YR Kyotorphine	$\alpha$ 140-141	Cerveau bovin	Non isolée <i>in vitro</i>	-Analgésique	H. Takagi <i>et coll.</i> (1979)
TSK	$\alpha$ 137-139	Glande pituitaire bovine	Non isolée <i>in vitro</i>	-Antigonadotrope	Orts <i>et coll.</i> (1978)
TSKY Néokyotorphine(1-4)	$\alpha$ 137-140	Cerveau d'écureuil Sibérien (type <i>Citellus undulatus</i> ) en hibernation <sup>a</sup>	Pepsine <sup>b</sup>	-Régule le potentiel dépendant Ca <sup>++</sup> /K <sup>+</sup> au sein des fibres cardiaques (chez la grenouille) <sup>a</sup> -Cytotoxique <sup>a</sup>	<sup>a</sup> Blishchenko <i>et coll.</i> (1996) <sup>b</sup> Zhao et Piot (1998a)
TSKYR Néokyotorphine	$\alpha$ 137-141	Cerveau bovin <sup>a</sup>	Non isolée <i>in vitro</i>	-Analgésique <sup>a</sup> -Induit l'éveil de l'état d'hibernation <sup>b</sup> -Régule le potentiel dépendant Ca <sup>++</sup> /K <sup>+</sup> au sein des fibres cardiaques (chez la grenouille) <sup>b</sup>	<sup>a</sup> Takagi <i>et coll.</i> (1982) <sup>b</sup> Vaskovsky <i>et coll.</i> (1990)

#### IV.2.1.2. Peptides potentialisateurs de la Bradykinine

Ces peptides sont appelés ainsi car ils permettent à la quinine un développement maximal de son efficacité, en se fixant spécifiquement à des récepteurs de la quinine stimulant sa production.

Séquence	Localisation	Origine	Enzyme	Activité(s)	Références
LANVST	$\alpha$ 129-134	Hémoglobine bovine	Pepsine	-Potentialise l'action de la quinine (test réalisé sur l'iléon de cobaye)	Piot <i>et coll.</i> (1992b)

#### IV.2.1.3. Peptide hypolipidémiant

Il est dit hypolipidémiant en relation avec la diminution conséquente du taux de lipides au niveau hépatique et de l'appareil digestif.

Séquence	Localisation	Origine	Enzyme	Activité(s)	Références
VVYP	$\beta$ 32-35	Hémoglobine bovine <sup>a</sup>	Protéase acide <sup>a</sup>	-Inhibe l'adsorption des graisses au niveau de l'appareil digestif <sup>b</sup> -Engendre l'activité de la lipase hépatique (EC 3.1.1.3) sur les triglycérides chez les souris <sup>a</sup>	<sup>a</sup> Kagawa <i>et coll.</i> (1996) <sup>b</sup> Kagawa <i>et coll.</i> (1998)

#### IV.2.1.4. Peptides hématopoïétiques

Ces peptides ont un rôle dans l'hématopoïèse, c'est-à-dire la formation des globules rouges du sang, qui a lieu principalement dans la moelle rouge des os. La majeure partie des peptides hématopoïétiques est issue d'une hydrolyse chimique de la chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine.

Séquence	Localisation	Origine	Enzyme	Activité(s)	Références
VLSAADKG VLSAADKGNVCAA VLSAADKGNVKAAWGK SAADKGNV KVGGHAAEYGAEA VGGHAAEYGAEAL VGGHAAEYGAEA AEYGAEAL GAEALER EALE LTAEKAAVTA LTAEKAAVT LTAEKAAV GKVKVDEVGGEALGRL EVGGEALGRL ARNFGKFF	$\alpha$ 1-8 $\alpha$ 1-13 $\alpha$ 1-16 $\alpha$ 3-10 $\alpha$ 16-28 $\alpha$ 17-29 $\alpha$ 17-28 $\alpha$ 22-29 $\alpha$ 25-31 $\alpha$ 27-30 $\beta$ 2-12 $\beta$ 2-11 $\beta$ 2-10 $\beta$ 16-31 $\beta$ 22-31 $\beta$ 115-122	Moelle rouge des os	Non isolée <i>in vitro</i>	-Restauration de la fonction hématopoïétique de souris soumises à des radiations ou traitées au 5-fluoro-uracile	Ivanov <i>et coll.</i> (1992)
LPGALSE KLHVDPE	$\alpha$ 76-82 $\beta$ 94-100	Hémoglobine bovine <sup>a</sup>	Protéase V8 de <i>Staphylococcus aureus</i> <sup>a</sup>	-Restauration de la fonction hématopoïétique de souris soumises à des radiations ou traitées au 5-fluoro-uracile <sup>b</sup>	<sup>a</sup> Vercaigne-Marko <i>et coll.</i> (2000) <sup>b</sup> Ivanov <i>et coll.</i> (1997)

#### IV.2.1.5. Peptides antimicrobiens

"Antimicrobien" définit une substance qui a la capacité de détruire ou d'inhiber la croissance des cellules bactériennes et des champignons.

Séquence	Localisation	Origine	Enzyme	Activité(s)	Références
VLSAADKGNVKA AWGKVGGHAAEYGAEALERM	$\alpha$ 1-32 <sup>c</sup>	Hémoglobine bovine	Pepsine	-Antimicrobien (bactéries <i>Micrococcus</i> . <i>Luteus</i> A270, <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Escherichia coli</i> )	<sup>a</sup> Froidevaux <i>et coll.</i> (2001) <sup>b</sup> Nedjar-Arroume <i>et coll.</i> (2006) <sup>c</sup> Nedjar-Arroume <i>et coll.</i> (2008)
VLSAADKGNVKA AWGKVGGHAAEYGAEAL	$\alpha$ 1-29 <sup>c</sup>				
VLSAADKGNVKA AWGKVGGHAAEYGAEA	$\alpha$ 1-28 <sup>c</sup>				
VLSAADKGNVKA AWGKVGGHAAEYGAE	$\alpha$ 1-27 <sup>c</sup>				
VLSAADKGNVKA AWGKVGGHAAE	$\alpha$ 1-23 <sup>a</sup>				
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEH	$\alpha$ 33-98 <sup>c</sup>				
LDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNF					
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEH	$\alpha$ 33-97 <sup>c</sup>				
LDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVN					
LSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHL	$\alpha$ 34-98 <sup>c</sup>				
DDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNF					
FPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLD	$\alpha$ 36-97 <sup>c</sup>				
DLPGALSELSDLHAHKLRVDPVN					
PTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDD	$\alpha$ 37-98 <sup>c</sup>				
LPGALSELSDLHAHKLRVDPVNF					
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEH	$\alpha$ 33-83 <sup>c</sup>				
LDDLPGALSEL					
LSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHL	$\alpha$ 34-83 <sup>c</sup>				
DDLPGALSEL					
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAAL	$\alpha$ 33-66 <sup>c</sup>				
LSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAAL	$\alpha$ 34-66 <sup>c</sup>				
FLSFPTTKTYFPHF	$\alpha$ 33-46 <sup>c</sup>				
FLSFPTTKTYFPH	$\alpha$ 33-45 <sup>c</sup>				
LSFPTTKTYFPHF	$\alpha$ 34-46 <sup>c</sup>				

### Peptides antimicrobiens (suite et fin)

Séquence	Localisation	Origine	Enzyme	Activité(s)	Références
FPTTKTYFPH PTTKTYFPHF VTLASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVSTVLTSKYR VTLASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVSTVL VTLASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVS STVLTSKYR TSKYR ARNFGKFFTPVLQADFQKVVAGVANALAHRYH FTPVLQADFQKVVAGVANALAHRYH QADFQKVVAGVANALAHRYH LAHRYH MLTAEKAAVTAFWGKVKVDEVGGEALGRL MLTAEKAAVTAF	$\alpha$ 36-45 <sup>c</sup> $\alpha$ 37-46 <sup>c</sup> $\alpha$ 107-141 <sup>b</sup> $\alpha$ 107-136 <sup>c</sup> $\alpha$ 107-133 <sup>c</sup> $\alpha$ 133-141 <sup>b</sup> $\alpha$ 137-141 <sup>b</sup> $\beta$ 114-145 <sup>c</sup> $\beta$ 121-145 <sup>c</sup> $\beta$ 126-145 <sup>b</sup> $\beta$ 140-145 <sup>c</sup> $\beta$ 1-30 <sup>c</sup> $\beta$ 1-13 <sup>c</sup>	Hémoglobine bovine	Pepsine	-Antimicrobien (bactéries <i>Micrococcus. Luteus</i> A270, <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Escherichia coli</i> )	<sup>a</sup> Froidevaux <i>et coll.</i> (2001) <sup>b</sup> Nedjar-Arroume <i>et coll.</i> (2006) <sup>c</sup> Nedjar-Arroume <i>et coll.</i> (2008)
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK	$\alpha$ 33-61	Intestin du tique Boophilus microplus	Non isolée <i>in vitro</i>	-Antimicrobien (bactéries Gram positive <i>M. luteus</i> , <i>S. epidermidis</i> ; champignons <i>C. albicans</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>S. cerevisiae</i> )	Fogaça <i>et coll.</i> (1999)

#### IV.2.1.6. Peptides coronaro-constricteurs

Ces peptides vont provoquer l'oblitération des artères coronaires du muscle cardiaque. Parmi ces trois peptides, aucun n'a été isolé à partir d'une hydrolyse, enzymatique ou chimique, de l'hémoglobine bovine *in vitro*.

Séquence	Localisation	Origine	Enzyme	Activité(s)	Références
VVYYPW	$\beta$ 32-36	Hypothalamus bovin	Non isolée <i>in vitro</i>	-Coronaro-constricteur	Barkhudaryan <i>et coll.</i> (1992)
VLSAADKGNVKA AWGKVGGHA VAGVANALAHRYH	$\alpha$ 1-21 $\beta$ 133-145	Hypothalamus bovin	Non isolée <i>in vitro</i>	-Coronaro-constricteur	Barkhudaryan <i>et coll.</i> (1993)

#### IV.2.1.7. Peptide stimulateur de la croissance bactérienne

Son nom est lié à son activité, c'est-à-dire la stimulation de la croissance des bactéries.

Séquence	Localisation	Origine	Enzyme	Activité(s)	Références
STADA	$\beta$ 48-52	Hémoglobine bovine	Pepsine	- Stimule la croissance des bactéries Gram négative	Zhao <i>et coll.</i> (1996)

#### IV.2.1.8. Famille des hémorphines

Les hémorphines sont des peptides présentant une activité opiacée et sont issues de l'hémoglobine bovine. Ces peptides actifs proviennent tous, par clivages successifs, du segment 31-40 de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine.

Nous avons distingué la source endogène (*in vivo*) ou exogène (*in vitro*) pour chaque hémorphine isolée.

Séquence	Localisation	Origine	Enzyme	Activité(s)	Références
LVVYPWTQRF (LVV- hémorphine-7)	$\beta$ 31-40	Hypothalamus porcin ( <i>in vivo</i> ) <sup>a</sup>	Pepsine ( <i>in vitro</i> ) <sup>b</sup>	-Fixation sur un récepteur opiacé spécifique <sup>c</sup> -Inhibition des contractions électriques de l'iléon de cobaye <sup>b</sup> -Inhibition de l'enzyme responsable de la conversion de l'Angiotensine I en Angiotensine II <sup>d</sup> -Coronaro-constricteur <sup>c</sup>	<sup>a</sup> Chang <i>et coll.</i> (1980) <sup>c</sup> Glämsta <i>et coll.</i> (1991) <sup>b</sup> Piot <i>et coll.</i> (1992a) <sup>c</sup> Barkhudaryan <i>et coll.</i> (1993) <sup>d</sup> Zhao <i>et coll.</i> (1994)
VVYPWTQRF (VV- hémorphine-7)	$\beta$ 32-40	Hypothalamus porcin ( <i>in vivo</i> ) <sup>a</sup>	Pepsine ( <i>in vitro</i> ) <sup>b</sup>	-Fixation sur un récepteur opiacé spécifique <sup>c</sup> -Inhibition des contractions électriques de l'iléon de cobaye <sup>b</sup> -Inhibition de l'enzyme responsable de la conversion de l'Angiotensine I en Angiotensine II <sup>d</sup>	<sup>a</sup> Chang <i>et coll.</i> (1980) <sup>c</sup> Glämsta <i>et coll.</i> (1991) <sup>b</sup> Piot <i>et coll.</i> (1992a) <sup>d</sup> Zhao <i>et coll.</i> (1994)
LVVYPWTQR (LVV- hémorphine-6)	$\beta$ 31-39	Glande pituitaire humaine ( <i>in vivo</i> ) <sup>a</sup>	Non isolée <i>in vitro</i>	-Fixation sur un récepteur opiacé spécifique <sup>a</sup> -Inhibition des contractions électriques de l'iléon de cobaye <sup>a</sup> -Inhibition de l'enzyme responsable de la conversion de l'Angiotensine I en Angiotensine II <sup>b</sup>	<sup>a</sup> Glämsta <i>et coll.</i> (1991) <sup>b</sup> Lantz <i>et coll.</i> (1991)
VVYPWTQR (VV- hémorphine-6)	$\beta$ 32-39	Hypothalamus bovin ( <i>in vivo</i> ) <sup>a</sup>	Non isolée <i>in vitro</i>	-Fixation sur un récepteur opiacé spécifique <sup>b</sup> -Coronaro-constricteur <sup>c</sup>	<sup>c</sup> Barkhudaryan <i>et coll.</i> (1992) <sup>a</sup> Galoyan (1997) <sup>b</sup> Nyberg <i>et coll.</i> (1997)

## Hémorphines (suite)

Séquence	Localisation	Origine	Enzyme	Activité(s)	Références
LVVYPWTQR (LVV-hémorphine-6)	β 31-39	Glande pituitaire humaine ( <i>in vivo</i> ) <sup>a</sup>	Non isolée <i>in vitro</i>	-Fixation sur un récepteur opiacé spécifique <sup>a</sup> -Inhibition des contractions électriques de l'iléon de cobaye <sup>a</sup> -Inhibition de l'enzyme responsable de la conversion de l'Angiotensine I en Angiotensine II <sup>b</sup>	<sup>a</sup> Glämsta <i>et coll.</i> (1991) <sup>b</sup> Lantz <i>et coll.</i> (1991)
VVYPWTQR (VV-hémorphine-6)	β 32-39	Hypothalamus bovin ( <i>in vivo</i> ) <sup>a</sup>	Non isolée <i>in vitro</i>	-Fixation sur un récepteur opiacé spécifique <sup>b</sup> -Coronaro-constricteur <sup>c</sup>	<sup>c</sup> Barkhudaryan <i>et coll.</i> (1992) <sup>a</sup> Galoyan (1997) <sup>b</sup> Nyberg <i>et coll.</i> (1997)
YPWTQR (hémorphine-6)	β 34-39	Glande pituitaire humaine ( <i>in vivo</i> ) <sup>a</sup>	Non isolée <i>in vitro</i>	-Fixation sur un récepteur opiacé spécifique <sup>b</sup> -Inhibition des contractions électriques de l'iléon de cobaye <sup>a</sup> -Inhibition de l'enzyme responsable de la conversion de l'Angiotensine I en Angiotensine II <sup>c</sup>	<sup>a</sup> Glämsta <i>et coll.</i> (1991) <sup>c</sup> Lantz <i>et coll.</i> (1991) <sup>b</sup> Nyberg <i>et coll.</i> (1997)
LVVYPWTQ (LVV-hémorphine-5)	β 31-38	Cerveau bovin ( <i>in vivo</i> ) <sup>a</sup>	Pepsine ( <i>in vitro</i> ) <sup>b</sup>	-Inhibition des contractions électriques de l'iléon de cobaye <sup>b</sup> -Inhibition de l'enzyme responsable de la conversion de l'Angiotensine I en Angiotensine II <sup>b</sup>	<sup>a</sup> Karelin <i>et coll.</i> (1994) <sup>b</sup> Zhao et Piot (1997)

## Hémorphines (suite et fin)

Séquence	Localisation	Origine	Enzyme	Activité(s)	Références
VVYPWTQ (VV-hémorphine-5)	β 32-38	Hypothalamus bovin ( <i>in vivo</i> ) <sup>a</sup>	Pepsine ( <i>in vitro</i> ) <sup>b</sup>	-Fixation sur un récepteur opiacé spécifique <sup>b</sup> -Inhibition des contractions électriques de l'iléon de cobaye <sup>b</sup> -Inhibition de l'enzyme responsable de la conversion de l'Angiotensine I en Angiotensine II <sup>b</sup> -Cytotoxique <sup>c</sup> -Coronaro-constricteur <sup>d</sup>	<sup>a</sup> Barkhudaryan <i>et coll.</i> (1993) <sup>a</sup> Karelín <i>et coll.</i> (1994) <sup>c</sup> Blishchenko <i>et coll.</i> (1996) <sup>b</sup> Zhao et Piot (1997)
YPWTQ (hémorphine-5)	β 34-38	Hémoglobine bovine ( <i>in vitro</i> ) <sup>a</sup>	Pepsine ( <i>in vitro</i> ) <sup>a</sup> Cathepsine ( <i>in vitro</i> ) <sup>a</sup>	-Inhibition des contractions électriques de l'iléon de cobaye <sup>a</sup> -Analgésique (effet naloxone) <sup>b</sup>	<sup>a</sup> Brantl <i>et coll.</i> (1985) <sup>b</sup> Davis <i>et coll.</i> (1989)
LVVYPWT (LVV-hémorphine-4)	β 31-37	Hypothalamus bovin ( <i>in vivo</i> ) <sup>a</sup>	Non isolée <i>in vitro</i> Protéases ( <i>in vivo</i> ) <sup>a</sup>	-Inhibition de l'enzyme responsable de la conversion de l'Angiotensine I en Angiotensine II <sup>b</sup> -Coronaro-constricteur <sup>a</sup> -Induit convulsions <sup>c</sup> -Inhibition des enzymes responsables de la dégradation des encéphalines <sup>c</sup>	<sup>a</sup> Barkhudaryan <i>et coll.</i> (1992) <sup>c</sup> Nishimura et Hazato (1993) <sup>b</sup> Nyberg <i>et coll.</i> (1997)
VVYPWT (VV-hémorphine-4)	β 32-37	Moelle osseuse de porcine <sup>a</sup>	Non isolée <i>in vitro</i>	-Immuno-modulateur <sup>a</sup> -Coronaro-constricteur <sup>b</sup>	<sup>a</sup> Fonina <i>et coll.</i> (1991) <sup>b</sup> Barkhudaryan <i>et coll.</i> (1992)
YPWT (hémorphine-4)	β 34-37	Hémoglobine bovine ( <i>in vitro</i> ) <sup>a</sup>	Pepsine ( <i>in vitro</i> ) <sup>a</sup> Cathepsine ( <i>in vitro</i> ) <sup>a</sup>	-Fixation sur un récepteur opiacé spécifique <sup>b</sup> -Inhibition des contractions électriques de l'iléon de cobaye <sup>a</sup> -Analgésique (effet naloxone) <sup>c</sup>	<sup>a</sup> Brantl <i>et coll.</i> (1985) <sup>c</sup> Davis <i>et coll.</i> (1989) <sup>b</sup> Barkhudaryan <i>et coll.</i> (1993)

#### IV.2.1.9. Autres activités

Séquence	Localisation	Origine	Enzyme	Activité(s)	Références
FLSFPTTKTYFPHF	$\alpha$ 33-46 (1)	Hypothalamus porcin	Non isolée <i>in vitro</i>	-Libération de la corticotropine	Schally <i>et coll.</i> (1978)
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQV? FLSFPTTKTYFPHFDLSH? FLSFPTTK?	$\alpha$ 33-55? (1) $\alpha$ 33-50? (1) $\alpha$ 33-40? (1)	Cervelet humain	Non isolée <i>in vitro</i>	-Marqueur de la maladie d'Alzheimer	Slemmon <i>et coll.</i> (1994)

"?" désigne la non connaissance du ou des résidus d'acides aminés en position C-terminale du peptide actif

(1) ces peptides comportent une partie de la séquence du peptide antimicrobien  $\alpha$  33-61 isolé dans l'intestin du tique *B. microplus* mais leurs activités antimicrobiennes n'ont pas encore été reconnues.

#### **IV.2.2. Evolution actuelle des recherches de procédés d'obtention sélective de peptides à activités biologiques à partir de protéines agroalimentaires**

Ces stratégies de recherche reposent fondamentalement sur la prise en compte des propriétés physico-chimiques des peptides actifs, générés au cours de l'hydrolyse enzymatique de protéines agroalimentaires, pour la conception de procédés sélectifs d'obtention de ces peptides.

Bouhallab *et coll.* (1992) ont exploité la taille moléculaire des peptides générés au cours de l'hydrolyse du caséinomacropéptide de la caséine  $\kappa$  par la trypsine dans le but de préparer en continu des peptides présentant une activité antithrombotique dans un réacteur ouvert couplé à une membrane d'ultrafiltration (UF). Ce travail a constitué le premier exemple d'application d'une préparation sélective en continu de peptides actifs au cours de l'hydrolyse enzymatique d'une protéine agroalimentaire. En effet la réaction enzymatique, réalisée à pH 7 sur le caséinomacropéptide, conduit à la formation d'un peptide de 6000 Dalton et de quatre peptides antithrombotiques dont la taille est comprise entre 500 et 780 Da. La membrane d'ultrafiltration utilisée possède un seuil de coupure de 3000 Da.

La stratégie de recherche employée pour l'obtention sélective de ces peptides actifs a reposé sur l'étude du mécanisme d'hydrolyse du caséinomacropéptide par la trypsine dans un réacteur à membrane ouvert et sur l'étude de l'impact de l'environnement de la réaction sur les cinétiques d'apparition des peptides actifs (Martin-Orue *et coll.*, 1999). L'analyse des populations peptidiques dans les perméats et les réténats pendant le déroulement du procédé a permis de préciser les effets de la variation de la concentration en enzyme et en substrat et du débit d'alimentation en substrat sur la sélectivité de production des peptides antithrombotiques. Cette analyse a montré que la concentration en caséinomacropéptide et en produits de la réaction, ainsi que la sélectivité de séparation de la membrane d'ultrafiltration, permettent d'orienter certaines coupures de liaisons peptidiques par la trypsine vers l'obtention des peptides actifs (Martin-Orue *et coll.*, 1999). Enfin, ces études ont permis la conception d'un réacteur ouvert couplé à une membrane d'UF pour la préparation sélective et en continu de peptides actifs au cours de l'hydrolyse trypsique du caséinomacropéptide.

Plusieurs équipes ont travaillé sur l'obtention sélective de peptides antimicrobiens (Bargeman *et coll.*, 2000 et 2002) et antihypertensifs (Lapointe *et coll.*, 2006 ; Poulin *et coll.*, 2006), à partir de l'hydrolyse enzymatique de protéines laitières (lactoferrine, caséine  $\alpha_2$ ,  $\beta$ -lactoglobuline). Les travaux rapportent la conception d'un procédé d'électrofiltration qui exploite la taille moléculaire et la charge de ces peptides en combinant une membrane de filtration et un champ électrique. Les forces mises en jeu dans la séparation sélective des peptides proviennent de la génération d'un gradient de pression, lié à la présence de la membrane, et d'un gradient de potentiel électrique de part et d'autre de la membrane. Le mode de filtration (par ultrafiltration ou par nanofiltration), lié à la nature de la membrane, ainsi que les paramètres opérationnels tels que la pression transmembranaire, le pH et la vitesse d'alimentation des hydrolysats sont apparus comme les facteurs les plus influents sur la sélectivité d'obtention de peptides cationiques antimicrobiens (Bargeman *et coll.*, 2002) et anti-hypertensifs (Lapointe *et coll.*, 2006).

Enfin, des recherches ont visé à exploiter les propriétés hydrophobes de certains peptides afin de permettre leur solubilisation dans un solvant organique non miscible à l'eau. Le partage de tels peptides, issus d'hydrolysats protéiques complexes, entre deux phases non miscibles, constitue une étape complémentaire rapide dans la procédure d'obtention sélective de ces biomolécules.

Aubes-Dufau *et coll.* (1995) ont utilisé le butan-2-ol pour extraire une fraction contenant un peptide amer, à partir d'un hydrolysate pepsique d'hémoglobine bovine obtenu par ultrafiltration. Ce peptide a ensuite été isolé par chromatographie de filtration sur gel puis par chromatographie liquide haute performance de phase inverse. Ce peptide amer a été identifié en déterminant sa composition en acides aminés par la méthode Picotag<sup>®</sup>. Il correspond au fragment 32-40 de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine.

Aubes-Dufau et Combes (1997) ont ensuite testé différentes protéases (subtilisine, aspergillopepsine, papaïne) pour la production de peptides amers à partir de l'hémoglobine bovine. L'extraction biphasique par le butanol-2-ol a permis d'isoler une fraction peptidique issue de l'hydrolyse par l'aspergillopepsine et une autre fraction issue de l'hydrolyse par la subtilisine. Chacune de ces fractions contenait un peptide hydrophobe et amer (Aubes-Dufau et Combes, 1997). Après isolement par filtration sur gel à moyenne pression et caractérisation de la composition en acides aminés par la méthode Picotag<sup>®</sup>, la première fraction s'est révélée contenir le peptide amer 32-39 de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine, et l'autre fraction contenait le peptide amer 32-36 également de la chaîne  $\beta$  (Aubes-Dufau et Combes, 1997).

Zhao et Piot (1998a) ont testé différentes classes de solvants organiques non miscibles à l'eau (alcools aliphatiques, cétone, éther, ester et hydrocarbures) pour l'extraction de deux hémorphines, issues de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine : LVV-hémorphine-7 (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe ; fragment 31-40) et VV-hémorphine-7 (Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe ; fragment 32-40). Ces deux peptides hydrophobes ont été isolés à partir d'un hydrolysate pepsique à pH 2 produit dans un réacteur enzymatique à membranes minérales (Zhao et Piot, 1998a) : l'ultrafiltrat peptidique a ensuite subi une décoloration par adsorption de l'hème sur de la magnésie. Les alcools aliphatiques, et notamment le butan-1-ol et le butan-2-ol ont montré la meilleure sélectivité vis-à-vis de l'extraction biphasique de ces deux hémorphines. L'isolement de ces peptides opioïdes a été réalisé respectivement par chromatographie haute performance de filtration sur gel puis en phase inverse et enfin ces peptides ont été caractérisés par spectrométrie de masse en mode MALDI (Zhao et Piot, 1998a).

Ces études mettent clairement en évidence les propriétés hydrophobes des deux hémorphines et l'exploitation de ces propriétés en utilisant des solvants non miscibles à l'eau dans un objectif de les extraire sélectivement.

### IV.2.3. Références bibliographiques

- Antonov, V.K.** (1977). New data on pepsin mechanism and specificity.  
*Adv. Exp. Med. Biol.* 95, 179-198
- Aubes-Dufau, I. et Combes, D.** (1997). Effect of different proteases on bitterness of hemoglobin hydrolysates.  
*Appl. Biochem. and Biotechnol.* 67, 127-138
- Aubes-Dufau, I., Capdevielle, J., Series, J.L. et Combes, D.** (1995). Bitter peptide from hemoglobin hydrolysate : isolation and characterization.  
*FEBS Lett.* 364, 115-119
- Bargeman, G., Dohmen-Speelmans, M., Recio, I., Timmer, M. et Van Der Host, C.** (2000). Selective isolation of cationic amino acids and peptides by electro-membrane filtration.  
*Lait* 80, 175-185
- Bargeman, G., Koops, G.-H., Houwing, J., Breebaart, I., Van Der Horst, H.C. et Wessling, M.** (2002). The development of electro-membrane filtration for the isolation of bioactive peptides: The effect of membrane selection and operating parameters on the transport rate.  
*Desalination* 149, 369-374
- Barkhudaryan, N.A., Kellermann, J., Galoyan, A.A. et Lottspeich, F.** (1993) High molecular weight aspartic endopeptidase generates a coronaro-constrictory peptide from the  $\beta$ -chain of hemoglobin.  
*FEBS Lett.* 329, 215-218.
- Barkhudaryan, N.A., Oberthuer, W., Lottspeich, F. et Galoyan, A.** (1992). Structure of hypothalamic coronaro-constrictory peptide factors.  
*Neurochem. Res.* 17, 1217-1221.
- Bellamy, W., Wakabayashi, H., Takase, M., Kawase, K., Shimamura, S. et Tomita, M.** (1988). Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of lactoferrin B.  
*Med. Microbiol. Immunol.* 182, 97-105
- Bigelow, C.C.** (1967). On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure.  
*J. Theor. Biol.* 16, 187-211
- Blishchenko, E. Yu, Mernenko, O.A., Mirkina, I.I., Satpaev, D.K., Ivanov, V.S., Tchikin, L.D., Ostrovsky, A.G., Karelin, A.A. et Ivanov, V.T.** (1996). Tumor cell cytolysis mediated by valorphin, an opioid-like fragment of hemoglobin  $\beta$ -chain.  
*Peptides* 18, 79-85.
- Bouhallab, S., Molle, D. et Leonil, J.** (1992). Tryptic hydrolysis of caseino-macropeptide in membrane reactor : preparation of bioactive peptides.  
*Biotechnol. Lett.* 14, 805-810.

- Bouhallab, S. et Touzé, C.** (1995). Continuous hydrolysis of caseino-macropéptide in a membrane reactor : kinetic study and gram-scale production of antithrombotic peptides.  
*Lait* 75, 251-258
- Brantl, V., Gramsch, Ch., Lottspeich, F., Mertz, R., Jaeger, K.H. et Herz, A.** (1986). Novel opioid peptides derived from hemoglobin : hemorphins.  
*Eur. J. Pharmacol.* 106, 213-214
- Chang, R.C.C., Huang, W.Y., Redding, T.W., Arimura, A., Coy, D.H. et Schally, A.V.** (1980). Isolation and structure of several peptides from porcine hypothalami.  
*Biochim. Biophys. Acta.* 625, 266-273.
- Cordano, A. et Cook, D.A.** (1985). Preclinical and clinical evaluation with casein hydrolysate products.  
Dans « Nutrition for special needs in infancy », chap.9, 119-130  
*F. Lifshitz ed., Marcel Dekker, Inc., New-York*
- Cordle, C.T., Mahmoud, M.I. et Moore, V.** (1991). Immunogenicity evaluation of protein hydrolysates for hypoallergenic infant formulas.  
*J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 13, 270-276
- Davis, T.P., Gillepsie, T.J. et Porreca, F.** (1989). Peptide fragments derived from the  $\beta$ -chain of hemoglobin (hemorphins) are centrally active *in vivo*.  
*Peptides* 10, 747-751.
- De Lillo, A., Quiros, L.M. et Fierro, J.F.** (1997). Identification of a lactoferrin-binding protein in *Prevotella nigrescens*.  
*FEMS Microbiol. Lett.* 150, 89-94
- Fiat, A.M. et Jolles, P.** (1989). Caseins of various origins and biologically active peptides and oligosaccharides : structure and physiological aspects.  
*Mol. Cell. Biochem.* 87, 5-30
- Fogaça, A.C., da Silva, P.I., Teresa, Jr.M., Miranda, M., Bianchi, A.G., Miranda, A., Ribolla, P.E.M. et Daffre, S.** (1999). Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*.  
*J. Biol. Chem.* 274, 25330-25334.
- Fonina, L.A., Gur'yanov, S.A. et Nazimov, I.V.** (1991). The structure of two myelopeptides influencing the pain sensitivity.  
*Dokl. AN SSSR* 319, 755-757.
- Froidevaux, R., Krier, F., Nedjar-Arroume, N., Vercaigne-Marko, D., Kosciarz, E., Ruckebusch, C., Dhulster, P. et Guillochon, D.** (2001). Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment.  
*FEBS Lett.* 491, 159-163
- Galoyan, A.A.** (1997). Primary structure and biological activity of hemoglobin-related hypothalamic peptides.  
*Biopolymers* 43, 135-137.

**Glämsta, E.V., Marklund, A., Hellman, U., Wernstedt, C., Terenius, L. et Nyberg, F.** (1991). Isolation and characterization of a hemoglobin-derived opioid peptide from the human pituitary gland.

*Regul. Pept.* 34, 169-179.

**Gunter, R.C.** (1979). Chemistry and characteristics of enzyme-modified whipping proteins.

*J. Am. Oil Chemists Soc.* 56, 345-349

**Gururaj Rao, A.** (1999). Conformation and Antimicrobial Activity of Linear Derivatives of Tachyplesin Lacking Disulfide Bonds.

*Archives of Biochemistry and Biophysics* 361, 127-134

**Ivanov, V.T., Karelin, A.A., Karelina, E.V., Ul'yashin, V.V., Vaskovsky, B.V., Mikhaleva, I.I., Nazimov, I.V., Grishina, G.A., Khavinson, V. Kh., Morosov, V.G. et Mikhaltsov, A.N.** (1992). Peptides, Chemistry and Biology : total screening of bovine brain and bone marrow extracts for active peptides.

*Proceedings of the Twelfth American Peptide Symposium, J.A. Smith and J.E. Rivier (Eds), ESCOM, Leiden : pp 939-941.*

**Ivanov, V.T., Karelin, A.A., Mikhaleva, I.I., Vaskovsky, B.V., Sviryaev, V.I. et Nazimov, I.V.** (1993). Isolation, structure and properties of new endogenous peptides. pp 677-701.

**Ivanov, V.T., Karelin, A.A., Philippova, M.M., Nazimov, I.V. et Pletnev, V.Z.** (1997). Hemoglobin as a source of endogenous bio-active peptides: the concept of tissue-specific peptide pool.

*Biopolymers* 43, 171-178

**Jack, R.W., Tagg, J.R. et Ray, B.** (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria.

*Microbiol. Rev.* 59, 171-200

**Kagawa, K., Matsutaka, H., Fukuhama, C., Fujino, H. et Okuda, H.** (1998). Suppressive effect of globin digest on postprandial hyperlipidemia in male volunteers.

*Human Nutrition and Metabolism.* pp56-60.

**Kagawa, K., Matsutaka, H., Fukuhama, C., Watanaka, Y. et Fujino, H.** (1996). Globin digest, acidic protease hydrolysate, inhibits dietary hyperglyceridemia and Val-Val-Tyr-Pro, one of its constituents, possesses most superior effect.

*Life Sci.* 58, 1745-1755.

**Karelin, A.A., Philippova, M.M., Karelina, E.V. et Ivanov, V.T.** (1994). Isolation of endogenous hemorphin-related hemoglobin fragments from bovine brain.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202, 410-415.

**Karelin, A.A., Philippova, M.M. et Ivanov, V.T.** (1995). Proteolytic degradation of hemoglobin in erythrocytes leads to biologically active peptides.

*Peptides* 16, 693-697.

**Kleinmann, R.E., Bahna, S., Powel, G.F. et Sampson, H.A.** (1991). Use of infant formulas in infants with cow milk allergy.

*Pediatr. Allergy Immunol.* 4, 146-155

**Kosciarz, E., Rofidal, F., Dossou-Yovo, I., Vercaine-Marko, D., Nedjar-Arroume, N., Dhulster, P. et Guillochon, D.** (1998). Fractionation at pilot-plant scale of an haemoglobin hydrolysate by strong anionic exchange chromatography : application to the preparation of an amphiphilic peptide.

*J. Chem. Technol. Biotechnol.* 71, 35-42

**Lalassidin, G. et Sjaberg, L.B.** (1978). Two new methods of debittering protein hydrolysates and a fraction of hydrolysates with exceptionally high content of essential amino acids.

*J. Agric. Food Chem.* 26, 742-749

**Lantz, I., Glämsta, E.L., Talbäck, L. et Nyberg, F.** (1991). Hemorphins derived from hemoglobin have an inhibitory action on angiotensin converting enzyme activity.

*FEBS Lett.* 287 : 39-41.

**Lapointe, J.F., Gauthier, S.F., Pouliot, Y. et Bouchard, C.** (2006). Selective separation of cationic peptides from a tryptic hydrolysate of  $\beta$ -lactoglobulin by electrofiltration.

*Biotechnol. Bioeng.* 94, 223-233

**Léké, A., Piot, J.M., Canarelli, J.P., Ricard, Y., Postel, J.P., Krim, G., Guillochon, D., Risbourg, R., Clabaut C. et Boulfroy A.** (1990). Comparaison de l'absorption intestinale de deux hydrolysats de protéines à base de caséine et d'hémoglobine bovine chez le porc éveillé.

*Nutr. Clin. Metab.* 4, 223-229

**Lemieux, L. et Simard, R.E.** (1991). Bitter flavour in dairy products. I: A review of the factors likely to influence its development, mainly in cheese manufacture.

*Lait* 71, 599-636

**Lovsin-Kukman, I., Zelenik-Blatnik, M. et Abram, V.** (1995). Isolation of low-molecular-mass hydrophobic bitter peptides in soybean protein hydrolysates by reversed-phase high-performance liquid chromatography.

*J. Chromatogr. A.* 704, 113-120

**Martin-Orue, C., Henry, G. et Bouhallab, S.** (1999). Tryptic hydrolysis of  $\kappa$ -caseinomacropéptide: Control of the enzymatic reaction in a continuous membrane reactor.

*Enzyme and Microbial Technology* 24, 173-180

**Nakanishi, K., Sakiyama, T. et Imamura, K.** (2001). On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon.

*J. Biosci. Bioeng.* 91, 233-244

**Nedjar-Arroume, N., Dubois-Delval, Miloudi, K., Daoud, R., Krier, F., Kouach, M., Briand, G. et Guillochon, D.** (2006). Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin.

*Peptides* 27, 2082-2089

**Nedjar-Arroume, N., Dubois-Delval, V., Yaba-Adje E., Traisnel, J., Krier, F., Mary, P., Kouach, M., Briand, G. et Guillochon, D.** (2008). Bovine haemoglobin : an attractive source of antibacterial peptides.

*Peptides, sous presse*

**Nishimura, K. et Hazato, T.** (1993). Isolation and identification of an endogenous inhibitor of enkephalin-degrading enzymes from bovine spinal cord.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 713-719.

**Nyberg, F., Sanderson, K. et Glämsta, E.L.** (1997). The hemorphins : a new class of opioid peptides derived from the blood protein hemoglobin.  
*Biopolymers* 43, 147-156.

**Orts, R.J., Liao, T.H., Sartin, J.L. et Bruot, B.** (1978). Purification of a tripeptide with anti-reproductive properties isolated from bovine pineal glands.  
*Physiologist* 21, 87.

**Piot, J.M., Guillochon, D., Lecomte, D. et Thomas, D.** (1988). Application of ultrafiltration to the preparation of defined hydrolysates of bovine haemoglobin.  
*J. Chem. Tech. Biotechnol.* 42, 147-156

**Piot, J.M., Zhao, Q., Guillochon, D., Ricart, G. et Thomas, D.** (1992a). Isolation et characterization of two opioid peptides from a bovine hemoglobin peptic hydrolysate.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 101-110

**Piot, J.M., Zhao, Q., Guillochon, D., Ricart, G. et Thomas, D.** (1992b). Isolation and characterisation of a bradykinin-potentiating peptide from bovine peptic hemoglobin hydrolysate.  
*FEBS Lett.* 299, 75-79.

**Poulin, J-F., Araya-Farias, M., Amiot, J. et Bazinet, L.** (2006). Separation of bioactive peptides by electro dialysis with ultrafiltration membrane  
*Desalination* 200, 620

**Sarkar, D. et Chattoraj, D.K.** (1996). Kinetics of Desorption of Proteins from the Surface of Protein-Coated Alumina by Various Desorbing Reagents.  
*J. Colloid Interface Sci.* 178, 606-613

**Schally, A.V., Huang, W.Y., Redding, T.W., Coy, D.H., Chihara, K., Chang, R.C.C., Raymond, V. et Labrie, F.** (1978). Isolation, structural elucidation and synthesis of a tetradecapeptide with in vitro ACTH-releasing activity corresponding to residues 33-46 of the  $\alpha$ -chain of porcine hemoglobin.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82, 582-588.

**Schlimme, E. et Meisel, H.** (1995). Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects.  
*Die Nahrung* 39, 1-20

**Sessa, G., Freer, J.H., Colacicco, G. et Weissmann, G.** (1969). Interaction of a Lytic Polypeptide, Melittin, with Lipid Membrane Systems.  
*J. Biol. Chem.* 244, 3575-3582

**Shin, H.D.** (1970). Competitive inhibition of pepsin by carboxylic acids.  
*Bull. Chem. Soc. Jpn.* 43, 3472-3474

**Slemmon, J.R., Hughes, C.M., Campbell, G.A. et Flood, D.G.** (1994). Increased levels of hemoglobin-derived and other peptides in Alzheimer's disease cerebellum.  
*J. Neurosci.* 14 : 2225-2235.

**Takagi H., Shiomi, H., Fukui, K., Hayashi, K., Kiso, Y., Kitagawa, K.** (1982). Isolation of a novel analgesic pentapeptide, neo-kyotorphin, from bovine brain.  
*Life Sci.* 31 : 1733-1736.

**Takagi, H., Shiomi, H., Ueda, H. et Amano, H.** (1979). A novel analgesic dipeptide from bovine brain is a possible Met-enkephalin releaser.  
*Nature* 5737 : 410-412.

**Tang, J.** (1965). Competitive inhibition of pepsin by aliphatic alcohols.  
*J. Biol. Chem.* 240, 3810-3815

**Vaskosky, B.V., Ivanov, V.T., Mikhaleva, I.I., Kolaeva, S.G., Koboz, S.G., Yu, M., Svieryaev, V.I., Ziganshin, R.H., Sukhova, G.S. et Ignatiev, D.A.** (1990). Neokyotorphin from the brain of hibernating ground squirrels can participate in heart activation and arousal from hibernation.  
*Peptides, Chemistry, Structure et Biology, J.E. Rivier et G.R. Marshall, Eds Leiden ESCOM.* pp 302-304.

**Vercaigne-Marko, D., Kosciarz, E., Nedjar-Arroume, N. et Guillochon, D.** (2000). Improvement of Staphylococcus aureus-V8-protease hydrolysis of bovine haemoglobin by its adsorption on a solid phase in the presence of SDS : peptide mapping and obtention of two haemopoietic peptides.  
*Biotechnol. Appl. Biochem.* 31, 127-134

**Werner, G.H., Floc'h, F., Migliore-Samour, D. et Jolles, P.** (1986). Immunomodulating peptides.  
*Experientia* 42, 521-531

**Zhao, Q ;, Sannier, F., Garreau, I., Guillochon, D. et Piot, J.M.** (1994). Inhibition and inhibition kinetics of angiotensin converting enzyme activity by hemorphins, isolated from a peptic bovine hemoglobin hydrolysate.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204, 216-223.

**Zhao, Q., Piot, J.M., Gauthier, V. et Cottenceau, G.** (1996). Isolation and characterization of a bacterial growth-stimulating peptide from a peptic bovine hemoglobin hydrolysate.  
*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 778-784.

**Zhao, Q. et Piot, J.M.** (1997). Investigation of inhibition angiotensin-converting enzyme (ACE) activity and opioid activity of two hemorphins, LVV-hemorphin-5 and VV-hemorphin-5, isolated from a defined peptic hydrolysate of bovine hemoglobin.  
*Neuropeptides* 31, 147-153.

**Zhao, Q. et Piot, J.M.** (1998a). Organic solvent extraction associated with HPLC in the preparation of hemorphins from bovine hemoglobin peptic hydrolysate.  
*Prep. Biochem. Biotechnol.* 28, 61-78

**Zhao, Q. et Piot, J.M.** (1998b). Neokyotorphin formation and quantitative evolution following human hemoglobin hydrolysis with Cathepsin D.  
*Peptides* 19, 759-766.

**Zioudrou, C., Streaty, R.A. et Klee, W.A.** (1979). Opioid peptides derived from food proteins. The exorphins.  
*J. Biol. Chem.* 10, 2446-2449

## **IV.3. Synthèse des travaux réalisés**

### IV.3.1. Objectif de nos recherches

La préparation de peptides à activités biologiques ou de fractions peptidiques enrichies en ces peptides présente un intérêt en industries alimentaires, en pharmacologie, dans les domaines des « aliments-santé », de l'hygiène et de la sécurité alimentaire (comme ingrédients stabilisant des préparations alimentaires).

Cet objectif est difficile à atteindre car de tels peptides actifs sont fréquemment des peptides intermédiaires et leurs concentrations dans les hydrolysats protéiques finaux sont faibles. De plus, leur isolement nécessite souvent plus d'une étape de fractionnement et de purification, ce qui entraîne un coût élevé de l'obtention de ces peptides actifs à l'échelle préparative.

Nous avons conservé l'hémoglobine bovine, malgré la conjoncture défavorable aux protéines d'origine animale, pour réaliser nos recherches car cette protéine est un modèle dans notre laboratoire pour plusieurs raisons :

- sa structure est bien définie ;
- c'est une protéine abondante. Elle est disponible en grosse quantité même au niveau préparatif à l'échelle pilote ;
- c'est un substrat protéique exceptionnel par son homogénéité ;
- elle contient de nombreuses séquences peptidiques à activités biologiques qui nous servent de peptides marqueurs.

L'objectif de nos recherches est d'orienter la sélectivité de la réaction protéasique vers l'obtention de ces peptides actifs intermédiaires en introduisant des phénomènes de partage au cours de la cinétique, grâce à l'emploi de solvants non miscibles à l'eau. Cette voie devait permettre à la fois la formation et l'extraction de ces peptides. Les hémorphines, peptides hydrophobes, se prêtaient bien à cette démarche. En effet, LVV-hémorphine-7 (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe) et VV-hémorphine-7 (Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe) contiennent des résidus leucine, valine, tryptophane, tyrosine et phénylalanine notamment, qui leur confèrent un caractère hydrophobe élevé : d'après l'échelle de Bigelow (1967), LVVh-7 et VVh-7 ont une hydrophobie de 1675 cal/mol et de 1661 cal/mol respectivement, comparée à l'hydrophobie des autres peptides (moyenne de 900 cal/mol) générés pendant l'hydrolyse de l'hémoglobine.

Nous avons suivi les cinétiques d'apparition et d'extraction de ces deux peptides opioïdes au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine dans des systèmes biphasiques eau/alcool(s), puis optimisé les conditions de mise en œuvre avec la pepsine immobilisée dans le but de préparer en continu LVVh-7 et VVh-7 dans un réacteur ouvert couplé à une colonne d'alumine afin de recycler la phase organique dans le réacteur.

Je présenterai les principaux résultats, issus des recherches réalisées au cours de mon D.E.A. (1997-1998), de ma thèse (1998-2001) et depuis ma nomination en tant que maître de conférences en 2001, sous la forme de 3 parties :

- les études qui ont permis la conception d'un réacteur enzymatique ouvert couplé à une colonne d'alumine pour la préparation sélective et en continu de deux hémorphines dans un système biphasique eau/alcools au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine insolubilisée (**9 articles**) ;

- l'isolement et la caractérisation du premier peptide antibactérien issu de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine, ainsi que les cinétiques d'apparition de ce peptide au cours de l'avancement de la réaction d'hydrolyse (**2 articles**) ;

- la conception d'un réacteur enzymatique ouvert pour la préparation en continu de peptides à activités biologiques au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine immobilisée sur une alumine fonctionnalisée (**1 article**) ;

### **IV.3.2. Conception d'un réacteur enzymatique ouvert couplé à une colonne d'alumine pour la préparation sélective et en continu de deux peptides opioïdes (LVV-hémorphine-7 et VV-hémorphine-7) dans un système biphasique eau/alcools au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine insolubilisée**

Les études présentées dans cette partie concernent :

- la détermination des cinétiques d'apparition des deux hémorphines en solution et en système monophasique aqueux ;
- la mise au point d'un mélange d'alcools pour leur extraction sélective au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine immobilisée ;
- la mise au point d'un réacteur de type Continuous-Stirred-Tank-Reactor et en présence d'un système biphasique eau/butan-2-ol – octan-1-ol pour la préparation en continu des deux hémorphines ;
- la mise au point d'un CSTR couplé à une colonne d'oxyde d'aluminium pour le recyclage du mélange d'alcools et la récupération des hémorphines.

#### ***IV.3.2.1. Détermination des cinétiques d'apparition des deux hémorphines au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine en système monophasique aqueux***

Les cinétiques d'apparition de LVVh-7 ( $\beta$ 31-40) et de VVh-7 ( $\beta$ 32-40) au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine ont, dans un premier temps, été déterminées en solution aqueuse et en présence ou en absence d'urée, un agent dénaturant, afin de mesurer l'effet de l'état structural du substrat protéique sur l'apparition des deux peptides opioïdes. La réaction a été réalisée dans un tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1M à pH 4,5 avec ou sans urée et à 23°C.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié dans *Biotechnol. Appl. Biochem.*  
**“Solvent effect on kinetics of appearance of haemorphins in the course of peptic hydrolysis of bovine haemoglobin”**

Les cinétiques ont été déterminées à partir des profils chromatographiques issus de fractionnements par CLHP de PI et caractérisent l'évolution de l'aire des peptides actifs en fonction du degré d'hydrolyse de l'hémoglobine.

L'état dénaturé de l'hémoglobine est apparu être le plus favorable à l'obtention des peptides intermédiaires dont les deux hémorphines, grâce à un mécanisme de type « zipper » d'après Linderstrøm-Lang. Selon ce mécanisme, la protéine est rapidement hydrolysée en peptides dits « intermédiaires », c'est-à-dire des produits de dégradation transitoires, puis ces peptides sont progressivement clivés en peptides dits « finaux ». Lorsque l'hémoglobine se trouve dans un état natif, son hydrolyse pepsique se déroule selon un mécanisme de type « one-by-one » selon Linderstrøm-Lang, où le mélange réactionnel se compose de la protéine native (non hydrolysée) et des peptides finaux, sans laisser apparaître de peptides

intermédiaires. Cette étude a également permis de déterminer les cinétiques d'apparition d'autres peptides à activités biologiques : VV-hémorphine-4 ( $\beta$ 32-37), un peptide potentialisateur de la bradyquinine ( $\alpha$ 110-125) et un peptide analgésique la néokyotorphine ( $\alpha$ 137-141).

Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié dans *Biotechnol. Appl. Biochem.*  
**“Solvent effect on kinetics of appearance of neokyotorphin, VV-haemorphin-4 and a bradykinin-potentiating peptide in the course of peptic hydrolysis of bovine haemoglobin”**

En collaboration avec B. CODDEVILLE et G. RICART du Centre Commun de Mesure en Spectrométrie de Masse de l'Université des Sciences et Technologies de Lille I, nous avons développé une technique rapide utilisant le couplage d'une CLHP de phase inverse avec la spectrométrie de masse à ionisation électrospray afin d'isoler et d'identifier les hémorphines LVVh-7, VVh-7 et VVh-4, produites successivement au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine dénaturée à pH 4,5. Nous avons montré que la cinétique de cette hydrolyse suit la même évolution lorsque la concentration de l'hémoglobine augmente (0,2 à 5%, p/v).

Les cinétiques d'apparition de ces trois hémorphines, issues d'hydrolysats à 0,2% (p/v), ont été suivies grâce à leur isolement par la CLHP de PI, puis par la caractérisation de leur masse moléculaire par la spectrométrie de masse de type MALDI. Cependant, à partir des hydrolysats à 5% (p/v), le suivi des mêmes cinétiques a été réalisé en une seule étape, grâce au couplage des techniques de la CLHP de phase inverse et de la SM-IES, qui a permis simultanément l'isolement et l'identification des trois hémorphines.

La comparaison de ces deux procédures rend bien compte du dynamisme du système et de son efficacité dans l'isolement et l'identification d'hémorphines. Un gain de temps considérable est engendré grâce au couplage de la CLHP avec la SM, par rapport aux procédures traditionnelles. Cette méthode est une bonne façon d'identifier des peptides actifs sans extraction préliminaire, par la connaissance de leur masse moléculaire, et permet de réduire leur temps de purification.

Ce couplage nous a permis de déterminer les conditions idéales de préparation des trois hémorphines, grâce aux cinétiques d'évolution de ces peptides au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine dénaturée, exprimée en degré d'hydrolyse (DH) de la protéine substrat. Il est préférable de se placer à un DH faible (3%) pour préparer LVVh-7, à un DH moyen (11%) pour préparer VVh-7 et un DH élevé (21%) pour la préparation de VVh-4. Ces conditions sont conservées lorsque la concentration en hémoglobine dénaturée augmente (0,2 à 5%).

Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié dans *J. Chromatogr. A*  
**“Kinetics of appearance of haemorphins from bovine haemoglobin peptic hydrolysates by a direct coupling of reversed-phase high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry”**

En collaboration avec le Pr J.P. HUVENNE et C. RUCKEBUSCH du Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman (LASIR), de l'Université des Sciences et Technologies de Lille I, nous avons travaillé sur le suivi de la réaction d'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine en solution. Des hydrolysats peptidiques obtenus à différents temps d'hydrolyse ont été analysés par spectroscopie proche infra-rouge afin d'établir une corrélation entre le degré d'hydrolyse, c'est-à-dire le nombre de liaisons peptidiques coupées sur le nombre total de liaisons, et les données spectrales (bandes amides I et II) issues d'un spectrophotomètre IR à transformée de Fourier. Ce travail a permis de montrer une bonne corrélation sur des degrés d'hydrolyse de l'hémoglobine allant de 0 à 8,7%. Il pourrait être un point de départ intéressant dans la réalisation d'un capteur optique qui permettrait de suivre la cinétique d'hydrolyse et la préparation de peptides à activités biologiques ou fonctionnelles.

Cette collaboration a fait l'objet d'un article publié dans *Applied Spectroscopy*  
**“On-line mid-infrared spectroscopic data and chemometrics for the monitoring of an enzymatic hydrolysis”**

Nous avons préparé LVVh-7, VVh-7 et VVh-4 par CLHP de PI avec une colonne préparative de type C4, à partir des hydrolysats obtenus aux degrés d'hydrolyse optimum pour l'obtention de chaque hémorphine. L'objectif de cette préparation était d'utiliser ensuite ces trois hémorphines comme des standards pour établir une procédure d'identification et de quantification au sein d'hydrolysats peptidiques d'hémoglobine.

Nous avons construit une bibliothèque spectrale avec les trois hémorphines, grâce à un détecteur à barrettes de diodes et le logiciel d'exploitation de données Millennium<sup>®</sup> de la société Waters<sup>®</sup>. Cette bibliothèque nous permet à présent, après isolement sur une colonne de CLHP de phase inverse, de caractériser chacune des hémorphines au sein d'un hydrolysat quelconque d'hémoglobine, et de déterminer les concentrations de chaque peptide opioïde dans les hydrolysats aux degrés d'hydrolyse optima.

*Conclusion* : Le résultat principal de ces études est illustré sur la **figure 3** de l'article **“Solvent effect on kinetics of appearance of haemorphins in the course of peptic hydrolysis of bovine haemoglobin”** qui montre la cinétique d'apparition de LVVh-7 et de VVh-7 au cours de l'hydrolyse. Ces deux peptides ont été caractérisés comme des peptides intermédiaires et il est préférable de travailler avec un degré d'hydrolyse faible pour préparer LVVh-7 et un degré d'hydrolyse moyen pour préparer VVh-7.

#### ***IV.3.2.2. Mise au point d'un mélange d'alcools pour l'extraction sélective des deux hémorphines au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine immobilisée***

Les réactions protéasiques mettent en œuvre de nombreuses étapes irréversibles consécutives au cours desquelles des séquences peptidiques apparaissent transitoirement et ne sont pas isolables. Afin d'orienter la sélectivité de la réaction vers l'obtention de peptides opioïdes intermédiaires, nous avons introduit des phénomènes de partage au cours de la cinétique grâce à un système biphasique eau/alcools. L'extraction de peptides actifs, grâce à ce système représente un intérêt pratique dans la procédure de purification de telles molécules. Elle présente un moyen simple à mettre en œuvre et contribue à réduire quantitativement le nombre de peptides extraits, grâce à la sélectivité du solvant organique. Cela contribue également à réduire les étapes nécessaires à l'isolement de ces peptides actifs, qui font souvent appel à la combinaison de différentes techniques chromatographiques. Plusieurs auteurs (Lalassidin et Sjaberg, 1978 ; Lemieux et Simard, 1991 ; Aubes-Dufau *et coll.*, 1995 ; Lovsin-Kukman *et coll.*, 1995 ; Zhao et Piot, 1998a) ont montré la capacité des solvants organiques à extraire des peptides hydrophobes à partir d'hydrolysats complexes de protéines.

LVVh-7 et VVh-7 ont fait l'objet de telles recherches. La présence de résidus leucine, valine, tryptophane, tyrosine et phénylalanine confère à ces deux peptides un caractère hydrophobe élevé, et explique le fait que ces peptides aient été sélectivement extraits par le butan-2-ol (Zhao et Piot, 1998a) dans un système biphasique contenant un hydrolysat pepsique d'hémoglobine.

Cependant, les études réalisées sur les deux hémorphines traitaient essentiellement de leur extraction sur des hydrolysats. Nous avons alors recherché un système biphasique liquide/liquide capable d'extraire les deux peptides opioïdes au cours de la réaction d'hydrolyse. L'hydrolyse de l'hémoglobine dans un milieu biphasique tampon acétate pH 4,5 / butan-2-ol ne fait pas apparaître les deux hémorphines dans la phase aqueuse, du fait de l'inhibition de l'activité pepsique par le butan-2-ol miscible à l'eau. En effet, certains auteurs ont montré le rôle inhibiteur compétitif des alcools vis-à-vis des protéases (Tang, J., 1965 ; Shin, H.D., 1970 ; Antonov, V.K., 1977). C'est pourquoi nous nous sommes orientés vers un mélange de butan-2-ol et d'octan-1-ol, ce dernier n'étant pas miscible à l'eau servira de co-solvant d'extraction du butan-2-ol présent dans la phase aqueuse. Grâce à la collaboration du Dr. BIGAN du Laboratoire de Chimie Organique et Environnement de l'U.S.T.L., nous avons mis au point et optimisé les proportions en tampon acétate, butan-2-ol et octan-1-ol en utilisant un plan d'expériences. Ce mélange devait garantir à la fois le maintien de l'activité de la pepsine dans la phase aqueuse et l'extraction sélective des deux hémorphines dans la phase organique. De plus, dans l'optique de mettre au point un réacteur ouvert de type Continuous-Stirred-Tank-Reactor, pour préparer en continu les deux peptides actifs, nous avons immobilisé la pepsine sur une résine anionique (Duolite A568 de la société Rohm and Haas). Les conditions optimales de proportion en tampon acétate, butan-2-ol et octan-1-ol, permettant l'apparition des deux hémorphines et leur extraction simultanée au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine insolubilisée, sont un système biphasique composé de 45% de tampon, 45% de butan-2-ol et 10% d'octan-1-ol (v/v). Ce mélange s'est avéré très sélectif puisque seulement deux autres peptides sont extraits dans la phase organique, parmi une centaine générés au cours de l'hydrolyse. Nous avons également observé un comportement d'hydrolyse de l'hémoglobine similaire à celui d'un mécanisme « zipper » rencontré avec l'hémoglobine dénaturée par l'urée. Cette optimisation offre une possibilité technologique de production très sélective et continue des deux hémorphines dans un réacteur ouvert.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié dans *Biotechnol. Appl. Biochem.*  
**“Using an experimental design for the optimization of LVV-haemorphin-7 and  
VV-haemorphin-7 extraction by an organic solvent mixture in the course of bovine  
haemoglobin peptic hydrolysis”**

Conclusion: le résultat principal de cette étude est illustré par la **figure 4** de l'article pré-cité qui montre le résultat du plan de mélanges par la détermination de la zone optimale des proportions en eau (45%, v/v), butan-2-ol (45%, v/v) et octan-1-ol (10%, v/v) pour chaque hémorphine.

#### ***IV.3.2.3. Mise au point d'un réacteur de type Continuous-Stirred-Tank-Reactor et en présence d'un système biphasique eau / butan-2-ol – octan-1-ol pour la préparation en continu des deux hémorphines***

Après avoir optimisé les proportions en eau, butan-2-ol et octan-1-ol (45%/45%/10%, v/v), grâce à l'utilisation d'un plan de mélanges, les recherches ont concerné l'étude et la mise au point d'un réacteur ouvert de type CSTR pour préparer LVVh-7 et VVh-7 en continu au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine immobilisée dans le système biphasique optimisé.

Nous avons, dans un premier temps, étudié les cinétiques d'apparition des deux peptides opioïdes en fonction du rapport Enzyme/Substrat (% p/p) dans un réacteur fermé de type Batch et en système monophasique aqueux. Le temps de séjour de l'hémoglobine dans le réacteur est d'une heure et correspond approximativement au maximum de production de LVVh-7 au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine en solution. De plus, l'hydrolyse a lieu dans un tampon citrate de sodium à pH 3, ce qui permet de dénaturer la protéine sans utiliser l'urée. Des études antérieures ont également montré que le déroulement des cinétiques d'apparition des deux hémorphines à pH 3 est similaire à celui observé à pH 4,5 avec l'urée, c'est-à-dire une hydrolyse selon un mécanisme « zipper ». Un rapport E/S de 10,6% a été choisi pour la mise en œuvre du futur réacteur ouvert.

Certains de ces travaux sont issus d'une collaboration avec l'équipe de Génie des Procédés du Pr. DHULSTER (laboratoire ProBioGEM) et ont fait l'objet d'un article publié dans *Biotechnol. Appl. Biochem.*

**“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”**

et d'un article publié dans *Desalination*

**“Advancement in intermediate opioid peptide production in an enzymatic membrane reactor assisted by solvent extraction”**

Afin de déterminer le temps de séjour des deux peptides opioïdes dans la phase organique, nous avons étudié leur cinétique d'extraction dans un réacteur de type fermé contenant une phase aqueuse, constituée d'un hydrolysats obtenu dans les conditions optimales décrites auparavant (rapport E/S de 10,6% (p/p), pH 3, 1 heure), et une phase organique constituée du mélange butan-2-ol – octan-ol-1. A partir des profils cinétiques obtenus, le coefficient de partage de chaque peptide a été déterminé lorsque l'équilibre des concentrations dans le milieu biphasique a été atteint. Un coefficient  $P_{o/w}$  de 0,33 pour LVVh-7 et de 0,31 pour VVh-7 a été obtenu. Ce résultat montre que ces deux peptides présentent une meilleure affinité pour la phase aqueuse que pour le mélange organique. Cependant, une très bonne sélectivité est obtenue puisque seulement quatre peptides, dont deux peptides actifs, sont extraits. Cette étude nous a également permis de choisir un temps de séjour d'une heure dans la phase organique pour la conception de notre futur réacteur ouvert.

Un réacteur ouvert de type CSTR a été mis en œuvre pour préparer en continu LVVh-7 et VVh-7 dans un système biphasique tampon citrate de sodium pH3 / butan-2-ol – octan-1-ol. Les temps de séjour dans les deux phases étaient d'une heure et le réacteur a fonctionné pendant 10 heures.

L'analyse de la phase aqueuse par CLHP de PI au cours du procédé a montré la présence de peptides qui n'apparaissent pas lors de l'étude de l'effet du rapport E/S sur les cinétiques d'apparition des deux hémorphines dans le milieu tampon citrate de sodium pH3 seul. Ceci semble être dû à l'effet inhibiteur de l'activité pepsique par le butanol-2 présent dans la phase aqueuse et une adsorption du butan-2-ol sur le support d'immobilisation de la pepsine, qui contribuerait à diminuer la diffusion de l'hémoglobine au travers de la résine Duolite. Cependant, la modification de la population peptidique au cours du procédé n'affecte pas la production des deux peptides opioïdes car ils sont détectés tous les deux dans la phase aqueuse.

L'analyse de la phase organique en sortie de réacteur par CLHP de PI montre la présence de LVVh-7 et de VVh-7, des deux peptides contaminants déjà identifiés auparavant ainsi que de l'hème. Les deux hémorphines ont été extraites en continu, la modification de la population peptidique constatée dans la phase aqueuse n'affectant pas la nature ni le nombre de peptides extraits. Ceci démontre qu'une bonne sélectivité d'extraction des deux hémorphines par le mélange butan-2-ol – octan-1-ol est maintenue pendant toute la durée du procédé continu.

A partir des profils chromatographiques, nous avons déterminé l'évolution des concentrations de LVVh-7 et de VVh-7 dans les phases aqueuse et organique en sortie de réacteur ouvert et pendant les 10 heures de fonctionnement. Dans la phase aqueuse, les concentrations atteignent un état stationnaire au bout de 5 heures. Dans la phase organique, les concentrations de LVVh-7 et de VVh-7 atteignent leur état stationnaire après 3 heures de fonctionnement et pour des valeurs respectives de 0,65 et de 0,85  $\mu\text{M}$ . Ceci démontre la stabilité de l'activité de la pepsine immobilisée pendant toute la durée du procédé. Après 10 volumes de réacteur environ 3 mg d'hémorphines ont été extraits.

Ces travaux ont fait l'objet d'une partie de la **co-tutelle de thèse de Elena-Loredana TICU**, en collaboration avec le Laboratoire de Biochimie de l'Université Al. I. Cuza de Iasi en Roumanie,

et d'un article publié dans *J. Chem. Technol. Biotechnol.*

**“Study of a continuous reactor for selective solvent extraction of haemorphins in the course of peptic haemoglobin hydrolysis”**

Conclusion : le résultat principal de cette étude est illustré par la **figure 8** de l'article pré-cité qui montre l'évolution des concentrations de LVVh-7 et de VVh-7 dans les phase aqueuse et organique du CSTR. Ce graphique montre que les états stationnaires des concentrations en hémorphines ont été atteints dans chaque phase après quelques heures de mise en œuvre, et qu'ils ont été maintenus constants jusque la fin du process. Cela traduisait la bonne stabilité de l'activité de la pepsine insolubilisée sur la résine cationique.

#### ***IV.3.2.4. Mise au point d'un CSTR couplé à une colonne d'oxyde d'aluminium pour le recyclage du mélange d'alcools et la récupération des hémorphines***

La mise en œuvre d'un réacteur de type CSTR a permis de produire et d'extraire en continu LVVh-7 et VVh-7 dans un système biphasique eau/butan-2-ol – octan-1-ol au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine insolubilisée. Cependant, deux problèmes majeurs subsistaient. Le premier concernait l'extraction de l'hème dans la phase organique pendant le procédé continu et le second la récupération des peptides extraits, qui ne pouvait pas se faire par évaporation, même sous pression réduite, du fait de la faible stabilité des peptides aux températures d'ébullition de l'octan-1-ol (195°C) et du butan-2-ol (110°C). De plus, nous devons prendre en compte la consommation importante de mélange organique (environ 550 mL), pendant les 10 heures de fonctionnement du réacteur, donc rechercher un moyen de recycler la phase organique dans le réacteur.

Pour répondre à ces différentes contraintes, nous avons recherché un support solide capable d'adsorber et d'accumuler les peptides et l'hème pendant la mise en œuvre du réacteur ouvert et de recycler le mélange organique dans le réacteur en fonctionnement. Ce moyen permettrait ensuite de récupérer les peptides retenus sur le support par une désorption sélective avec un solvant volatil, sans désorption de l'hème, et de récupérer les peptides élués à l'état pur par évaporation du solvant sans risquer d'altérer leur structure. De nombreuses études ont montré que les acides aminés, les peptides et les protéines peuvent être adsorbés par l'oxyde d'aluminium et que des interactions hydrophiles sont généralement responsables de ces adsorptions. De plus, l'oxyde d'aluminium est souvent utilisé dans la chromatographie de type hydrophile dans laquelle la phase mobile est constituée de solvant(s) organique(s) qui favorisent l'adsorption des molécules hydrophiles sur le support (Sarkar et Chattoraj, 1996 ; Nakanishi *et coll.*, 2001).

Nous avons étudié le couplage d'un réacteur ouvert de type CSTR avec une colonne d'oxyde d'aluminium, pour préparer en continu LVVh-7 et VVh-7 au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par de la pepsine immobilisée dans un système biphasique eau/butan-2-ol – octan-1-ol.

La colonne d'alumine a été conçue en étudiant l'adsorption des peptides, dont les deux hémorphines, et de l'hème, présents dans un mélange butan-2-ol – octan-1-ol, dans des colonnes de diamètres différents (1, 3 et 5 cm) et contenant une hauteur de support de 5 cm. Le débit appliqué sur le support était de 0,92 mL/min et correspondait aux débits d'alimentation et de soutirage de la phase organique dans le réacteur ouvert. L'analyse de la phase organique en sortie de colonne par CLHP de PI, a montré l'absence des peptides et de l'hème lorsque la colonne de diamètre 5 cm était utilisée, tandis que les peptides et l'hème n'étaient pas tous adsorbés dans les colonnes de diamètre 1 et 3 cm. Dans ces conditions, le débit linéaire au travers de la colonne d'alumine de diamètre 5 cm est de 2,28 cm/h et le temps de séjour des molécules dans la colonne d'environ 105 minutes. Par conséquent, les cinétiques d'adsorption sont suffisamment rapides pour adsorber la totalité des peptides et de l'hème et permettre le recyclage du mélange d'alcools dans le CSTR.

Un solvant volatil capable d'éluier les hémorphines du support a ensuite été recherché. Nous nous sommes orientés vers un tampon éthanolamine/HCl à pH 10,5 car il avait déjà été utilisé avec succès lors du fractionnement d'un hydrolysate pepsique d'hémoglobine bovine par chromatographie échangeuse d'anions (Kosciarz *et coll.*, 1998). Une concentration de 50 mM en tampon a permis de désorber les peptides, dont les deux hémorphines, tandis que l'hème restait adsorbé sur l'alumine.

Le couplage de l'extraction de LVVh-7 et de VVh-7 dans un réacteur de type CSTR avec leur adsorption dans une colonne d'alumine et le recyclage du mélange butan-2-ol – octan-1-ol dans le réacteur a été mis en œuvre pendant 10 heures. Le temps de séjour de l'hémoglobine dans la phase aqueuse, des peptides et de l'hème, extraits dans la phase organique, était d'une heure. Les états stationnaires des concentrations en hémorphines dans chaque phase ont été atteints de la même manière que ceux déterminés dans l'article décrit précédemment (article « **Study of a continuous reactor for selective solvent extraction of haemorphins in the course of peptic haemoglobin hydrolysis** »). L'analyse des profils chromatographiques par CLHP de PI de la phase organique, après passage sur la colonne d'alumine, a montré une absence totale de peptides et de l'hème pendant toute la durée du procédé. Cela a donc permis de recycler le mélange de solvants dans le réacteur ouvert. A partir des profils chromatographiques, nous avons déterminé l'évolution des concentrations de chaque hémorphine dans la phase organique à l'entrée de la colonne d'alumine. Un état stationnaire des concentrations en hémorphines a été atteint après 5 heures et jusque 10 heures de fonctionnement du procédé, à des concentrations respectives de 1,5 et de 2  $\mu\text{M}$  pour VVh-7 et LVVh-7. L'obtention de cet état stationnaire démontre plusieurs points : - la stabilité de l'activité de la pepsine immobilisée ; - l'efficacité d'adsorption des peptides et de l'hème par l'alumine au cours des 10 volumes de réacteur accumulés dans la colonne ; - le maintien de la sélectivité de l'extraction des deux peptides opioïdes par le mélange butan-2-ol – octan-1-ol recyclé dans le réacteur.

La désorption des hémorphines de l'oxyde d'aluminium a été réalisée selon une procédure incluant le passage de l'éthanol pour retirer le mélange butan-2-ol – octan-1-ol, puis le passage d'un tampon éthanolamine/HCl pH 10,5 et à 50 mM pour désorber les hémorphines tout en maintenant l'hème adsorbé sur le support. Après concentration du tampon d'éluion par une évaporation sous vide, 1 mg de LVVh-7 et 1,8 mg de VVh-7 ont été récupérés. Ces quantités montrent d'une part que 100% des hémorphines accumulées sur l'alumine pendant les 10 heures de mise en œuvre du CSTR ont été désorbés et, d'autre part qu'elles correspondent à un rendement d'extraction de 6,0% pour LVVh-7 et de 8,4% pour VVh-7. Ces rendements sont faibles, comparés à celui obtenu (environ 45%) lors de la préparation des deux hémorphines par la combinaison d'une chromatographie échangeuse de cations sur CM-Sephadex et d'une chromatographie d'interactions hydrophobes sur un support de type phényl-Sepharose. Les raisons de ces faibles rendements d'extraction dans notre procédé sont liées aux faibles coefficients de partage des hémorphines (environ 0,30) mais aussi à la faible surface d'échange (environ 30  $\text{cm}^2$ ) entre les phases aqueuse et organique dans le réacteur ouvert. Cependant, le couplage du recouvrement des hémorphines grâce à l'alumine et le recyclage du mélange butan-2-ol – octan-1-ol dans le CSTR a permis de préparer les hémorphines pures en une seule étape et en utilisant de faibles volumes de solvants organiques : 50 mL ont été utilisés pour démarrer le réacteur ouvert et 30 mL ont été nécessaires dans la colonne d'alumine.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié dans *Process Biochem.*  
**“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”**

*Conclusion* : le résultat principal de cette étude est illustré par la **figure 1** de l'article pré-cité qui montre le schéma du couplage CSTR-colonne d'oxyde d'aluminium. Ce couplage a permis la production et l'extraction simultanée de LVVh-7 et de VVh-7 au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine immobilisée, et le recyclage du mélange butan-2-ol – octan-1-ol dans le réacteur, sans perturbation de la sélectivité d'extraction des deux peptides opioïdes.

### IV.3.3. Isolement, caractérisation et cinétiques d'apparition d'un peptide antibactérien au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine

Un peptide présentant une activité antibactérienne a été isolé pour la première fois à partir d'un hydrolysate pepsique d'hémoglobine bovine. Ce peptide a été purifié par la combinaison d'une chromatographie d'échange d'anions sur un support de type Q-Sepharose Fast Flow suivie d'une CLHP de PI sur une colonne de type C18. L'analyse de la masse moléculaire et de la séquence en acides aminés par SM de type MALDI et IES indiquait que ce peptide correspondait au fragment 1-23 de la chaîne alpha de l'hémoglobine bovine et présentait une masse moléculaire de 2236.9 Da. L'activité antibactérienne du peptide a été testée sur *Micrococcus luteus* A270, souche bactérienne souvent utilisée pour sa sensibilité à la détection de substances antibiotiques (de Lillo *et coll.*, 1997). L'inhibition de la croissance bactérienne est apparue à partir d'une concentration en peptide de 1.5 mg/mL (soit 671  $\mu$ M), qui correspondait à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). Bien que le peptide ( $\alpha$ 1-23) présente une faible activité antibactérienne, comparée à d'autres peptides (Ivanov *et coll.*, 1997), c'est le premier peptide présentant cette activité obtenu *in vitro* par la protéolyse de l'hémoglobine bovine.

Le mode d'action du peptide a été étudié par spectrofluorimétrie sur des liposomes contenant de la carboxyfluoresceïne. L'activité de lyse des membranes des liposomes augmente avec la concentration du peptide et atteint 16% lorsque la concentration en peptide est de 50  $\mu$ M. Ce résultat montre la présence d'interactions entre le peptide et les liposomes. Ces interactions peuvent donc causer des modifications de la perméabilité membranaire et conduire à la lyse cellulaire (Jack *et coll.*, 1995 ; Gururaj Rao, A., 1995). Cette activité lytique est proche de celle mesurée sur des peptides antibactériens naturels tels que la melittine qui cause 80% de lyse à 100  $\mu$ M. (Sessa *et coll.*, 1969).

Les cinétiques d'apparition du peptide ( $\alpha$ 1-23) ont été étudiées au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine (degré d'hydrolyse) à pH 4,5 et à 23°C, en présence ou en absence d'urée, un agent dénaturant. L'objectif de cette étude était de déterminer les conditions optimales de préparation du peptide antibactérien. Les deux mécanismes « one-by-one » et « zipper » ont été observés respectivement lorsque l'hydrolyse se déroulait avec l'hémoglobine native, en milieu tampon acétate de sodium en absence d'urée, et avec l'hémoglobine dénaturée. Pour préparer le peptide actif, il est préférable de réaliser l'hydrolyse en présence d'urée et de se placer à un degré d'hydrolyse de 13,5%, où la quantité de peptide produite est deux fois plus importante que celle mesurée avec l'hémoglobine native.

Ces travaux ont fait l'objet de deux articles publiés dans *FEBS Lett.*

**“Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine haemoglobin fragment”**

et dans *Biotechnol. Appl. Biochem.*

**“Kinetic study of the appearance of an antibacterial peptide in the course of bovine haemoglobin peptic hydrolysis”**

Conclusion : le résultat principal de ces études est illustré par la **figure 7** de l'article **“Kinetic study of the appearance of an antibacterial peptide in the course of bovine haemoglobin peptic hydrolysis”** qui montre la cinétique d'apparition du peptide antibactérien  $\alpha$ (1-23) au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine. Le graphique montre qu'il est préférable de travailler avec l'hémoglobine dénaturée et de se placer à un degré d'hydrolyse moyen pour préparer ce peptide actif.

#### **IV.3.4. Conception d'un réacteur enzymatique ouvert pour la préparation en continu de peptides à activités biologiques au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine immobilisée sur de l'alumine fonctionnalisée**

Nous avons étudié l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine insolubilisée sur un support minéral, dans le but de préparer en continu des hydrolysats enrichis en peptides actifs dans un réacteur de type CSTR. L'alumine a été choisie car elle peut fixer irréversiblement et sans activation préalable les molécules portant un groupement phosphate. Une méthodologie permettant de fixer directement la pepsine, dont une sérine est phosphorylée, et de modifier l'alumine par la phospho-éthanolamine, afin de diminuer les interactions des peptides avec les sites de l'alumine, a été développée. Nous avons montré qu'avec ce catalyseur l'hydrolyse en phase hétérogène est réalisée sans perturbation du mécanisme réactionnel observé en phase homogène (« zipper » ou « one by one »). De plus, la modification du support par la phospho-éthanolamine diminue l'adsorption des peptides produits comparée à l'alumine native utilisée comme support. Ces travaux ont également montré que les cinétiques d'apparition des peptides actifs sur les premières heures (LVVh-7, VVh-7, néokyotorphine, peptide  $\alpha(1-23)$ ) sont peu perturbées. Ces résultats ont alors permis la conception de réacteurs ouverts pour la préparation en continu d'hydrolysats peptidiques à activité biologique. Le temps de séjour de l'hémoglobine dans le réacteur était de deux heures et correspond à l'optimum d'apparition du peptide intermédiaire LVVh-7. Les états stationnaires des concentrations de chaque peptide actif en sortie de réacteur ont été maintenus pendant plus de 20 heures de fonctionnement : à partir de 5 g d'hémoglobine bovine, 30 mg de LVVh-7, 28 mg de VVh-7 et 28 mg de  $\alpha(1-23)$  ont été produits. Le peptide Néokyotorphine ne pouvait être préparé par ce type de procédé à cause des faibles quantités atteintes à l'état stationnaire.

Ces travaux ont été menés en collaboration avec le Laboratoire de Biochimie de l'Université Al. I. Cuza de Iasi en Roumanie et font partie de la **thèse en co-tutelle de Mlle TICU.**

Ces travaux ont également fait l'objet d'un article dans *Process Biochem.*  
**“Use of a protease-modified alumina complex to design a continuous stirred tank reactor for producing bioactive hydrolysates”**

Conclusion : le résultat principal de cette étude est illustré par la **figure 5** de l'article pré-cité qui montre les états stationnaires des concentrations en peptides à activités biologiques au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine immobilisée sur l'alumine fonctionnalisée. Le maintien des états stationnaires pendant plusieurs heures traduit la bonne stabilité de l'activité de la pepsine insolubilisée dans le réacteur ouvert.

**IV.4. Liste des publications**  
**et**  
**des communications**

#### IV.4.1. Publications

Lignot, B., **Froidevaux, R.**, Nedjar-Arroume, N. and Guillochon, D. (1999).

Solvent effect on kinetics of appearance of haemorphins in the course of peptic hydrolysis of bovine haemoglobin.

*Biotechnol. Appl. Biochem.* 29 : 25-30.

Lignot, B., **Froidevaux, R.**, Nedjar-Arroume, N. and Guillochon, D. (1999).

Solvent effect on kinetics of appearance of neokyotorphin, VV-haemorphin-4 and a bradykinin-potentiating peptide in the course of peptic hydrolysis of bovine haemoglobin.

*Biotechnol. Appl. Biochem.* 30 : 201-207.

**Froidevaux, R.**, Lignot, B., Nedjar-Arroume, N., Guillochon, D., Coddeville, B. and Ricart, G. (2000).

Kinetics of appearance of haemorphins from bovine haemoglobin peptic hydrolysates by a direct coupling of reversed-phase high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry.

*J. Chromatogr. A.* 873 : 185-194.

**Froidevaux, R.**, Krier, F., Nedjar-Arroume, N., Vercaigne-Marko, D., Kosciarz, E., Ruckebusch, C., Dhulster, P. and Guillochon, D. (2001).

Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine haemoglobin fragment.

*FEBS Lett.* 491: 159-163.

Ruckebusch, C., Sombret, B., **Froidevaux, R.** and Huvenne, J.P. (2001).

On-line mid-infrared spectroscopic data and chemometrics for the monitoring of an enzymatic hydrolysis.

*Applied Spectroscopy* 55: 1610-1617.

**Froidevaux, R.**, Nedjar-Arroume, N., Choisnard, L., Bigan, M. and Guillochon, D. (2001).

Using an experimental design for the optimization of LVV-haemorphin-7 and VV-haemorphin-7 extraction by an organic solvent mixture in the course of bovine haemoglobin peptic hydrolysis.

*Biotechnol. Appl. Biochem.* 33 : 75-83.

Choisnard, L., **Froidevaux, R.**, Nedjar-Arroume, N., Lignot, B., Vercaigne-Marko, D., Krier, F., Dhulster, P. and Guillochon, D. (2002).

Kinetic study of the appearance of an antibacterial peptide in the course of bovine haemoglobin peptic hydrolysis.

*Biotechnol. Appl. Biochem.* 36 : 187-194.

Dhulster, P., Kapel, R., **Froidevaux, R.**, Nedjar-Arroume, N., Fertin-Bazus, A., Choisnard, L. and Guillochon, D. (2002).

Advancement in intermediate opioid peptide production in an enzymatic membrane reactor assisted by solvent extraction.

*Desalination* 148: 221-226.

Kapel, R., **Froidevaux, R.**, Nedjar-Arroume, N., Fertin-Bazus, A., Dhulster, P. and 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.

Ticu, E.L., Vercaigne-Marko, D., **Froidevaux, R.**, Huma, A., Artenie, V. and Guillochon, D. (2005).

Use of a protease-modified alumina complex to design a continuous stirred tank reactor for producing bioactive hydrolysates.

*Process Biochem.* 40: 2841-2848.

**Froidevaux, R.**, Vercaigne-Marko, D., Ticu, E.L., Kapel, R., Lecouturier, D., Chung, S., Dhulster, P. and Guillochon, D. (2006).

Study of a continuous reactor for selective solvent extraction of haemorphins in the course of peptic haemoglobin hydrolysis.

*J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81 : 1433-1440.

**Froidevaux, R.**, Vanhoute, M., Lecouturier, D., Dhulster, P. and 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 Biochem.* 43 : 431-437.

#### IV.4.2. Communications écrites, orales et par affiches

##### IV.4.2.1. Au niveau national

**Froidevaux, R.**, Nedjar-Arroume, N. et Guillochon, D. (2000).

Suivi des cinétiques d'apparition de trois hémorphines au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine par un couplage CLHP/SM-IES.

*Colloque National de la Recherche Universitaire dans les IUT.*

Bourges (France), 14-16 Juin.

**Froidevaux, R.**, Nedjar-Arroume, N. et Guillochon, D. (2000).

Suivi des cinétiques d'apparition de trois hémorphines au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine par un couplage CLHP/SM-IES.

*CNR'IUT*, Bourges, Recherche et Innovation, Tome I, Presses Universitaires d'Orléans, pp 487-496.

**Froidevaux, R.**, Choisnard, L., Nedjar-Arroume, N., Bigan, M. et Guillochon, D. (2001).

Optimisation de l'extraction de deux hémorphines par un mélange de solvants organiques au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine.

*Colloque National de la Recherche Universitaire dans les IUT*

Roanne (France), 13-15 Juin.

**Froidevaux, R.**, Choisnard, L., Nedjar-Arroume, N., Bigan, M. et Guillochon, D. (2001).  
Optimisation de l'extraction de deux hémorphines par un mélange de solvants organiques au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine.  
*CNR'IUT*, Roanne, Recherche et Innovation, Tome I, Presses Universitaires de Saint-Etienne, pp 133-143.

Fertin-Bazus, A., Rousselle-Gérard, M., Eymard, S., Kapel, R., **Froidevaux, R.**, Nedjar-Arroume, N., Prevôt-d'Alvise, N., Lesueur-Lambert, C., Guillochon, D. et Dhulster, P. (2001).

Couplage de réacteurs enzymatiques à membranes d'ultrafiltration : influence du temps de séjour et du rapport enzyme/substrat sur la sélectivité de passage des peptides.

*8<sup>ème</sup> congrès Francophone de Génie des Procédés*

Nancy (France), 17-19 Octobre.

Krier, F., **Froidevaux, R.**, Nedjar-Arroume, N., Vercaigne-Marko, D., Dhulster, P. et Guillochon, D. (2003).

Activité antibactérienne d'un peptide obtenu par hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine.

*Colloque National de la Recherche Universitaire dans les IUT*

Tarbes (France), 15-16 Mai

Ticu, E.L., **Froidevaux, R.** et Guillochon, D. (2005).

Préparation en continu de deux peptides opioïdes au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine immobilisée dans un réacteur ouvert biphasique eau/butan-2-ol – octan-1-ol

*10<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Génie des Procédés*

Toulouse (France) - 20-22 Septembre.

Ticu, E.L., **Froidevaux, R.** et Guillochon, D. (2005).

Préparation en continu de deux peptides opioïdes au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine immobilisée dans un réacteur ouvert biphasique eau/butan-2-ol – octan-1-ol

*Récents Progrès en Génie des Procédés*. SFGP, Paris.

Vanhoute, M., **Froidevaux, R.**, Pierlot, C., Guillochon, D. et Aubry, J.M. (2007).

Etude de la séparation par moussage de peptides dans une colonne d'aération par une méthode de bullage-drainage.

*11<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Génie des Procédés*

Saint-Etienne (France) – 9-11 octobre.

#### ***IV.4.2.2. Au niveau international***

**Froidevaux, R.**, Ticu, E.L. et Guillochon, D. (2004)

Conception d'un réacteur triphasique pour la production en continu de peptides opioïdes à partir de l'hémoglobine bovine.

*3<sup>ème</sup> Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée*

Université de Bacau (Slanic Moldova - Roumanie) – 22-26 Septembre.

Guillochon, D. et **Froidevaux, R. (2004)**

Mise au point d'un réacteur enzymatique triphasique pour la préparation en continu de peptides à activité opioïde.

*Conférence sur invitation au 3<sup>ème</sup> Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée, 22-26*  
Université de Bacau (Slanic Moldova-Roumanie) – 22-26 Septembre.

Chung, S., **Froidevaux, R.** and Guillochon, D. **(2004)**

Simultaneous process of haemoglobin hydrolysis and haemorphin extraction by continuous biphasic reactor

*Korea/Japan/Taiwan Chemical Engineering Conference*  
Busan (Corée du Sud) - 2-4 Novembre.

**Froidevaux, R.**, Pierlot, C., Lecomte, E., Menneveux, F., Guillochon, D. and Aubry, J.M. **(2005)**

Foam Fractionation of peptides using aeration column with a bubbling-draining method.

*Formula IV: Frontiers in Formulation Science*  
Kings College, London (Royaume-Uni) - 4-7 Juillet.

**Froidevaux, R.**, Pierlot, C., Vanhoute, M., Kumiega, F., Guillochon, D. and Aubry, J.M. **(2006).**

Screening for foam separation of peptides using aeration column with a bubbling-draining method.

*ECFS (European congress on filtration and separation)*  
Compiègne (France) – 12 et 13 Octobre.

## **IV.5. Encadrement doctoral**

Depuis ma nomination comme maître de conférences en 2001, j'ai participé à l'encadrement :

- Thèse : 2 étudiants depuis 2002
- Master Recherche : 5 étudiants depuis 2001
- Master Professionnel : 1 étudiant en 2006
- Ingénieur I.A.A.L. : 1 étudiante en 2004
- D.U.T. de Génie Biologique : 1 étudiante en 2003
- B.T.S. Bioanalyses et Contrôles : 4 étudiants depuis 2003
- I.U.P. Génomique et Protéomique : 2 étudiants cette année

#### **IV.5.1. Participation à l'encadrement d'étudiants en thèse, master et stages d'ingénieur**

##### **2006-2009 Thèse de Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement**

**Mathieu VANHOUTE** - Université des Sciences et Technologies de Lille

Sujet : « *Compréhension des phénomènes gouvernant l'extraction assistée par paire d'ions de peptides dans des systèmes biphasiques liquide/liquide et à partir de l'hydrolyse de protéines alimentaires* »

##### **2002-2006 Thèse de Doctorat en co-tutelle**

**Loredana TICU** - Université Al. I. Cuza de IASI (Roumanie)/Université des Sciences et Technologies de Lille

Sujet : « *Protéolyse enzymatique dirigée de protéines alimentaires dans le but d'obtenir des peptides à propriétés fonctionnelles ou biologiques* »

##### **2007-2008 Master Recherche Bioprocédés et Biotechnologies Végétales**

**Aurélien VANVLASSEN BROECK** - Université des Sciences et Technologies de Lille

Sujet : « *Extraction sélective de peptides assistée par paires d'ions dans un système biphasique eau/solvant(s) organique(s) à partir d'hydrolysats peptidiques* »

##### **2006-2007 Master Recherche Bioprocédés et Biotechnologies Végétales**

**Ilham EL KHARROUBI** - Université des Sciences et Technologies de Lille

Sujet : « *Extraction de peptides assistée par paires d'ions dans un système biphasique eau/solvant(s) organique(s) à partir de l'hydrolyse peptidique de l'hémoglobine bovine* »

##### **2005-2006 Master Recherche Chimie et Ingénierie de la Formulation**

**Mathieu VANHOUTE** - Université des Sciences et Technologies de Lille

Sujet : « *Etude du fractionnement par une procédure de moussage-drainage d'une fraction peptidique enrichie en peptides antibactériens à partir d'hydrolysats peptidiques d'hémoglobine bovine* »

##### **2005-2006 Master Professionnel Bioinformatique**

**Sébastien CAPILLIER** - Université des Sciences et Technologies de Lille

Sujet : « *Elaboration d'outils informatiques : 1. Logiciel de calcul des propriétés physico-chimiques des peptides (poids moléculaire, pHi et évolution de la charge en fonction du pH, coefficient d'extinction molaire, hydrophobie selon différentes échelles,...) ; 2. Base de données contenant des peptides possédant des propriétés biologiques et/ou physico-chimiques* »

**2004-2005 Master Recherche Stratégie d'Exploitation des Fonctions Biologiques**

**Abderrakib ZAHID** - Université des Sciences et Technologies de Lille

Sujet : « *Extraction sélective de peptides actifs assistée par paires d'ions dans un système biphasique eau/solvant(s) organique(s) à partir d'hydrolysats peptiques de l'hémoglobine bovine.* »

**2003-2004 2<sup>ème</sup> année de l'école d'ingénieur I.A.A.L.**

**Emilie LECOMTE** - Université des Sciences et Technologies de Lille

Sujet : « *Etudes préliminaires sur l'extraction gaz/liquide d'une fraction peptidique antimicrobienne à partir d'hydrolysats peptiques d'hémoglobine bovine* »

**2001-2002 D.E.A. de Chimie Organique et Macromoléculaire**

**Sébastien DOUBLET** - Université des Sciences et Technologies de Lille

Sujet : « *Etude de la production en continu de peptides opioïdes dans un réacteur enzymatique triphasique solide/liquide/liquide : hydrolyse de le hémoglobine bovine par la pepsine* »

**IV.5.2. Participation à des jurys**

**2006 Loredana TICU**

Thèse en co-tutelle entre les universités Al. I. Cuza de IASI en Roumanie et Sciences et Technologies de Lille. Thèse soutenue en Septembre 2006 à IASI - Roumanie

**2007 Ilham EL KHARROUBI**

Master Recherche option « Bioprocédés et Biotechnologies Végétales »

**2006 Mathieu VANHOUTE**

Master Recherche option « Chimie et Ingénierie de la Formulation »

**2006 Sébastien CAPILLIER**

Master Professionnel option « Bioinformatique »

**2005 Abderrakib ZAHID**

Mater Recherche option « Bioprocédés et Biotechnologies Végétales »

**2004 Emilie LECOMTE**

2<sup>ème</sup> année de l'école d'ingénieur I.A.A.L.

**2002 Sébastien DOUBLET**

D.E.A. option « Chimie Organique et Macromoléculaire »

## **IV.6. Collaborations scientifiques**

#### IV.6.1. Collaborations internationales

- Avec le Pr. ARTENIE du Laboratoire de Biochimie - Faculté de Biologie de l'Université Al. I. Cuza de IASI en Roumanie. Cette collaboration concernait la co-tutelle de thèse de Mlle Loredana TICU.

- Avec le Dr. CHUNG du Département Food and Bioengineering de l'Université de Dongseo en Corée du Sud.

Cette collaboration a donné lieu à un article publié dans *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (« Study of a continuous reactor for selective solvent extraction of haemorphins in the course of peptic haemoglobin hydrolysis »), et à une conférence lors du « 2004 Korea/Japan/Taiwan Chemical Engineering Conference » à Busan en Corée du Sud sur « Simultaneous process of haemoglobin hydrolysis and haemorphin extraction by continuous biphasic reactor »

#### IV.6.2. Collaborations nationales

- Participation avec le Pr. GUILLOCHON au groupe de recherche « Transformations Biotechnologiques des ressources agro-alimentaires : de la protéine aux peptides bioactifs et fonctionnels ». Ce groupe implique, sur cette thématique, des laboratoires de l'INRA de Nantes, de Rennes et de l'IFREMER de Nantes, ainsi que des universités de Nancy, de Bretagne Occidentale, de La Rochelle et de Lille.

#### IV.6.3. Collaborations régionales

- Avec le Pr. AUBRY du Laboratoire d'Oxydation et de Formulation – CNRS UPRESA 8009 Chimie et Macromoléculaire - Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille. Les travaux portent sur l'extraction dans des mousses d'une fraction peptidique bioactive à partir d'hydrolysats peptiques de l'hémoglobine bovine.

Cette collaboration a fait l'objet :

- d'une conférence et d'un poster intitulés « Foam Fractionation of peptides using aeration column with a bubbling-draining method » au cours du congrès Formula IV : Frontiers in Formulation Science (2005) ;

- d'un poster intitulé « Screening for foam separation of peptides using aeration column with a bubbling-draining method » au cours du 2<sup>ème</sup> European Conference on Filtration and Separation (2006).

- Avec le Pr. HUVENNE du Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman, LASIR, CNRS UMR 8516, de l'Ecole Universitaire d'Ingénieurs de Lille. Les travaux ont porté sur le suivi par spectroscopie infra-rouge de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine. Cette collaboration a fait l'objet d'un article paru dans **Applied Spectroscopy en 2001**.

- Avec le Pr. DHULSTER du laboratoire ProBioGEM (équipe Génie des Procédés). Les travaux ont porté sur la préparation en continu dans un réacteur à membrane d'une fraction peptidique enrichie en LVV-hémorphine-7. Cette collaboration a fait l'objet de deux articles parus dans **Desalination en 2002** et dans **Biotechnol. Appl. Biochem. en 2003**.

#### IV.6.4. Rayonnement

- Conférencier invité dans le Master Franco-Roumain « Bioprocédés agroalimentaires » de l'Université Al. I. Cuza de Iasi ; responsables : Pr. ARTENIE et Pr. GUILLOCHON.

## **V. PERSPECTIVES DE RECHERCHE**

**Etude des effets de l'environnement sur  
la génération, la structure et l'activité biologique et fonctionnelle  
des peptides antimicrobiens**

## Contexte scientifique

Dans le cadre du prochain plan quadriennal 2010-2013, le laboratoire ProBioGEM a opté pour une organisation en une équipe dans laquelle seront développés des projets scientifiques orientés vers la compréhension et la conception de bioprocédés pour l'obtention sélective de peptides et protéines fonctionnelles. Un des projets, dans lequel je souhaite m'investir, concerne l'étude des effets de l'environnement sur la génération, la structure et l'activité biologique des peptides antimicrobiens issus de l'hydrolyse enzymatique de protéines agroalimentaires.

Au cours de ces dix dernières années, la bibliographie nous enseigne que de nombreuses études sur l'hydrolyse enzymatique des protéines agroalimentaires ont conduit à la mise en évidence dans les hydrolysats de peptides présentant des activités biologiques diverses (analgésique, anti-hypertensive, opioïde, antimicrobienne...) issus de protéines ne possédant pas ces activités et jouant un grand rôle sociétal comme les protéines du lait (caséines, protéines du lactosérum...), du sang (hémoglobine) et végétales (soja, luzerne...), etc ...

Ces séquences peptidiques bioactives sont souvent « masquées » dans les protéines et leur rôle physiologique dans les organismes est peu ou mal connu. De plus, elles se caractérisent par la présence de structures définies (hélices  $\alpha$ , feuillettes  $\beta$ ...) qui peuvent être essentielles pour l'activité biologique. La stratégie que nous souhaitons développer dans notre projet concerne l'hydrolyse enzymatique dirigée de protéines agroalimentaires afin d'orienter la réaction vers la génération de séquences peptidiques structurées et potentiellement bioactives. Certaines questions scientifiques afférentes à cette démarche peuvent être posées :

- Quelle est la stratégie à adopter pour accéder à une hydrolyse raisonnée des protéines permettant de générer des séquences peptiques actives en tenant compte de leurs structures initiales dans les protéines ?
- Ces séquences, une fois générées, peuvent-elles avoir des applications potentielles en alimentation et en nutraceutique ?

Le projet scientifique que nous comptons développer dans l'avenir, en collaboration avec des collègues du laboratoire et avec des collaborations universitaires, a pour objectif de contribuer à répondre à ces questions en développant des recherches dans trois directions principales :

- L'étude de la génération de séquences peptidiques structurées par hydrolyse enzymatique des protéines.
- L'étude du domaine de stabilité de l'activité biologique et/ou fonctionnelle de ces peptides dans les environnements alimentaires.
- La conception de méthodes sélectives de préparation de ces structures peptidiques pouvant faire par la suite l'objet de démarches à l'échelle préparative.

## **Isolement de séquences peptidiques structurées à partir de protéines**

Les peptides antimicrobiens ont été choisis comme modèle d'étude car leur activité biologique est clairement liée, au moins pour un grand nombre d'entre eux, à des propriétés structurales et physico-chimiques identifiées, à savoir à une structuration en hélice  $\alpha$  (voire en hélice amphipathique) dans ou au contact des membranes biologiques. Cette activité est notamment due aux interactions entre les peptides amphiphiles cationiques et les lipides, présents dans les membranes, dont les propriétés physico-chimiques sont amphiphiles anioniques.

La mise en évidence des séquences peptidiques structurées s'appuiera sur les données bio-informatiques de la protéine source afin de repérer la présence de séquences possédant ces propriétés physico-chimiques (taille, charge, hydrophobie, moment hydrophobe...). Une approche relevant du génie enzymatique s'appuyant sur une sélection d'endoprotéase(s) et l'étude de leur mise en œuvre aura pour but de maîtriser la génération de ces séquences structurées.

Ce projet qui s'appuie sur une approche enzymatique, bioinformatique et spectroscopique sera réalisé en collaboration avec mes collègues du laboratoire et le Dr PUPIN du Laboratoire d'Informatique de Lille I. Un programme informatique a été mis au point permettant de déterminer, à partir d'une séquence peptidique, les propriétés physico-chimiques telles que la masse moléculaire, le pHi, l'hydrophobie selon différentes échelles (Eisenberg, Kyte et Doolittle, Bigelow..), le coefficient d'extinction molaire à 280 nm et à 226 nm, le moment hydrophobe... Nous souhaitons développer d'avantage ce programme en incluant une démarche de prédiction de la relation entre la structure des peptides, leur comportement aux interfaces et leur activité biologique, basée sur une technique d'apprentissage.

## **Etude de la stabilité de la structure et de l'activité biologique des peptides**

L'étude du domaine de stabilité de l'activité antimicrobienne se fera en relation avec leur structure dans des environnements similaires à ceux retrouvés dans les préparations alimentaires et nutraceutiques, c'est-à-dire en solution ou aux interfaces liquide/liquide, liquide/gaz, liquide/solide. Les effets de la température, du pH et des sels devront également être des facteurs à prendre en compte dans l'étude de la stabilité de l'activité.

Ces recherches qui mettent en jeux des études structurales (Dichroïsme Circulaire , spectrofluorimétrie) en solution ou aux interfaces (membranes, liposomes, solvants hydrophobes) ainsi que des tests biologiques seront réalisées en collaboration avec mes collègues du laboratoire .

Une collaboration a été engagée avec le **Pr. Bâcu de l'université Al. I. Cuza de Iasi en Roumanie** pour travailler sur la solubilisation par nos séquences peptidiques amphiphiles de phénothiazines à activités biologiques non hydrosolubles et d'étudier leurs transports jusqu'au niveau de membranes artificielles.

## Conception de méthodes sélectives d'extraction des structures peptidiques

La recherche de concepts sélectifs de préparation de ces peptides se fera en prenant en compte leurs propriétés physico-chimiques (taille, charge, amphiphilie, hydrophobie...). Ces recherches sont déjà engagées dans deux directions :

### - Conception de systèmes sélectifs de peptides amphiphiles cationiques

Des études ont déjà été entreprises dans l'optique d'orienter la sélectivité de l'extraction liquide/liquide de peptides actifs en assistant leur extraction à l'aide d'un agent surfactant ionique. Ce type d'extraction, dite « assistée par paire d'ions », fait actuellement l'objet d'études appliquées sur des hydrolysats pepsiques d'hémoglobine. Nous maintenons les hydrolysats peptidiques d'hémoglobine bovine car la cartographie peptidique des hydrolysats issus de l'hydrolyse de la protéine par la pepsine est connue. Ceci implique que les propriétés physico-chimiques (taille, charge, hydrophobie...) des peptides générés lors de l'hydrolyse peuvent être facilement déterminées et peuvent par conséquent représenter des modèles d'études. De plus, de nombreuses séquences présentant des activités biologiques et fonctionnelles sont aujourd'hui répertoriées dans ces hydrolysats.

Les études d'extraction assistée par paires d'ions sont réalisées dans des systèmes biphasiques eau/octan-1-ol et en présence d'alkyl-sulfonates. Les premiers résultats montrent que le concept d'extraction assistée par la formation de paires d'ions peut être appliqué à des hydrolysats peptidiques complexes et qu'il conduit à orienter la sélectivité de l'extraction par une maîtrise de l'environnement (pH de la phase aqueuse, longueur de la chaîne alkyle) de la réaction. Ces premiers résultats ont été soumis dans *Journal of Separation Science*.

D'autres facteurs (polarité de la phase organique, nature du groupement polaire de l'agent surfactant, force ionique,...) sont aujourd'hui à l'étude afin de comprendre l'effet de chacun sur le comportement de l'extraction.

Aussi un fractionnement par chromatographie d'échange d'ions est actuellement étudié afin de préparer des fractions peptidiques contenant un nombre réduit de peptides purs identifiés. L'extraction assistée par paire d'ions appliquée sur ces fractions doit nous permettre de quantifier les peptides extraits et d'accéder ainsi aux coefficients de partage. Cette démarche a pour but de déterminer les relations entre les propriétés physico-chimiques et structurales des peptides extraits et les conditions d'extraction telles que le pH, la teneur en sel, la polarité du solvant et la structure de l'agent formateur de paires d'ions (nature de la partie anionique, longueur de la chaîne carbonées...). Ces travaux font l'objet d'une partie de la **thèse en cours de Mathieu VANHOUTE depuis 2006**.

A partir de ces résultats, nous envisageons par la suite la conception d'un système d'extraction par transfert de phases où l'agent formateur de paires d'ions, présent dans une phase organique, servirait de catalyseur dans le transport des peptides entre deux phases aqueuses dites « donneuse » et « acceptrice ».

### - Conception de systèmes sélectifs de peptides surfactifs

En collaboration avec le Dr. Christel PIERLOT, du Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire de l'USTL, nous travaillons sur la séparation d'hydrolysats pepsiques d'hémoglobine selon un procédé de moussage-drainage. Le principe est de faire buller un gaz dans une solution constituée d'hydrolysats peptidiques présent dans une colonne, ce qui génère de la mousse, puis d'effectuer un drainage « forcé » en appliquant un liquide sur la mousse de manière à forcer les peptides les moins surfactifs à éluer avec le liquide de

drainage. Les premiers résultats ont montré l'efficacité du concept dans la séparation d'une fraction peptidique enrichie en peptide(s) présentant une activité antibactérienne. Ces résultats sont soumis à publication dans le journal *Separation and Purification Technology*.

La suite des recherches est orientée vers la détermination des facteurs les plus influents vis-à-vis de la sélectivité et de la productivité du système de moussage-drainage. Ainsi, le débit d'air entrant dans la colonne, la concentration en hydrolysat, le pH de la solution de drainage et de l'hydrolysat, etc...sont actuellement testés.