

gen 20007771

50376  
1998  
409

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

N° attribué par la bibliothèque



THESE

Pour l'obtention du grade de

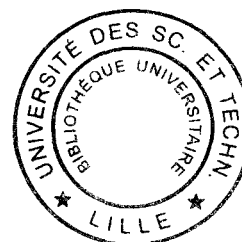
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

*Discipline : Génie Enzymatique, Bioconversion et Microbiologie*

Présentée et soutenue publiquement

Par

Frédéric LEBRUN



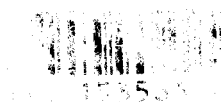
Le 25 Septembre 1998

**PREPARATION A L'ECHELLE PILOTE D'UN HYDROLYSAT D'HEMOGLOBINE BOVINE ENRICHIE EN FER HEMINIQUE SOLUBLE, DESTINE AU TRAITEMENT DE LA CARENCE FER**

**CARACTERISATION DES INTERACTIONS MOLECULAIRES AU SEIN DE L'HYDROLYSAT**

- JURY -

<b>D. BOUGLE</b>	<i>Médecin, Praticien Hospitalier au CHU de Caen</i>	<b>Rapporteur</b>
<b>P. DHULSTER</b>	<i>Professeur à l'I.U.T de Lille</i>	<b>Président</b>
<b>F. GOUDALIEZ</b>	<i>Pharmacien Responsable, Laboratoires Maco Pharma</i>	<b>Assesneur</b>
<b>D. GUILLOCHON</b>	<i>Professeur à l'I.U.T de Lille</i>	<b>Directeur de Thèse</b>
<b>T. HAERTLE</b>	<i>Directeur de Recherche, INRA de Nantes</i>	<b>Rapporteur</b>
<b>C. LEGRAND</b>	<i>Directeur général, Cie Générale de Diététique</i>	<b>Assesneur</b>



*A. Monsieur le Docteur Bougle*

*Médecin, Praticien Hospitalier au CHU de Caen*

*Pour avoir accepté de juger cette thèse et d'en être rapporteur. Recevez mes sincères remerciements.*

*A. Monsieur Pascal Dhulster*

*Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille*

*Pour vos précieux conseils et l'intérêt dont vous avez témoigné tout au long de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.*

*A. Monsieur Francis Goudaliex*

*Pharmacien Responsable, Directeur général des Laboratoires Maco Pharma*

*Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de siéger dans ce jury de thèse. Recevez l'expression de mes plus vifs remerciements.*

*A. Monsieur Didier Guillochon*

*Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille*

*Pour m'avoir guidé et encouragé tout au long de cette thèse, avec toujours beaucoup de gentillesse, de disponibilité et de compétence. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.*

*A. Monsieur Thomas Haertle*

*Directeur de Recherches à l'INRA de Nantes*

*Pour avoir accepté de juger ce travail. Veuillez trouver ici, l'expression de ma considération respectueuse.*

*A. Monsieur Charles Legrand*

*Directeur Général de la Compagnie Générale de Diététique*

*Pour avoir pris le temps de juger cette thèse et pour son soutien financier. Veuillez trouver ici, l'expression de mon profond respect.*

*A toute l'équipe du Laboratoire de Technologie des Substances Naturelles et en particulier à Anne et Bertrand Fertin, pour leur précieuse collaboration et leur sincère amitié.*

*A mon épouse Sophie*

*A mes enfants Marie et Thibault*

*A ma mère*

*A la mémoire de mon père*

*A ma sœur*

*A tous les personnes qui m'honorent de leur amitié*

## Sommaire

<b>Introduction générale.....</b>	<b>4</b>
-----------------------------------	----------

<b>-1<sup>ère</sup> Partie- Rappels bibliographiques sur le métabolisme du fer, la carence en fer et ses différents traitements.....</b>	<b>8</b>
--	----------

-1- REPARTITION ET RÔLE PHYSIOLOGIQUE DU FER.....	9
-2- BESOINS EN FER DE L'ORGANISME.....	11
-3- METABOLISME DU FER.....	13
-4- FACTEURS INFLUENCANT LE METABOLISME DU FER.....	20
-5- LA CARENCE EN FER ET L'ANEMIE FERRIPRIVE.....	25
-6- APPORT DES BIOTECHNOLOGIES DANS L'ELABORATION DE NOUVELLES MOLECULES A BASE DE FER.....	31

<b>2<sup>nd</sup>e Partie : Matériels et méthodes.....</b>	<b>35</b>
--	-----------

-1- MATERIELS.....	36
-2- TECHNIQUES ANALYTIQUES.....	37
-3- PROTOCOLES EXPERIMENTAUX.....	43

<b>3<sup>ème</sup> Partie : Résultats expérimentaux.....</b>	<b>47</b>
--	-----------

-1- PREPARATION A L'ECHELLE PILOTE D'UN HYDROLYSAT D'HEMOGLOBINE BOVINE, ENRICHI EN HEME PAR ULTRAFILTRATION.....	48
-2- ROLE DES PEPTIDES DANS LA SOLUBILISATION DE L'HEME.....	61
-3- MISE EN EVIDENCE DES INTERACTIONS MOLECULAIRES AU SEIN DE L'HYDROLYSAT ENRICHI EN HEME.....	64
-4- CARATERISATION DES INTERACTIONS HEME-PEPTIDES.....	69

**4<sup>EME</sup> PARTIE : RECHERCHE DE METHODES  
ALTERNATIVES POUR AUGMENTER LA TENEUR  
EN HEME DES HYDROLYSATS D'HEMOGLOBINE.....81**

-1- PRECIPITATION PAR LE CHLORURE DE SODIUM ET ELECTRODIALYSE.....82

-2- SURENRICHISSEMENT DE L'HYDROLYSAT PEPTIDIQUE  
HEMIQUE PAR DE L'HEME EXTRINSEQUE.....86

**Conclusion générale.....88**

**Références Bibliographiques.....91**

**Annexe : Publications.....112**

## **Introduction Générale**

L'anémie ferriprive et la carence martiale sont considérées comme un dérèglement nutritionnel majeur et concernent plusieurs centaines de millions d'individus à travers le monde. Si l'étiologie de ces déficits en fer est maintenant bien connue (malnutrition, saignements, parasitoses...), leurs traitements restent néanmoins peu satisfaisants en raison de la difficulté à concilier efficacité et innocuité des sels de fer communément utilisés. En effet, l'intensité des effets secondaires consécutifs à l'administration de fer divalent est généralement proportionnelle à l'efficacité thérapeutique. Certains auteurs recommandent d'administrer le fer pendant ou immédiatement après les repas de manière à minimiser les effets indésirables. Mais l'absorption du fer est alors fortement réduite par la présence de nombreux nutriments qui altèrent la solubilité du fer (polyphénols, phytates, fibres alimentaires...). D'autres auteurs préconisent l'utilisation des sels ferreux en dehors des repas pour en augmenter l'absorption. Il a cependant été démontré que la présence de fer libre dans un estomac vide, augmentait les risques de troubles gastro-intestinaux (diarrhée, constipation, nausée, douleurs épigastriques...) et favorisait la génération d'espèces activées de l'oxygène pouvant être à l'origine de perforations de la muqueuse ou de tumeurs. Pour ces raisons, de nombreuses équipes se sont intéressées à l'élaboration de produits mieux tolérés et/ou mieux absorbés.

Actuellement, deux axes de recherche semblent particulièrement privilégiés pour l'apport de fer. Le premier axe s'oriente vers une complexation du fer minéral à des composés d'origine organique tels que des polysaccharides, des acides organiques ou encore des dérivés protéiques. Le second axe de recherche vise à optimiser l'utilisation du fer héminique. Il est maintenant établi que le fer héminique est bien absorbé chez l'homme et entraîne peu d'effets indésirables. L'hémoglobine bovine constitue donc une source de fer héminique intéressante (sous produit aisé à obtenir à grande échelle et de faible prix de revient). Néanmoins la faible solubilité de l'hème aux pH acides et légèrement alcalins peut affecter l'absorption intestinale du fer héminique. Le procédé qui consiste à extraire l'hème de la protéine, est probablement le moins satisfaisant. En effet, au pH du duodénum, l'hème purifié forme des polymères de poids moléculaire élevé qui limitent considérablement l'absorption intestinale du fer héminique. En revanche, l'utilisation de l'hémoglobine entière s'est révélée particulièrement efficace dans le traitement d'enfants chiliens carencés en fer (Walter et al., 1993). Cependant, cette protéine ne contient que 0,35% de fer (g/g). Aussi, l'administration du fer à dose thérapeutique est-elle susceptible d'engendrer un déséquilibre de la balance protéique, en particulier dans les pays industrialisés où les régimes alimentaires sont déjà très riches en protéines. D'autre part, la faible teneur en fer impose des contraintes évidentes de formulation galénique. Certaines équipes ont donc tenté d'augmenter la proportion de fer en hydrolysant l'hémoglobine. Néanmoins il semblerait que, lors d'hydrolyses très poussées telles qu'elles ont été décrites



dans certains procédés, les peptides liés à l'hème ne puissent pas empêcher l'agrégation des molécules d'hème et favorisent la précipitation de l'hème à pH acide avec pour conséquence une diminution probable de l'absorption du fer héminique.

L'objectif de notre travail a été de mettre au point, à partir de l'hémoglobine bovine des abattoirs, un hydrolysate peptidique enrichi en fer héminique soluble. La préparation de cet hydrolysate repose principalement sur une hydrolyse ménagée de l'hémoglobine par une enzyme physiologique, la pepsine, associée à une étape d'ultrafiltration permettant de concentrer le fer héminique en éliminant les peptides ne contractant pas de liaison avec l'hème. Ce procédé de préparation a été mis au point à l'échelle du laboratoire puis développé à l'échelle pilote. La caractérisation physico-chimique de l'hydrolysate peptidique héminique enrichi en hème nous a permis de mieux appréhender les interactions hème-peptides et les états de complexation de l'hème. Ce travail est décrit dans cinq parties principales.

Dans la partie bibliographique, nous avons rappelé les différents mécanismes impliqués dans le métabolisme du fer et leur intérêt dans le traitement de la carence en fer. Nous avons également fait le point sur les procédés de préparation de produits à base de fer héminique et mis en évidence les difficultés des différents auteurs à obtenir des produits à la fois riches en fer héminique et facilement assimilables.

La seconde partie décrit la mise au point d'un procédé de préparation, réalisé à l'échelle pilote et extrapolable à l'échelle industrielle, d'un hydrolysate d'hémoglobine enrichi en fer héminique soluble et facilement assimilable. Ce procédé, développé dans le cadre d'un partenariat industriel avec la Compagnie Générale de Diététique, met en œuvre une hydrolyse ménagée de l'hémoglobine bovine par la pepsine. Les peptides n'ayant pas d'affinité pour l'hème sont éliminés par ultrafiltration sur une membrane organique. Le rétentat est ensuite séché par atomisation. L'hydrolysate obtenu est deux fois plus riche en fer héminique que l'hémoglobine. L'hème est soluble dans une large gamme de pH, y compris à pH acide où l'hème est habituellement insoluble. L'innocuité et l'assimilation de l'hydrolysate d'hémoglobine enrichi en hème sont rapportées à la fin de ce chapitre.

Les travaux rapportés dans la troisième partie décrivent la sélectivité de la membrane organique vis à vis de l'hème et des peptides au cours de l'étape d'enrichissement en hème soluble. Dans cette étude d'approche plus cognitive, nous avons caractérisé les interactions peptides-peptides, hème-hème et peptides-hème et mis en évidence le rôle de ces associations dans le mécanisme d'enrichissement. Nous avons montré que les interactions

moléculaires jouaient un rôle déterminant dans la sélectivité de la membrane, alors que les interactions des molécules de l'hydrolysate avec la membrane étaient minimales.

Dans la quatrième partie de ces travaux, nous avons essayé de définir la notion de « peptide héminique » et de mieux connaître la nature des associations peptide-hème permettant la solubilisation de l'hème dans ce type d'hydrolysate. Dans ce but, nous avons isolé par HPLC un peptide représentatif de la fraction peptidique du rétentat puis nous l'avons identifié par sa masse et sa composition en acides aminés. Ce modèle nous a permis de caractériser les interactions développées entre ce peptide et l'hème à pH acide et légèrement alcalin. Nous avons montré que dans les hydrolysats d'hémoglobine enrichis en hème, l'association hème-peptide était principalement due à des interactions de type hydrophobe.

La cinquième et dernière partie propose des méthodes alternatives d'enrichissement en hème, extrapolées des études précédentes et basées sur la nature hydrophobe de l'hydrolysate. Nous avons ainsi développé une méthode de précipitation de l'hydrolysate par du chlorure de sodium, suivie d'un dessalage par électrodialyse. Le surenrichissement peut également être obtenu par complexation d'hème extrinsèque aux complexes hème-peptides du rétentat.

**1<sup>ère</sup> partie : Rappels bibliographiques sur le  
métabolisme du fer, la carence en fer  
et ses différents traitements**

## **-1- REPARTITION ET RÔLE PHYSIOLOGIQUE DU FER**

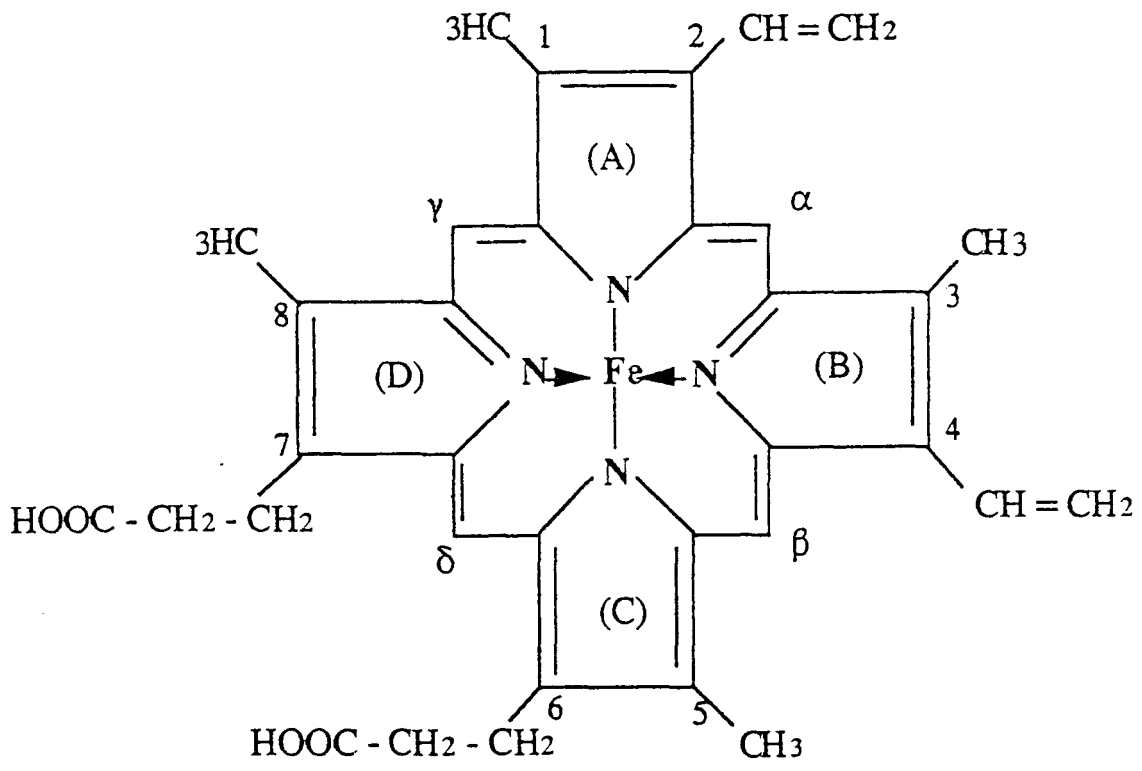
Le fer est un micro-nutriment indispensable à la vie. Comme le résume Jean Lederer, "le fer est l'oligo-élément des oxydoréductions". Il intervient dans la catalyse de nombreuses réactions métaboliques (Weinberg, 1989).

La quantité totale de fer présent dans l'organisme humain varie en fonction du sexe et de l'âge. Chez un homme adulte de 70 kg, elle est évaluée à 4g (soit environ 60 ppm) et représente 0,005% de la masse corporelle. Dans l'organisme, le fer existe sous deux formes : le fer héminique (représentant 70% du pool total), incorporé dans une structure tétrapyrrolique et le fer non héminique.

Le fer héminique intervient principalement dans le transport de l'oxygène et du dioxyde de carbone. Selon Granwick (1954), 66% du fer total entre dans la constitution de l'hémoglobine. Cette hémoprotéine représentant 90% du poids sec des hématies contient un atome de fer lié par des liaisons covalentes ou datives aux quatre sommets azotés des noyaux pyrrole (**Figure 1**). L'oxygène se lie de façon réversible et non covalente à l'atome de fer dans un état divalent. Il existe également une interaction entre l'oxygène et l'histidine distale de la globine qui vient stabiliser la liaison fer-oxygène.

Le fer héminique entre aussi dans la constitution d'une autre hémoprotéine : la myoglobine (pigment respiratoire du muscle) et dans la composition d'un certain nombre d'enzymes. Il peut alors jouer le rôle de transporteur d'électrons au niveau des chaînes respiratoires mitochondriales (cytochromes...) en passant réversiblement de l'état divalent à l'état trivalent (Herberg et al., 1991) ou encore intervenir dans la détoxification des espèces activées de l'oxygène, produites lors des réactions de transfert des électrons libres (catalases, peroxydases...).

Le fer non héminique constitue la forme de transport et de réserve du fer. Le fer non héminique est véhiculé par une protéine plasmatique : la transferrine (80 KDa) dont le rôle principal est d'apporter le fer aux tissus. La transferrine permet également de capter le fer libéré lors de la destruction des hématies et de la dégradation de l'hémoglobine. Le fer de réserve existe dans les tissus sous deux formes très voisines sur le plan structural et fonctionnel. La ferritine (450 KDa) contenant approximativement cinq atomes de fer par molécule est une forme de fer rapidement mobilisable. L'hémosiderrine quant à elle représente la forme de réserve insoluble du fer.

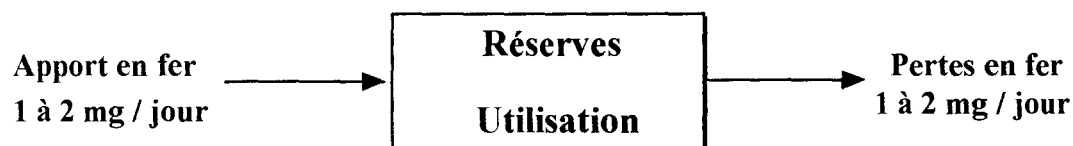


-Figure 1- Structure de l'hème

Les réserves de fer de l'organisme sont localisées au niveau du système réticulo-endothélial, principalement dans le foie, la rate, la moelle osseuse et les muscles squelettiques pour la ferritine et dans le parenchyme hépatique pour l'hémosiderrine. En cas de carence, ce fer de réserve peut être rapidement mobilisé et distribué aux tissus. Inversement, en cas de catabolisme accru de l'hémoglobine, le fer libéré est stocké. Le fer non héminique rentre également dans la structure de diverses enzymes. La répartition et le rôle du fer dans l'organisme sont résumés dans le **Tableau 1**.

## -2- BESOINS EN FER DE L'ORGANISME

La majorité du fer dont l'organisme a besoin quotidiennement provient du fer intrinsèque recyclé. La quantité de fer extrinsèque à apporter chaque jour correspond au fer éliminé (exfoliation des cellules de l'épithélium digestif, desquamation de la peau, excrétion urinaire, menstruation,...) et ne représente que 1/2500 à 1/4000ème du pool total en fer de l'organisme (**Figure 2**). Aussi minime soit-elle, cette quantité de fer extrinsèque est indispensable sous peine de voir s'installer, à terme, un déséquilibre de la balance en fer.



**-Figure 2-** *Balance en fer chez l'homme adulte (d'après Hercborg, 1988)*

Le déséquilibre de la balance en fer peut avoir diverses origines : carence d'apport ou défaut d'absorption, augmentation des pertes, augmentation des besoins... Il est évident que les besoins journaliers en fer seront différents d'un individu à l'autre. Ainsi, une femme en âge de procréer, à cause des menstruations, aura-t-elle des besoins en fer supérieurs à ceux d'un homme adulte. De même, les enfants en pleine croissance, les femmes enceintes ou allaitantes auront un besoin accru en fer (Breton-Gorius et al., 1992). Les besoins en fer et en énergie des différentes tranches de la population sont résumés dans le **Tableau 2**.

	Répartition en poids (mg)	Répartition en pourcentage	Localisation	Fonctions
<b><i>Fer héminique</i></b>				
Hémoglobine	2000 à 2500	65%	Hématies	Transport d'oxygène
Myoglobine	150 à 200	3 à 5%	Coeur, muscles squelettiques	Transport d'oxygène
Cytochromes a-a3			Muscles squelettiques, coeur, foie, cerveau	Oxydase terminale de la chaîne de transport des électrons
Cytochromes b			Coeur	Transport d'électrons
Cytochromes c			Muscles squelettiques, coeur, foie, cerveau	Transport d'électrons
Cytochromes b5			Cerveau, foie	Transport d'électrons de la chaîne microsomale
Cytochrome P 450			Foie, muqueuses intestinales, surrénales	Hydroxylation des stéroïdes, oxydation des composés étrangers
Catalase			Cerveau, foie, hématies	Destruction des peroxydes
Lacto-péroxydase			Lait, sécrétions externes, neutrophiles	Destruction des peroxydes
Tryptophane pyrrolase			Foie	L-tryptophane-formylkynurénine
<b><i>Fer non héminique</i></b>				
Transferrine	3 à 4	0,10%	Plasma	Transport du fer
Ferritine			Tous les tissus	Stockage du fer
Hémosidérine	300 à 1200	30%	Foie, rate, moelle osseuse	Stockage du fer
Lactoferrine			Lait, sécrétions externes	Transport du fer
NADH cytochrome c réductase			Foie, coeur	Système respiratoire mitochondrial
Succinate cytochrome c réductase			Foie, coeur	Système respiratoire mitochondrial
Succinate déhydrogénase			Coeur	Système respiratoire mitochondrial
NADH ferri cyanure oxyréductase			Coeur, foie	Système respiratoire mitochondrial
Aldehyde oxydase			Cerveau, foie	Métabolisme de la sérotonine
Phénylalanine hydroxylase			Foie	Phénylalanine-tyrosine
Monoamine oxydase			Cerveau, foie, plaquettes	Métabolisme des catécholamines
Ribonucléotide réductase			Lymphocytes, tissu hématopoïétique	Synthèse de l'ADN

**Tableau 1 : Enzymes à fer, répartition et fonctions (d'après Herberg 1988)**

Tranche de population (âge et sexe)	Besoins journaliers		
	Fer (a) (mg)	Energie (b) (Kcal)	Fer disponible (mg/1000 Kcal)
<b>Hommes</b>			
1-10 ans	1	1800	0,56
11-18 ans	1,2	2750	0,44
19 ans et +	1	2800	0,36
<b>Femmes</b>			
1-10 ans	1	1800	0,56
11-18 ans	1,5	2200	0,68
19-50 ans	1,5-2,4	2200	0,68-1,09
50 ans et +	1	1900	0,53
Enceintes	4-6	2500	1,6-2,4

**-Tableau 2- Besoins journaliers en fer,**  
*d'après Carpenter et al. (1992) (a), d'après le National Research Council (1989) (b)*

### **-3- METABOLISME DU FER**

Nous avons vu précédemment que pour maintenir la balance en fer équilibrée, il fallait un apport journalier en fer extrinsèque. De nombreuses études ont montré, tant chez l'homme que chez l'animal, que le métabolisme du fer et plus particulièrement son absorption, variait en fonction de la nature du fer alimentaire : fer héminique, fer minéral (Callender et al., 1957 ; Turnbull et al., 1962), mais aussi en fonction de la composition des repas (Disler et al., 1975 ; Sharpe et al., 1990) ou encore du statut en fer des individus (Cook et al., 1990 ; Carpenter et al. 1995). Dans ce chapitre nous décrirons le métabolisme du fer non héminique et celui du fer héminique. Nous étudierons finalement les facteurs susceptibles de perturber le métabolisme de ces deux sources de fer extrinsèque.



### 3.1 La digestion

#### 3.1.1 Le fer non héminique

Il est maintenant couramment admis que pour être absorbé au niveau intestinal, le fer non héminique doit être soluble. Or le fer est rarement apporté sous forme soluble dans l'alimentation. L'étape de digestion, c'est à dire l'étape où les aliments sont dégradés en produits assimilables, semble donc être déterminante pour l'absorption du fer non héminique. En dépit de la faible quantité de fer, absorbée au niveau de l'estomac (Kamino et Ebihara, 1996), la digestion gastrique représente une étape importante pour l'absorption du fer non héminique. Murray et al. (1967) ont démontré chez le rat anémié, qu'une gastrectomie induisait une diminution significative de l'absorption du fer alimentaire. Tovey et al. (1980) confirmèrent ces résultats chez l'homme, dans une étude épidémiologique laissant apparaître une fréquence importante des anémies ferriprives chez les patients gastrectomisés. La solubilisation du fer non héminique dans l'estomac est probablement due au fait que la majorité du fer de l'alimentation est dans un état trivalent ( $Fe^{3+}$ ) donc soluble seulement à pH acide. Ainsi, Skikne et al. (1981), Golubov et al. (1991) et Kim et al. (1993) ont démontré que la prise de médicaments inhibant la sécrétion gastrique (type antihistaminique antirécepteurs  $H_2$ ) diminuait l'absorption intestinale du fer non héminique.

L'activité de la pepsine, liée au pH gastrique, semble également jouer un rôle non négligeable, puisqu'en dégradant les différents aliments, cette protéase acide peut conduire à la formation de ligands qui, selon leur nature, faciliteront ou inhiberont l'absorption du fer. Selon Silbernag et al. (1993), la gastroferrine, glycoprotéine de la muqueuse gastrique, pourrait également affecter l'absorption du fer en fixant une quantité importante de  $Fe^{3+}$ . Au terme de la phase de digestion, le fer non héminique entre dans un pool intestinal commun où il pourra être réduit, chélaté ou insolubilisé.

#### 3.1.2 Le fer héminique

Conrad et al. (1967) ont montré que, contrairement au fer non héminique, l'absorption du fer héminique était peu influencée par la digestion pepsique et par les sécrétions gastriques. Hallberg et al. (1966) ont mis en évidence une absorption normale du fer héminique chez les sujets gastrectomisés. Plus récemment, Favier (1991) constatait que l'absorption du fer héminique n'était pas altérée par l'acide chlorhydrique. Hazel et al. (1978, 1981) ont contesté la passivité de la digestion gastrique dans l'absorption du fer héminique en montrant *in vitro* que la digestion pepsique de l'hémoglobine purifiée pouvait, après neutralisation, former des agrégats de hauts poids moléculaires, peu solubles et relativement résistants à l'action des protéases intestinales. Conrad et al. (1966-1) et Wheby et al. (1970)

ont montré que lors de la digestion de l'hémoglobine, l'hème se détachait de la globine au niveau du duodénum, sous l'action d'enzymes duodénales et plus particulièrement de la trypsine. Conrad et al. (1966-2) ont observé une polymérisation importante de l'hème en l'absence de substance capable de se lier à l'hème. Cette polymérisation de l'hème au pH de l'intestin limite considérablement l'absorption du fer héminique. Ces auteurs ont aussi constaté que certaines substances comme l'histidine, la cystéine, l'acide nicotinique ou les peptides issus de la digestion de la globine étaient susceptibles de solubiliser l'hème sous forme d'hémochromes monomères facilement résorbables. Akoyunoglou et al. (1963) étaient parvenus à des conclusions identiques. Le pool intestinal de fer héminique est donc constitué de fer lié à l'hème. Ce pool est bien distinct du pool de fer non héminique.

### 3.2 L'absorption

Le site d'absorption maximale du fer est commun au fer héminique et non héminique. Il se situe au niveau du duodénum et du jéjunum. En revanche, le mode d'absorption diffère profondément selon la nature du fer.

#### 3.2.1 Le fer non héminique

En moyenne, 10% du fer non héminique est absorbé au niveau de l'intestin (Breton-Gorius, 1992). Cette absorption se déroule en une à deux heures (Silbernag et al., 1993) et peut se décomposer schématiquement en quatre étapes :

##### *3.2.1.1 Liaison du fer à l'entérocyte*

La phase initiale, durant laquelle le fer libéré dans la lumière intestinale vient se fixer au niveau de la bordure en brosse de l'entérocyte, est une étape très rapide.

##### *3.2.1.2 Captation du fer par l'entérocytes*

Le processus exact, selon lequel le fer non héminique pénétrerait dans la cellule épithéliale, reste à ce jour indéterminé. L'hypothèse la plus couramment admise impliquerait deux mécanismes dépendants des statuts en fer de l'organisme (Carpenter 1992). Le premier mécanisme serait un mécanisme passif d'absorption, c'est à dire que la quantité de fer pénétrant l'entérocyte serait directement proportionnelle à la quantité de fer présente dans la lumière intestinale. Ce processus interviendrait pour des statuts en fer normaux. En revanche, en situation de carence, le fer non héminique se fixerait sur des récepteurs situés sur la membrane des entérocytes. Le complexe fer-récepteur traverserait ainsi la membrane des

cellules épithéliales (Albert et al., 1990). Ce second mécanisme actif suivrait une cinétique michaelienne (capacité limitée, saturation, inhibition compétitive). Greenberger et al. (1969) et Kimber et al. (1973) ont montré que le nombre de ces récepteurs était plus important dans la partie proximale de l'intestin grêle que dans sa partie distale. Ceci pourrait justifier la meilleure absorption du fer non hémérique au niveau du duodénum. Ces mêmes auteurs ont également observé une augmentation significative du nombre des récepteurs membranaires chez les animaux anémiés (**Tableau 3**).

Traitement	Cobaye (a)			Rat (b)
	Jours suivant le traitement			
	1	3	4 à 7	4 à 7
<b>Partie proximale</b>				
Normal	100			-
Carencé (saignées)	97	253	369	108
Chargé en fer	105	81	59	60
<b>Partie distale</b>				
Normal	69			47
Carencé	183	198	394	85
Chargé en fer	74	73	65	50

**-Tableau 3-** *Nombre de récepteurs (captation du <sup>53</sup>Fe/g de protéine) au niveau de la membrane entérocytaire en fonction des statuts en fer d'après Kimber et al. (1973) (a) et d'après Greenberger et al. (1969) (b)*

### 3.2.1.3 Transfert du fer non hémérique de la face muqueuse à la face séreuse de l'entérocyte

Les études de Bedar et al. (1971-1973) et Worwood et al. (1971-1972) ont permis de déterminer les sites de fixation du fer dans l'entérocyte. Ces auteurs ont localisé le fer au niveau de la bordure en brosse, du réticulum endoplasmique et du cytosol dans un premier temps. Plus tard, la concentration en fer est maximale dans les mitochondries et les lysosomes. Dans l'entérocyte, le fer cytosolique est rapidement pris en charge par des transporteurs spécifiques jusqu'à la face séreuse. La nature de ces récepteurs n'est pas clairement définie. Huebers et al. (1971) ont identifié deux protéines entérocytaires chez le rat, l'une proche de la ferritine sérique, l'autre proche de la transferrine. Depuis, ces protéines

ont été isolées chez l'homme chez qui elles semblent jouer le même rôle que leurs homologues sériques. Ainsi, la "ferritine" constituerait une forme de réserve, lentement échangeable, du fer intraentérocytaire (Halliday et al. 1976, Huebers et al. 1971) ; alors que la transferrine transporterait le fer pour le libérer rapidement au niveau de la membrane séreuse (Halliday et al. 1976, Johnson et al. 1995, Harris 1995). Huebers et al. (1983) ont proposé le mécanisme de transport suivant : l'apo"transferrine" sécrétée dans la lumière intestinale se complexerait au fer ferrique et pénétrerait dans l'entérocyte par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire. La transferrine traverserait la cellule pour venir libérer le fer au niveau de la membrane séreuse. Le fer serait alors pris en charge par une transferrine plasmatique. Cette hypothèse ne semble pas totalement satisfaisante dans la mesure où les récepteurs de la transferrine n'ont pu être localisés au niveau de la bordure en brosse (site d'absorption du fer) (Anderson et al. 1990, Banerjee et al. 1986, Parmley et al. 1985). D'autres transporteurs potentiels ont été évoqués (Pollack et al. 1976, Yoshimo et al. 1973). Leur rôle chez l'homme n'a pas pu être démontré. Il semble cependant que certains peptides, pouvant lier rapidement et réversiblement le fer, soient capable de transporter le fer dans l'entérocyte (Linder et al. 1975).

#### 3.2.1.4 *Transfert dans le compartiment sanguin*

Le processus de passage à travers la membrane séreuse n'est pas clairement défini. Selon Johnson et al. (1983), une partie du fer cytosolique traverserait la membrane séreuse liée à une transferrine plasmatique, par le biais de récepteurs spécifiques localisés sur la membrane basolatérale, hypothèse partagée par Levine et al. (1984). D'autres auteurs contestent l'importance de la transferrine plasmatique dans le passage de la membrane séreuse. Heilmeyer et al. (1961) n'ont pas constaté de dégradation de l'absorption du fer chez des enfants souffrant d'atransferremie congénitale. Les travaux de Craven et al. (1987) sur des souris hypotransferriques aboutirent aux mêmes conclusions. Ces travaux remettraient en cause le rôle de la transferrine lors du passage du fer vers le compartiment sanguin.

#### 3.2.2 *Le fer héminique*

Il semble n'y avoir qu'une seule voie d'absorption du fer héminique (Conrad et al. 1966-1 et 1967, Hallberg et al. 1967). Le fer héminique pénètre dans l'entérocyte par endocytose sous forme d'un complexe porphyrinique intact (Hallberg et al., 1990). A l'intérieur de la cellule, le fer est séparé de la porphyrine selon un mécanisme enzymatique (Wheby et al. 1970) catalysé par une substance baptisée "heme splitting substance" par Weintraub et al. (1968). Raffin et al. (1974) ont suggéré qu'une hème-oxygénase microsomale pouvait être responsable du clivage fer-porphyrine. Dawson et al. (1970) ont, quant à eux, attribué ce rôle

à la xanthine-oxydase. Le fer d'origine héminique, ainsi relargué dans le cytosol de l'entérocyte, rejoint le fer non héminique dans un pool commun de fer inorganique intraentérocytaire dont le mécanisme d'absorption a été décrit précédemment.

### **3.3 Distribution aux tissus cibles et utilisation**

Il est communément admis que dans le compartiment plasmatique, le fer constitue un pool commun véhiculé par la transferrine et ce, quelque soit l'origine du fer absorbé au niveau du duodénum. Au niveau de la membrane des tissus cibles, la transferrine se fixe sur des récepteurs spécifiques. Le complexe [récepteur-transferrine] pénètre alors dans la cellule par endocytose. D'après les travaux de Young et al. (1981-1984), il semble que la transferrine diférique soit nettement mieux captée par les cellule que la transferrine monoférique ou l'apotransferrine seule. Dans la cellule, le pH bas des lysosomes permet la libération du fer de la transferrine (Morgan 1981 et Iacopetta 1983). L'apotransferrine ainsi libérée, contrairement à d'autres ligands, reste associée à son récepteur (Wada et al. 1979, Klausner et al. 1983) et rejoint le compartiment sanguin. Young (1982) a montré que la transferrine saturée pouvait être aussi excrétée de la cellule sans avoir libéré son fer. Selon la nature du tissu cible, le fer libéré dans la cellule rejoindra les sites de synthèse (hémoglobine, enzymes) ou rentrera dans le pool de réserve (ferritine, hémosidérine).

Plus récemment, Thannoun et coll.(1987), Zhang et coll. (1989) et Kalpalathika (1991), ont remarqué que l'utilisation du fer par les tissus pouvait varier considérablement en fonction de l'origine du fer alimentaire. Ces observations auront certainement un impact important sur la compréhension de la biodisponibilité du fer.

### **3.4 Excretion du fer**

Dans des conditions physiologiques, la quantité de fer excrétée quotidiennement est infime (1/300ème du pool total). Il existe plusieurs voies connues pour l'excrétion du fer.

*Excrétion intestinale du fer* : La majorité du fer retrouvé dans les fèces ne provient pas d'une excrétion à proprement parlé. Il s'agit d'une part, du fer n'ayant pas été absorbé dans l'entérocyte et d'autre part, du fer contenu dans les cellules épithéliales qui se détachent des villosités (Alberts et al., 1990). Il semble cependant que, chez l'homme, une petite quantité de fer puisse être excrétée par les cellules à cryptes du duodénum et la partie supérieure du jéjunum sous forme de ferritine (Refsum et al. 1980).

Excrétion urinaire du fer : Il existe vraisemblablement une infime quantité de fer excrétée dans les urines.

Excrétion sudorale du fer : Brun et al. (1986) ont estimé la concentration en fer de la transpiration à 22,5 µg/litre.

Desquamation : les pertes de fer par desquamation de la peau, des ongles ou des cheveux, sont considérées comme minimes.

Outre ces voies d'excrétion communes à tous les sujets, il faut prendre en considération les pertes de fer dues aux menstruations chez les femmes en période d'activité génitale. Il ne faut pas négliger non plus certains processus pathologiques tels que les hémorragies digestives ou urinaires.

### **3.5 Régulation du métabolisme du fer**

Bien que le mécanisme exact de régulation du métabolisme du fer ne soit pas clairement défini, de nombreux auteurs s'accordent à dire que l'absorption intestinale constitue l'étape majeure de cette régulation (Uchida, 1995 ; Bothwell, 1995 ; Conrad et al., 1993), l'excrétion du fer ne jouant qu'un rôle mineur dans les phénomènes de régulation (Refsun et al., 1984). Il apparaît d'une manière générale que l'état des réserves en fer régit l'absorption intestinale du fer (Dur et al., 1989 ; Lee, 1993 ; Hallberg et Rossander-hulten, 1993 ; Pallares et al., 1993). Ainsi, en cas de déficit en fer ou d'érythropoïèse accrue, l'absorption sera augmentée. Inversement, lorsque les réserves sont saturées, l'absorption du fer est diminuée.

#### 3.5.1 Le fer non héminique

Toutes les étapes de l'absorption intestinale décrites précédemment interviennent dans la régulation du métabolisme du fer non héminique (passage dans l'entérocyte, transfert de la face séreuse vers la face muqueuse, passage dans le compartiment sanguin). Ces étapes répondent de manière concordante à une altération des statuts en fer. Raja et al. (1987-1 et 2) et Silbermag et al. (1993) ont observé *in vitro* et *in vivo* qu'en cas de carence, le passage du fer de la lumière intestinale dans l'entérocyte était augmenté. D'après Greenberger et al. (1969) et Kimber et al. (1973), il existerait une corrélation entre le statut en fer et le nombre de récepteurs membranaires de la bordure de l'intestin grêle, le nombre de ces récepteurs

augmentant pour des réserves diminuées. Le mécanisme selon lequel les cellules de l'épithélium intestinal augmentent la synthèse des récepteurs à la transferrine est encore mal connu. D'après Conrad (1987) et Flanagan (1989), il existerait chez ces cellules une adaptation transcriptionnelle répondant à certains stimuli tels que : hémorragie, carence d'apport ou surcharge en fer (stimulus induisant alors une diminution de la synthèse des récepteurs). L'étape de transfert du fer de la face muqueuse à la face séreuse de l'entérocyte, est également accrue en cas de carence. Quant à la ferritine et à la transferrine sérique, même si elles ne sont pas directement impliquées dans les processus d'absorption, ces deux protéines participeraient activement à la régulation du métabolisme du fer puisque leur biosynthèse est vraisemblablement liée à la quantité de fer présente dans l'entérocyte. Ainsi, Bayner et al. (1987) et Cook et al. (1974) ont estimé qu'il existait une bonne corrélation entre la concentration en ferritine sérique et l'absorption intestinale du fer. De même, une baisse des réserves en fer entraînerait une augmentation de la transferrine et du nombre de récepteurs à la transferrine du compartiment séreux.

### 3.5.2 Le fer héminique

Tout comme le fer minéral, l'absorption du fer héminique est régie par l'état des réserves en fer de l'organisme (Skikne et Baynes, 1994). Bien que toutes les étapes de l'absorption répondent à une modification des statuts en fer, la dissociation hème-fer intraérythrocytaire semble être l'étape déterminante de la régulation du métabolisme du fer héminique. Il faut cependant rappeler que l'absorption du fer héminique dépend moins des statuts en fer de l'individu que celle du fer non héminique (Cook 1990 et Olivares et al., 1993) probablement parce que l'organisme répond en priorité, à une baisse des réserves en fer par une augmentation de la synthèse des récepteurs membranaires à la transferrine et non pas par une augmentation du clivage enzymatique fer-porphyrine.

## **-4- FACTEURS INFLUENCANT LE MÉTABOLISME DU FER**

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'absorption du fer est directement liée à l'état des réserves en fer. D'autres facteurs sont susceptibles de modifier le métabolisme du fer : l'origine du fer (fer minéral, fer organique), la présence de substances capables d'inhiber ou d'accroître l'absorption intestinale du fer.

## 4.1 Influence de l'état des réserves en fer

Nous ne reviendrons pas ici sur l'influence des statuts en fer décrite au paragraphe 3.5.1. Rappelons simplement que le fer est d'autant mieux absorbé que les réserves en fer sont basses.

## 4.2 Influence de la dose administrée

La dose de fer administrée constitue le premier facteur extrinsèque influençant l'absorption intestinale du fer. Le pourcentage de fer résorbé au niveau de l'intestin grêle est d'autant plus faible que la dose administrée est importante (Skiante et Bayes, 1994). Buchowski et al. (1989) ont constaté chez des rats sains et anémiés, une baisse significative du pourcentage d'absorption apparent pour des doses en fer élevées, se traduisant par une diminution sensible du HRE., Ces observations ont été établies quelle que soit l'origine du fer (fer héminique, sulfate de fer, fer d'origine végétale)

## 4.3 Influence des facteurs alimentaires

### 4.3.1 Le fer non héminique

La littérature décrit de nombreuses substances alimentaires capables de perturber l'absorption du fer non héminique en modifiant ses caractéristiques physico-chimiques (solubilité, état d'oxydation...). En règle générale, l'absorption du fer non héminique diminue lorsque le fer est administré au cours d'un repas. Il existe une importante variabilité de l'absorption du fer non héminique. Selon Martinez-Torres et al. (1973), moins de 1% du fer contenu dans le riz est absorbé chez des sujets considérés comme normaux. Magnusson et al. (1981) ont, quant à eux observé, chez des femmes dont les réserves en fer étaient nulles, une absorption de 70 à 75% de la dose de sulfate ferreux administrée. Ces deux exemples extrêmes montrent à quel point l'absorption du fer non héminique est sensible aux facteurs externes. Il est intéressant de noter que cette absorption peut varier considérablement d'un individu à l'autre (Laierais et al., 1969) et pour un même sujet, d'un jour à l'autre (Cool et al., 1969).

#### *4.3.1.1 Activateurs de l'absorption du fer non héminique*

L'acide ascorbique est la substance activatrice la plus puissante connue (Björn-Rasmussen et Hallber, 1974 ; Derman et al., 1980 ; Sayers et al., 1974 et 1973 ; Hallberg, 1986). La prise



d'acide ascorbique (quelques dizaines de mg par repas) permet d'accroître l'absorption du fer non héminique d'un facteur 5 à 10. Le mécanisme d'action de l'acide ascorbique fait intervenir divers phénomènes interdépendants (Conrad et al., 1991 ; Lynch et al., 1980). D'une part, la présence d'acide ascorbique va augmenter l'acidité de l'estomac et permettre une bonne solubilisation du fer alimentaire. D'autre part, l'acide ascorbique réduit le fer soluble en fer ferreux diminuant ainsi les risques de formation d'hydroxydes ferriques insolubles. Finalement, l'acide ascorbique complexe le fer ferrique sous forme d'un chélate stable, soluble à pH acide, facilement mobilisable au niveau de l'intestin et qui reste soluble au pH du duodénum (Clydesdale, 1983 et Fairweather-Tait, 1989). D'autres acides organiques tels que l'acide citrique, l'acide tartrique ou l'acide succinique semblent accroître à un degré moindre l'absorption du fer non héminique (Gillody et al., 1983).

Les protéines d'origine animale (viande et poisson exclusivement) augmentent très significativement (d'un facteur 2 à 3 selon Cook et al. 1976) l'absorption intestinale du fer non héminique (Hallberg, 1981 ; Layrisse et al., 1968 ; Kapsokefalou et Miller, 1993). Monsen et al. (1978) ont estimé qu'un gramme de viande avait le même effet activateur qu'un milligramme d'acide ascorbique. Il existe plusieurs hypothèses quant au mécanisme d'action des protéines d'origine animale. Selon Mac Arthur et al. (1988) et Skikne et al. (1994), la présence de viande dans le tractus digestif permet d'augmenter la production d'acide gastrique de 30 à 40% et d'accroître la production de gastrine, autorisant ainsi une meilleure solubilisation du fer. Taylor et al. (1982) avaient déjà formulé une hypothèse identique à propos des polypeptides, issus de la digestion de la viande. Björn-Rasmussen et al. (1979) avaient contesté l'action de l'acide gastrique. Selon ces derniers auteurs, les peptides issus de la dégradation protéolytique de la viande permettraient la formation de chélates de fer solubles donc plus aisément biodisponibles. Kane et al. (1984) et Pollitz et al. (1988) étaient arrivés aux mêmes conclusions. Récemment, Zhang et al. (1990) ont considéré que les deux phénomènes (augmentation des sécrétions gastriques et effet chélatant) étaient vraisemblablement impliqués dans la solubilisation du fer non héminique.

L'origine des protéines semble déterminante. Kim et al. (1995) et Glahn et al. (1995) ont montré que si les protéines de viande et de poisson augmentaient considérablement l'absorption du fer, les caséines et l'ovalbumine avaient par contre un effet activateur plus modéré et même un effet inhibiteur pour les protéines du jaune d'œuf. L'importance de l'origine des protéines, du degré d'acidité gastrique (i.e. de la digestion protéolytique) et de l'état des réserves en fer, a été confirmée dans une étude récente de Kim et al. (1992). Selon Kim et al. (1991), les substances capables de solubiliser le fer et d'augmenter l'absorption

intestinale sont contenues dans les fractions protéiques hydrolysées de faible poids moléculaire (< 6000 Da). En revanche, les protéines résistantes à la digestion diminuent la solubilité du fer par complexation et réduisent ainsi son absorption (Carpenter et Mahoney 1989, Champagne 1988). Layrisse et coll. (1984), Martines-Torres et al. (1981) et Reddy et Cook (1991) ont attribué cet effet activateur à certains acides aminés (proline, méthionine, histidine, serine, acide glutamique, asparagine et cystéine) ou peptides (glutathion), susceptibles de former des complexes solubles avec le fer minéral. Il semble néanmoins que cette corrélation entre l'environnement en acides aminés et l'absorption du fer ne soit pas systématique puisque Thannoun et coll. (1988) et Cook et al. (1976) ont décrit des absorptions intestinales du fer différentes pour des compositions en acides aminés similaires. Kim et al. (1995) ont également observé que les protéines de jaune d'œuf, pourtant riches en cystéine, induisaient une diminution de l'absorption du fer non hémérique. Ces observations suggèrent que la composition en acides aminés ne peut pas expliquer l'effet inhibiteur de ces protéines.

#### 4.3.1.2 Inhibiteurs de l'absorption du fer non hémérique

Les substances contenues dans les protéines de jaune d'œuf et responsables de la réduction de l'absorption du fer minéral ne sont donc pas les acides aminés mais plus probablement les phosphates (Peters et al. 1971) et la phosvitine (Morris et Greene 1972). Ainsi, Sato et al (1984) ont suggéré que la formation des complexes phosvitine-fer induisait une précipitation du fer dans le duodénum et entraînait, de ce fait, une baisse sensible de l'absorption du fer.

Il existe de nombreuses autres substances inhibitrices de l'absorption du fer non hémérique. Les plus connues et les plus puissantes sont probablement les phytates (Harland, 1989 ; Kim et al., 1993 ; Torre et al., 1991 ; Fox et Tao, 1989) et les polyphénols (tannates). Les phytates, en se complexant d'une part à certains cations (fer, cuivre, magnésium, zinc...) et d'autre part aux fibres ou aux protéines alimentaires, forment des complexes de poids moléculaire élevé, responsables de la diminution de l'absorption du fer (Champagne 1988). Dans le cadre d'une alimentation variée, les complexes fer-phytates sont facilement dissociés en présence de protéines animales ou d'acide ascorbique (Hallberg 1981 ; Harland, 1989 ; Siegenberg et al., 1991 ; Hallberg, 1987 ; Skikne et Baynes, 1994). Il semble donc que si la présence de phytates altère le passage membranaire du fer *in vitro*, elle ne constitue pas un réel problème chez l'homme ou chez l'animal suivant un régime alimentaire équilibré.

Les polyphénols (tanins) présents dans les végétaux tels que le thé, les fruits etc... constituent les seconds inhibiteurs majeurs de l'absorption du fer (Siegenberg et al., 1991 ; Brune et al., 1989 ; Tuntawiroon et al., 1991). Selon Brune et al. (1989), la présence de

groupements galloyle (contenant 3 hydroxyles phénoliques) induirait la formation de complexes fer-polyphénols, susceptibles de se polymériser en complexes insolubles. Tout comme dans le cas des phytates, la présence d'acide ascorbique ou de protéines animales permet de dissocier le fer des polyphénols (Siegenberg et al., 1991 ; Zhang et al., 1988).

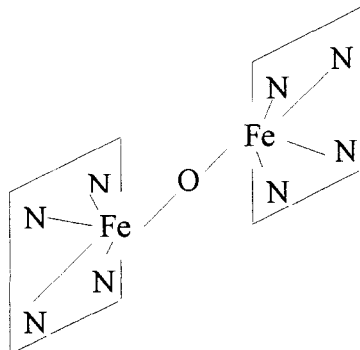
D'autres substances ont été rapportées pour leur effet inhibiteur sur l'absorption du fer non héminique. Citons à titre d'exemples : les boues (Minnich et al 1968), les fibres alimentaires telles que hémicellulose, lignine, pectine, polysaccharides etc... (Torre et al. 1991), les oxalates (Hallberg, 1970 ; Sharpe et al., 1950) dont l'effet inhibiteur reste controversé (Monsen et al., 1978), les tétracyclines (Greenberger, 1967 et Neuvonen, 1970) ou encore les antiacides qui agissent soit en complexant le fer (hydroxyde d'aluminium, carbonate de calcium et trisilicate de magnésie) (Freeman et Ivy, 1942) soit en réduisant l'action des enzymes digestives, par inhibition de la sécrétion d'acide gastrique (antihistaminiques antagonistes des récepteurs H<sub>2</sub>) (Brimblecombe et coll., 1975).

#### 4.3.2 Le fer héminique

De nombreux auteurs parmi lesquels Conrad (1967, 1993) ont montré que contrairement au fer minéral, l'absorption du fer héminique était peu affectée par la nature des repas. Comme nous l'avons précédemment décrit, l'absorption du fer héminique est en partie conditionnée par le degré de polymérisation de l'hème au niveau du duodénum (pH légèrement alcalin). D'une manière générale, les substances capables de maintenir l'hème sous forme monomère favoriseront l'absorption du fer héminique. En revanche, les substances facilitant la polymérisation du noyau porphyrique auront un effet inhibiteur.

##### *4.3.2.1 Activateurs de l'absorption du fer héminique*

Dans les solutions légèrement alcalines, l'hème tend à se polymériser par formation de ponts  $\mu$ -oxo entre les molécules (White 1978).



Cette polymérisation conduit à la formation d'agrégats de poids moléculaire élevé difficilement résorbables. Conrad et al. (1966-1) ont montré *in vitro* que certaines substances telles que l'ammoniaque, l'acide nicotinique ou l'histidine, étaient capables à concentrations élevées de maintenir l'hème sous forme monomère en se coordonnant au fer et d'augmenter ainsi la diffusion du fer au travers de membranes artificielles. Selon les mêmes auteurs, la présence de peptides issus de la digestion de la globine faciliterait également le passage du fer (les meilleurs résultats étant obtenus avec des hydrolysats tryptiques). Ces résultats ont été confirmés par Gérard (1998) qui a observé en ultrafiltration des taux de rétention en hème significativement plus faibles en présence de peptides issus d'un hydrolysat d'hémoglobine bovine. Ce même auteur décrit un passage total de l'hème en présence de ligands forts tels que le cyanure. Conrad et al. (1966-2) avaient obtenu, *in vivo*, des résultats similaires en démontrant que chez le cochon d'Inde, le fer provenant de l'hémoglobine, était 3 fois mieux absorbé que l'hémine libre. Ils avaient également prouvé que l'absorption du fer héminique était encore meilleure lorsque le fer héminique était administré sous forme d'hydrolysat d'hémoglobine (protéolyse par les sécrétions duodénales des animaux).

#### 4.3.2.2 Inhibiteurs de l'absorption du fer héminique

Quelques substances ont été décrites comme inhibant l'absorption intestinale du fer héminique. Parmi les plus étudiées, citons les bicarbonates, les chlorures et les phosphates (Keilin, 1960 ; Conrad, 1966-1). Toutes ces substances agissent en favorisant la polymérisation des molécules d'hème au pH du duodénum. Un effet inhibiteur du calcium a aussi été rapporté par Hallberg et al., (1992). Le calcium, contrairement aux substances précédemment décrites, n'agirait pas au niveau de la lumière duodénale, mais au niveau du transfert intraérythrocytaire.

#### 4.4 Influence de l'âge

Il semble que l'absorption intestinale du fer soit supérieure chez les sujets jeunes (Abish et Whithead, 1994 ; Mira et al., 1996).

### -5- LA CARENCE EN FER ET L'ANEMIE FERRIPRIVE

La notion de carence en fer remonte au 17<sup>ème</sup> siècle, où pour la première fois, Sydenhan (1624-1680) postula que l'anémie de la chlorose était due à une carence en fer et

que cette pathologie qu'il nomma "Iron deficiency anemia" pouvait être corrigée par un apport extrinsèque de fer.

## **5.1 Définitions**

Pendant de très nombreuses années, l'expression "carence en fer" a été amalgamée à l'anémie hypochrome microcytaire. Ce n'est que depuis l'évolution des techniques de dosage des paramètres biologiques que l'anémie a été considérée comme une forme sévère de la carence en fer, précédée par une période souvent longue de carence latente. Le comité de la carence en fer des USA (1968) définit trois degrés de carence selon leur sévérité.

### 5.1.1 La carence en fer prélatente

Elle se traduit par un affaissement des réserves du système réticulo-endothélial (Heinrich 1968) mais n'entraîne aucun signe biochimique de carence ce qui la rend difficilement diagnosticable.

### 5.1.2 La carence en fer

La carence en fer correspond à une chute des réserves en fer de l'organisme (ferritine, protoporphyrine érythrocytaire...). En revanche, le taux d'hémoglobine reste au-dessus des limites inférieures de la normale (Bothwell, 1966 et Verloop, 1970).

### 5.1.3 L'anémie ferriprive

L'anémie ferriprive, la forme la plus sévère de la carence martiale, se traduit quant à elle, par un effondrement des réserves en fer, accompagné d'une chute significative (plusieurs grammes par décilitre chez l'humain) du taux d'hémoglobine circulante. Breton-Gorius et al. (1992) définissent l'anémie ferriprive comme un déficit d'hémoglobine des hématies, secondaire à une carence en fer et réversible après correction de cette dernière.

## **5.2 Détection de la carence en fer**

### 5.2.1 La carence prélatente

La carence prélatente est difficilement diagnosticable puisqu'elle ne se traduit par aucun signe clinique. Les deux techniques les plus fiables pour déceler une carence à ce stade précoce sont d'une part l'évaluation des réserves en fer par biopsie médullaire ou hépatique et d'autre part une exploration dynamique de l'absorption intestinale au <sup>59</sup>Fe. Ces méthodes sont cependant coûteuses, traumatisantes ou difficiles à mettre en œuvre et sont, de ce fait, peu

utilisées. D'autres anomalies biochimiques, telles qu'un affaissement du fer plasmatique, une diminution de la ferritinémie ou plus rarement une augmentation de la protoporphyrine libre intraérythrocytaire, peuvent apparaître dès ce stade.

### 5.2.2 La carence en fer

Le diagnostic de la carence en fer s'établit sur trois paramètres biochimiques : une diminution du coefficient de saturation de la transferrine, une baisse du taux de ferritine sérique et une augmentation de la protoporphyrine érythrocytaire. Notons que ce dernier paramètre n'apparaît en général qu'après environ deux semaines de carence.

### 5.2.3 L'anémie ferriprive

L'anémie ferriprive est plus facile à diagnostiquer puisque les troubles biochimiques importants, tels qu'une baisse du taux d'hémoglobine circulante (Longpré, 1994), une microcytose, une diminution du coefficient de saturation de la transferrine (Wajcman, 1994) ou un affaissement de la ferritinémie s'accompagnent très souvent de signes cliniques tels que pâleur, asthénie, accélération du rythme cardiaque ou essoufflement (Bernard et al., 1996).

## **5.3 Conséquences physiologiques de la carence en fer**

La carence en fer a de nombreux retentissements sur l'activité physiologique humaine ou animale : diminution de la capacité d'effort, dégradation du développement intellectuel, trouble de la croissance, etc... Dans la majorité des cas, ces troubles ont pour origine une altération du transport de l'oxygène aux tissus ou une perturbation des systèmes enzymatiques.

### 5.3.1 Diminution des capacités physiques et du seuil de résistance à l'effort

De nombreuses études ont pu établir une corrélation entre le déficit en fer et la résistance à l'effort. Cette limitation de l'activité physique, qui s'accompagne le plus souvent d'une augmentation de la fréquence cardiaque, s'explique par un dysfonctionnement de la distribution d'oxygène aux tissus musculaires lié à une baisse du taux d'hémoglobine chez les sujets anémiés (Gardner et al., 1977). Cette diminution des performances physiques est rapidement réversible lors de l'administration de fer par voie parentérale. Le retour à une activité normale est un peu plus long (plusieurs semaines) quand le fer est administré par voie orale (Viteri et Torun, 1974 et Ericsson, 1970). Notons que plus l'anémie est sévère, plus les prestations physiques sont réduites (Hunt et coll., 1994 et Ekblom et al., 1972).

La réduction de la résistance physique à l'effort n'est pas exclusivement dépendante du manque d'oxygénation des tissus musculaires. Ohira et al. (1976) ont observé des mesures de performances physiques différentes chez des patients présentant un taux d'hémoglobine normal mais dont la concentration en fer sérique était plus ou moins bas. Des résultats comparables ont été obtenus chez le rat par Wranne et Woodson (1973). Cette diminution de l'activité physique chez les sujets carencés mais non anémiés peut s'expliquer par une chute du taux de myoglobine (Dallman et Schwartz, 1965) et par une altération des systèmes enzymatiques, notamment par une réduction de l'activité du cytochrome c (Salmon 1962, Haggler et al. 1981).

D'autres systèmes enzymatiques ont été mis en cause. Ainsi, un déficit en fer diminuerait l'activité de la glycérophosphate oxydase mitochondriale du muscle squelettique (Finch et al., 1976) et induirait un excès d'acide lactique (perturbation de la glycolyse) qui provoquerait une baisse de l'activité physique. En règle générale, la carence en fer entraîne une réduction significative de l'activité des enzymes respiratoires des muscles squelettiques décrits dans le **Tableau 1**.

### 5.3.2 Diminution des facultés intellectuelles et modification du comportement

Des troubles fréquents du comportement ont été rapportés chez l'adulte à la suite d'un déficit en fer : apathie, somnolence, baisse de la vigilance, difficulté à se concentrer... (Pollitt et Leibel, 1976). Cependant, il n'a jamais été démontré que ces troubles étaient directement liés à la carence en fer (Helwood et Hugues, 1970). Bien qu'encore mal établie, cette relation de cause à effet semble plus évidente chez l'enfant, chez qui les enzymes à fer jouent un rôle crucial dans le développement du cerveau et dans la synthèse de certains neurotransmetteurs tels que les catécholamines (**Tableau 4**).

Selon Pollitt (1993), la gravité des troubles du comportement est davantage liée à la durée de la carence qu'à son degré de sévérité. Ainsi une diminution des performances intellectuelles et un trouble du comportement (somnolence, inattention) peuvent être observés lors d'une carence en fer sans anémie (Felt et Lozoff, 1996). Il semble, néanmoins, que la correction des anomalies par supplémentation martiale soit plus rapide chez les enfants faiblement carencés que chez les sujets anémiés (Osiki et coll. 1983, Walter et coll. 1983).

La carence en fer pourrait induire une baisse du nombre de récepteurs à la dopamine D<sub>2</sub> fer-dépendants, situés dans le cortex (Leibel et al., 1979, Youdim, 1988-1990 et Youdim et al.,

1989). L'altération de la transmission de la dopamine, associée à une diminution de la synthèse de certains neurotransmetteurs, pourrait aboutir chez l'enfant à l'apparition précoce de troubles psychomoteurs.

### 5.3.3 Risques chez la femme enceinte

Au cours de la grossesse, les besoins en fer sont considérablement augmentés : augmentation du volume plasmatique, vascularisation importante du placenta, développement du fœtus... Aussi est-il très fréquent de constater un effondrement des réserves en fer chez la femme en fin de grossesse. Cette déplétion des réserves en fer, accompagnée ou non d'une chute du taux d'hémoglobine, augmente très significativement les risques d'accouchement prématuré (Scholl et al., 1992 ; Allen, 1993). De nombreux auteurs ont également établi une corrélation entre l'état des réserves en fer de la mère et le poids de naissance des nourrissons nés à terme (Higgins et al., 1982). Ces risques semblent d'autant plus élevés que la carence en fer apparaît précocement au cours de la grossesse (Scholl et Hediger, 1994).

Outre les troubles majeurs précédemment décrits, la carence en fer peut être à l'origine de nombreux dysfonctionnements : trouble de l'immunité (Vyas et al., 1984 ; Berger et al., 1992 ; Yip et Mehra, 1995), lésions des ongles et des phanères (Lederer, 1940), sécheresse de la peau, lésion des muqueuses buccales (Whitby et Britton, 1963) et plus rarement nasale (Barkve et coll. 1968), œsophagite (syndrome de Kelly-Paterson), gastrite (Breton-Gorius, 1992), altération du goût, dysphagie (Navarro et al., 1993), ménorragies (Heilmeyer et Plötner, 1937)...



	Sites spécifiques	Impact au niveau du SNC
Synthèse de l'hème	Synthèse des porphyrines	Toxicité ou déficience intracellulaire
	Cytochromes mitochondriaux (c, oxydase)	Respiration, phosphorylation oxydative
	Cytochromes microsomaux (P 450, b 5)	Toxicité
Cycle de Krebs	Succinate déhydrogénase (Fe-S flavoprotéine), aconitase (Fe cofacteur)	Respiration
Fe-S flavoprotéines	NADH-ubiquinone réductase, alpha-glycérophosphate déhydrogénase	Respiration, Phosphorylation oxydative
Acides nucléiques	Synthèse de DNA, mitose	Croissance cérébrale
Catécholamines	Phénylalanine hydroxylase, tyrosine hydroxylase, monoamine oxydase	Taux de neurotransmetteurs
Sérotonine	Tryptophane pyrrolase, tryptophane hydroxylase, aldehyde oxydase	Taux de neurotransmetteurs
Acide folique/vitamine B 12	Formimino transférase, THF méthyl transférase	

**-Tableau 4- *Impact de la carence en fer au niveau du système nerveux (d'après Leibel et al., 1982)***

#### 5.4 Traitement de la carence en fer

Le traitement de la carence en fer doit répondre à deux impératifs : un diagnostic clairement posé, après enquête et examen clinique complet, et un traitement bien adapté alliant efficacité, innocuité et prix de revient.

Actuellement, il existe de nombreuses préparations visant à prévenir ou à corriger la carence en fer. Les sels de fer divalent (sulfate, fumarate, succinate, citrate) sont parmi les plus utilisés en raison de leur faible prix de revient. Malheureusement, l'utilisation de ces sels reste peu satisfaisante en raison de la difficulté à concilier efficacité et innocuité. Ainsi, Sölvell (1970) considère que l'intensité des effets secondaires consécutifs à l'administration de fer divalent est généralement proportionnelle à l'efficacité thérapeutique. Certains auteurs recommandent d'administrer le fer pendant ou immédiatement après les repas de manière à minimiser les effets indésirables, mais l'absorption du fer est alors réduite de 50% (Brise et

Hallberg 1962). D'autres, tels que Grebe et al. (1975), préconisent l'utilisation des sels ferreux en dehors des repas pour en augmenter l'absorption. Il a cependant été démontré que la présence de fer libre dans un estomac vide augmentait les risques de troubles gastro-intestinaux (diarrhée, constipation, nausée, douleurs épigastriques...) et favorisait la génération d'espèces activées de l'oxygène. Pour ces raisons, de nombreuses équipes se sont intéressées à l'élaboration de produits mieux tolérés et/ou mieux absorbés.

## **-6- APPORT DES BIOTECHNOLOGIES DANS L'ELABORATION DE NOUVELLES MOLECULES A BASE DE FER**

### **6.1 Approche générale**

La mise en œuvre des biotechnologies dans la fabrication de nouvelles molécules à base de fer, a pour but, d'une part d'augmenter la biodisponibilité du fer et, d'autre part d'atténuer les effets indésirables rencontrés avec les sels de fer. Certains auteurs ont choisi de complexer le fer minéral à des composés d'origine organique souvent considérés comme promoteurs de l'absorption intestinale du fer minéral. Ainsi, Di Schiena (1993), a proposé de complexer le fer (apporté sous forme de  $\text{FeCl}_3$ ) avec des sulfomucopolysaccharides (sulfate d'héparine) en milieu aqueux à pH 6-7. Le mélange était ensuite versé lentement dans de l'éthanol à 95% sous agitation constante. Le complexe ferrique précipité, contenant 6 à 10% (g/g) de fer, est alors récupéré par filtration puis séché.

D'autres auteurs ont associé les sels de fer à des protéines ou à des dérivés protéiques. Tanaka et al. (1991) préparent des boissons à base d'un complexe fer-lactoferrine. Ferrari et al. (1993) obtiennent un produit pouvant contenir jusqu'à 30% (g/g) de fer en complexant le fer à de la conalbumine ou à ses dérivés acétylés et succinylés. Sportoletti et al. (1983) ont également décrit une complexation du fer à des protéines succinylées. Dans ce procédé, les protéines du lait, en solution dans du bicarbonate de sodium, étaient préalablement traitées par de l'anhydride succinique à pH 7,5-8 pendant 2 heures. Le pH du mélange était abaissé à 3 et le précipité était récupéré par centrifugation ou filtration. Les protéines succinylées étaient alors remises en solution à pH 7,5 et complexées à des sels de fer tels que  $\text{FeCl}_3$  puis séchées. La teneur finale en fer était de 10% (g/g). Les études chez le rat anémié (Caramazza et al., 1990) et chez l'homme (Najean et al., 1995) ont montré que l'activité thérapeutique du fer des protéines succinylées était semblable à celle observée avec le sulfate de fer. En revanche, les sujets traités par les protéines succinylées

présentaient beaucoup moins de troubles gastro-intestinaux que ceux traités par le sulfate de fer.

Nakanishi et Kitada (1993) ont décrit la préparation de complexes fer-dérivés pectiques, facilement biodisponibles et bien tolérés. Les dérivés pectiques ont été obtenus par hydrolyse enzymatique (pectinase) de la méthoxylpectine à 40° C pendant 10 heures. L'hydrolysate était ensuite ultrafiltré et le filtrat est traité par du sulfate de fer pendant 10 minutes à température ambiante.

Une autre tendance vise à optimiser l'utilisation du fer héminique puisqu'il est maintenant établi que le fer héminique est bien absorbé chez l'homme et entraîne moins d'effets indésirables que le fer minéral.

## **6.2 Transformation des hémoprotéines**

Les procédés les plus simples décrivent des préparations à base de sang ou de cruor séché, présentées sous forme de gélules ou incorporées dans des préparations culinaires. Walter et al. (1993) ont utilisé avec succès des biscuits renfermant 6% de concentré d'hémoglobine bovine, dans une campagne de prévention des carences martiales chez les enfants chiliens. Néanmoins, la faible teneur en fer dans l'hémoglobine (0,35% g/g) limite considérablement son utilisation puisqu'elle apporte une charge protéique très importante pour une faible quantité de fer.

Certaines équipes ont donc tenté d'augmenter la teneur en fer en dissociant l'hème de la globine. Ce clivage peut être obtenu par des solvants organiques. Dans le procédé décrit par Luijterink (1983), l'hémoglobine était mise en contact avec un mélange méthanol-éthanol ou méthanol-eau, chauffé à 50° sous agitation. Le mélange ainsi obtenu était additionné, toujours sous agitation, à un mélange de solvant et d'acide chlorhydrique. L'hème était alors séparé de la fraction protéique par un système d'hydrocyclones. Lindroos (1981) a extrait l'hème en traitant l'hémoglobine par des solvants alcooliques ou cétoniques en milieu acide. L'originalité du procédé résidait dans le fait que l'auteur complexait préalablement le fer de l'hémoglobine avec de l'imidazole ou des dérivés imidazoliques, tels que la carnosine ou la pilocarpine, pour empêcher l'hème purifié de polymériser. Cette technique lui a permis de revendiquer l'obtention d'un concentré contenant 3 à 4% de fer (g/g) et montrant une bonne biodisponibilité.

Le clivage hème-protéine peut également être réalisé par hydrolyse de l'hémoglobine en milieu acide (Autio, 1983). Dans ce procédé, un concentré d'érythrocytes de porc, était dilué avec de l'eau jusqu'à une concentration finale en hémoglobine de 6-7%, puis ajusté à pH 2 avec de l'acide chlorhydrique. L'hème était ensuite précipité par complexation à de la carboxyméthyl-cellulose (rapport hémoglobine/carboxyméthyl-cellulose de 5 à 200, g/g), puis récupéré par centrifugation alors que la globine en solution dans le surnageant était concentrée par ultrafiltration.

Mitsubishi Chemical Industry a fabriqué une poudre d'hème en hydrolysant l'hémoglobine bovine par l'alcalase en milieu basique. Le pH était ensuite abaissé par de l'acide chlorhydrique ; l'hème insolubilisé était récupéré par centrifugation, lavé puis séché pour être conditionné sous forme de pilules (1987) ou incorporé à du chocolat pour masquer le goût et la couleur brune (1984).

Eriksson (1981) a décrit un procédé très similaire à celui de Mitsubishi Chem. Ind., mais revendiquait non plus l'obtention d'hème purifié mais d'un hydrolysate d'hémoglobine enrichi en fer héminique et dont l'assimilation serait favorisée par les peptides de l'hydrolysate. Dans ce procédé, le cruor était hémolysé, la solution d'hémoglobine ainsi obtenue était dénaturée à pH 11 puis hydrolysée à un pH compris entre 7,5 et 9 selon la protéase utilisée (papaine, neutrase ou alcalase<sup>®</sup>). Après hydrolyse, le pH était abaissé à 4,5 par de l'acide chlorhydrique. La fraction peptidique insoluble contenant l'hème était alors récupérée par centrifugation. L'hydrolysate pouvait également être ultrafiltré à pH 7,6 sur des membranes de type fibres creuses, de seuil de coupure 10 000 Da ou 50 000 Da ; le choix du seuil de coupure étant important pour retenir un maximum de fer héminique dans le rétentat. Les protéases étaient inactivées par traitement thermique et la fraction enrichie en hème était stabilisée par séchage. La teneur en fer héminique du produit pouvait atteindre près de 2% (g/g) par ultrafiltration et jusqu'à 4% (g/g) par précipitation-centrifugation. Eriksson revendiquait une bonne solubilité de l'hème dans la fraction enrichie alors que l'hème précipitait entièrement à pH 4,5. Nous savons que les hydrolysats peptidiques héminiques, issus d'une hydrolyse poussée de l'hémoglobine, sont très peu solubles à pH acide. Selon Sannier (1992), plus de 80% de l'hème contenu dans un hydrolysate pepsique d'hémoglobine bovine précipite à pH 3. D'autre part Eriksson ne décrivait pas l'état de l'hème en solution à pH basique. Gérard (1998) a montré qu'après hydrolyse de l'hémoglobine par l'alcalase à pH 9, la quasi-totalité de l'hème était sous forme de polymères.

En raison de la psychose créée par la maladie de Crofeld-Jacob, qui a fortement discrédité les produits d'origine bovine, certains auteurs ont recherché d'autres hémoprotéines

pour la préparation du fer héminique. Le Cœur (1997) a proposé de valoriser un sous-produit de pêche, en préparant des peptides héminiques par hydrolyse de la myoglobine de thon. Le muscle rouge était dans un premier temps broyé dans un système biphasique (5% de phosphate de potassium, 19% de polyéthylène glycol, 55% d'eau et 21% de thon). Après centrifugation, la phase aqueuse, contenant les protéines hydrophiles, était éliminée alors que les protéines hydrophobes étaient récupérées dans la phase organique à laquelle était additionné 8% (g/g) de phosphate. Après centrifugation, les protéines du surnageant ont été filtrées sur celite pour éliminer les graisses et ultrafiltrées sur des membranes organiques de seuil de coupure 10 KDa. La myoglobine ainsi purifiée était hydrolysée par la pepsine à pH 2 et 40°C. L'hème libre hydrophobe était éliminé dans la phase organique d'un système biphasique alors que l'hème lié aux peptides était récupéré dans la phase aqueuse.

Les procédés décrits précédemment montrent bien la difficulté à concilier d'une part un produit riche en hème et d'autre part une bonne biodisponibilité du fer, puisque l'enrichissement en hème est très souvent obtenu par une phase de précipitation qui montre les limites de la solubilité de l'hème.

## **2<sup>nd</sup>e Partie : Matériels et méthodes**

## **-1- MATERIELS**

### **1.1 Sang**

Le sang d'origine bovine provient des abattoirs VEOS Ltd (Belgique)

### **1.2 Hydrolyses enzymatiques**

Les enzymes utilisés pour hydrolyser l'hémoglobine sont :

- ⊛ Pepsine A, EC 3.4.23.1, isolée de la muqueuse d'estomac de porc, activité spécifique : 2200 UI/mg de protéine (Sigma Chemical Co, St Louis, MO).
- ⊛ Alcalase<sup>®</sup> (subtilisine Carlsberg), EC.3.4.21.14, activité spécifique 0,6 Unité Anson/g 0,6 L (Novo Industry, Copenhague, Danemark).
- ⊛ Papaine, EC.3.4.22.2 (Coopérative Pharmaceutique Française, Melun, France).

L'hydrolyse pilote est réalisée dans un réacteur enzymatique à paroi double enveloppe en inox, de contenance 100 litres (Inceltech, Toulouse, France). La régulation du niveau, du pH et de la température est assurée par un boîtier de contrôle électronique LH SGI (Inceltech, Toulouse, France).

Les hydrolyses à l'échelle du laboratoire sont réalisées dans un réacteur enzymatique à paroi double enveloppe en verre, de contenance 3 litres. Le pH est maintenu constant à l'aide d'un titroprocessor Metrohm 665 (Roucaire, France).

### **1.3 Centrifugation**

Les étapes de centrifugation sont effectuées sur :

- ⊛ Centrifugeuse Jouan, à l'échelle du laboratoire.
- ⊛ Séparateur SAOOH monté en clarificateur (Westfalia, Hoelde, Allemagne), à l'échelle pilote.

## 1.4 Membranes d'ultrafiltration

Les études d'ultrafiltration sont réalisées avec deux types de membrane :

- ⊛ Une membrane hydrophile en cellulose régénérée, de seuil de coupure 10 kDa, de surface 0,3 m<sup>2</sup>, montée sur un module spiralé hélicon (Millipore Corporation, Bedford, MA).
- ⊛ Une membrane hydrophile en polyethersulfone modifié, de seuil de coupure 10kDa, de surface 0,42 m<sup>2</sup> (centrasette cassette, Pall-Filtron, Northborough, MA), montée sur un module plan Pelicon.

## 1.5 Atomisation

L'atomisation de l'hydrolysats peptidique héminique est réalisée dans un atomiseur pilote type Minor production (Niro, Copenhague, Danemark).

## 1.6 Electrodialyse

L'électrodialyseur Eurodia 2B - 10 cellules (Eurodia), utilisé pour le dessalement des hydrolysats enrichis, est équipé de membranes échangeuses d'ions CMX SB 12 (membrane cationique) et AMX SB 10 (membrane anionique), de surface active de 2 dm<sup>2</sup> (Neosepta, Tokuyama Soda, Japon).

## -2- TECHNIQUES ANALYTIQUES

### 2.1 Dosage de l'hémoglobine

L'hémoglobine est dosée par la méthode à la cyanméthémoglobine (Crosby et al., 1954). Cinquante microlitres de la solution d'hémoglobine sont ajoutés à 12,5 ml d'une solution composée de phosphate monopotassique (197 mg/l), de cyanure de potassium (50 mg/l) et de ferricyanure de potassium (200 mg/l). Après 5 minutes, l'absorbance de la solution de cyanméthémoglobine est lue à 546 nm contre la solution contenant le cyanure de potassium. Le **Tableau 5** donne la correspondance entre l'absorbance à 546 nm et la concentration en hémoglobine.



$A_{546nm}$	[hémoglobine] (g/100 ml)	$A_{546nm}$	[hémoglobine] (g/100 ml)	$A_{546nm}$	[hémoglobine] (g/100 ml)
0.295	10.9	0.360	13.2	0.425	15.6
0.300	11.0	0.365	13.4	0.430	15.8
0.305	11.2	0.370	13.6	0.435	16.0
0.310	11.4	0.375	13.8	0.440	16.2
0.315	11.6	0.380	14.0	0.445	16.4
0.320	11.8	0.385	14.2	0.450	16.6
0.325	12.0	0.390	14.3	0.455	16.7
0.330	12.1	0.395	14.5	0.460	16.9
0.335	12.3	0.400	14.7	0.465	17.1
0.340	12.5	0.405	14.9	0.470	17.3
0.345	12.7	0.410	15.1	0.475	17.5
0.350	12.9	0.415	15.3	0.480	17.7
0.355	13.1	0.420	15.5		

**-Tableau 5- Correspondance entre la concentration en hémoglobine et l'absorbance à 546 nm de la solution d'hémoglobine**

## **2.2 Détermination du degré d'hydrolyse par la méthode à l'acide trinitro benzène sulfonique (Méthode d'Addler-Nissen, 1979, légèrement modifiée)**

L'acide trinitro benzène sulfonique (TNBS), en présence d'amine primaire et en milieu légèrement alcalin, forme un chromophore dont l'absorption maximale se situe à 340 nm. Quatre millilitres d'acide trichloracétique à 5% (TCA) sont ajoutés à 1 ml d'hydrolysats. L'ensemble est centrifugé à 3500 tr/min pendant 15 min. L'opération est renouvelée avec 1 ml du surnageant. Après centrifugation (3500 tr/min pendant 15 min), le surnageant est filtré sur un filtre 0,45  $\mu$ M. Deux millilitres de tampon phosphate de sodium 0,2125 M, pH 8,2 et 2ml de TNBS à 0,1% (m/v) sont additionnés à 250  $\mu$ l de surnageant. La gamme étalon est réalisée à partir d'une solution mère de leucine 0,5 mM, diluée dans le même tampon phosphate. Les échantillons sont placés à 50°C dans l'obscurité pendant 60 min. La réaction est arrêtée par addition de 4 ml d'HCl 0,1 N. La lecture s'effectue à 340 nm contre un blanc obtenu à partir de 1 ml d'hémolysat traité de la même façon que les échantillons.

Le degré d'hydrolyse, représentant le nombre de liaisons peptidiques hydrolysées par rapport au nombre de liaisons peptidiques totales, est calculé selon la formule :

$$DH = [\text{nmoles Leucine} \times D \times 10^{-9}] / [m \times (568/64500)]$$

D : dilution

m :  $c \times 0,25 \text{ ml} \times 10^{-9}$  (c = concentration en hémoglobine en g/l)

568 : nombre totale de liaisons peptidiques dans l'hémoglobine bovine

64500 : masse moléculaire de l'hémoglobine bovine

### 2.3 Dosage des protéines et peptides par la méthode de Kjeldahl

Les concentrations en protéine et en peptide sont déduites de la concentration en azote protéique déterminée par la méthode de Kjeldahl (Association of Official Analytical Chemistry, 1975). Dans le cas des protéines animales, le facteur de conversion est de 6,25. Les échantillons à doser (100 à 200 mg de protéine) sont minéralisés pendant 95 min (20 min à 250°C et 75 min à 380°C) en présence de 15 ml d'acide sulfurique concentré et d'une pastille de catalyseur (Merck). Après refroidissement et addition de 30 ml d'H<sub>2</sub>O, les échantillons sont distillés par 120 ml de soude concentrée, pendant 8 min, dans un appareil Vapodest 3 automatic (Gerhardt). L'azote organique des échantillons est transformé en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> lors de la minéralisation et en NH<sub>4</sub>OH lors de la distillation. L'ammoniaque est alors neutralisée par 40 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 N. L'acide sulfurique en excès est titré en retour par NaOH 0,1 N. La masse de protéine en mg est déterminée par la formule suivante :

$$M_{\text{protéine}} = N_{\text{NaOH}} \times (V_B - V_E) \times 14 \times 6,25$$

V<sub>B</sub> : Volume de soude versé pour le blanc

V<sub>E</sub> : Volume de soude versé pour l'échantillon

### 2.4 Dosage de l'hème par la méthode à l'hémochromogène (Paul et coll., 1943)

L'hémochromogène est une molécule formée par la complexation de 2 bases azotées (pyridine) sur une ferroporphyrine. Quatre vingt microlitres d'échantillon sont ajoutés à 4 ml d'un mélange pyridine-NaOH 1M (25/75 ; v/v), préparé extemporanément. Au moment de lire l'absorbance, un cristal de dithionite de sodium est ajouté au milieu pour réduire le fer. L'absorbance du chromogène formé est lue à 526 nm contre un blanc contenant la solution de pyridine. La concentration en hème est déterminée à partir d'une gamme étalon d'hémine (Sigma), traitée dans les mêmes conditions que les échantillons.

## **2.5 Dosage du fer par spectrométrie d'émission atomique**

Le fer des différents échantillons est dosé par spectrométrie d'émission atomique à couplage inductif. Après minéralisation par voie humide à 150°C, dans des béchers en téflon contenant un mélange acide nitrique pur/acide perchlorique pur (10ml / 2ml), les échantillons sont remis en solution dans 50 ml d'H<sub>2</sub>O (environ 10 ppm de fer) puis nébulisés dans une torche à plasma d'argon. Le fer à l'état atomique est alors détecté à 259,94 nm (raie d'absorption la plus sensible) sur un spectrophotomètre ARL 3510 ICP (Perkin-Elmer).

## **2.6 Electrophorèse en gel de polyacrylamide SDS**

La technique utilisée est l'électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS appliquée aux oligopeptides, décrite par Anderson (1983) et légèrement modifiée. Le gel de polyacrylamide est constitué de deux parties. Le gel de concentration (5 ml) contient 2,5% d'acrylamide / 0,625% de bis acrylamide / 0,2 M de tampon TRIS-HCl pH 7,8 / 0,04% de SDS et 2% d'une solution de persulfate d'ammonium 2,4% préparée extemporanément. Le gel de séparation (23,5 ml) contient 15% d'acrylamide / 1% de bis acrylamide / 0,2 M de tampon TRIS-HCl pH 7,8 / 0,04% de SDS et 2% de la même solution de persulfate. La polymérisation des gels est obtenue par addition de 12 µl de Temed (Sigma) pour le gel de séparation et 5µl pour le gel de concentration. Les échantillons dilués dans une solution dénaturante contenant 0,2M de tampon TRIS-HCl pH 7,8 / 10% de glycerol / 0,01% de bleu de Bromophenol / 0,1% de SDS et finalement 6M d'urée, sont dénaturés 3 minutes au bain-marie à 100°C et déposés (10µg) dans les puits du gel. Après migration 4 heures sous une intensité de 40 mA, les constituants du gel sont lavés 1 heure dans une solution méthanol/eau/acide acétique (45/45/10, v/v/v) puis colorés pendant une nuit dans une solution contenant 0,1% de bleu de Coomassie (Serva, Heidelberg, Allemagne) dans un mélange méthanol/eau/acide acétique/acide picrique 0,1M (9/9/2/80, v/v/v/v). Finalement, la décoloration est réalisée par trempages successifs dans un bain d'acide acétique 10%. Des témoins de masse moléculaire (Sigma) sont traités dans les mêmes conditions.

## **2.7 Chromatographie basse pression d'interaction hydrophobe**

Cette technique utilise les caractéristiques hydrophobes des protéines et des peptides. La matrice est composée de ligands hydrophobes (l'hémine dans notre étude) capables d'interagir avec les zones hydrophobes exposées des protéines et des peptides. En général, le

caractère hydrophobe des peptides est augmenté par la présence de sels type "salting out" à concentration élevée (NaCl 3M dans notre étude).

Six milligrammes d'hydrolysats décolorés, en solution dans 250 µl de tampon borate 40 mM à pH 8,5 contenant 3M de NaCl, sont filtrés sur filtre 0,2µm et injectés sur une colonne d'hémimine-agarose (Sigma) (50 x 5,6 mm) équilibrée par la même solution (tampon borate/NaCl). Les fractions peptidiques retenues sur la colonne sont éluées avec un débit de 10 ml/h par 100 ml d'un gradient linéaire décroissant ( NaCl 3M à NaCl 0M). Les fractions les plus hydrophobes sont éluées par 50 ml d'une solution d'urée 6M en isocratique. L'absorbance est mesurée à 226 nm sur un détecteur Uvicord S II (Pharmacia-LKB).

## **2.8 Chromatographie liquide haute performance de phase inverse (RP-HPLC)**

L'analyse RP-HPLC de l'hydrolysats peptidique héminique est effectuée sur une chaîne LKB équipée d'un système de pompes 2150 LC et d'un contrôleur 2152 LC. Après filtration sur filtre 0,2 µm, les échantillons (200 µg de peptides dans 100 µl d'H<sub>2</sub>O / TFA 0,1%, p/v) sont séparés sur une colonne de phase inverse Vydack (Hesperia, CA) C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm et taille des particules de 5µm), à 45°C et à un débit de 1ml/min. La phase mobile est constituée d'H<sub>2</sub>O / TFA 0,1% p/v (éluant A) et d' acétonitrile / TFA 0,05% (éluant B). L'éluion est réalisée par un gradient linéaire passant de 1 à 60% d'éluant B en 60 min. L'absorbance est détectée à 226 nm sur un détecteur Uvicord 2510 (Pharmacia LKB).

## **2.9 Gel filtration par chromatographie basse pression**

Les fractions peptidiques décolorées issues de l'hydrolysats sont séparées par gel filtration sur une colonne de Sephadex G<sub>50</sub> (34 x 2.5 cm) de qualité superfine (Pharmacia), équilibrée avec un tampon borate de sodium 40 mM à pH 9. Les échantillons (100 mg) sont remis en solution dans 2 ml du même tampon et filtrés sur filtre 0,2 µm avant d'être injectés. L'éluion est réalisée avec le tampon borate à un débit de 15 ml/h. L'absorbance est mesurée à 226 nm sur un détecteur Uvicord S II (Pharmacia-LKB).

## **2.10 Analyse des acides aminés**

Les fractions peptidiques sont hydrolysées pendant 24 heures, à 100°C, dans l'acide chlorhydrique contenant 1% de phénol, (station Pico-Tag, Waters, Milford, USA). Les échantillons sont dérivatisés en présence de phenylisocyanate (PITC, Pierce), selon la

méthode décrite par Bidlingmeyer et al. (1984). Les échantillons séchés sont dilués dans un mélange H<sub>2</sub>O/acétonitrile 80/20 (v/v). L'analyse HPLC en phase inverse est réalisée sur une colonne de phase inverse Pico-Tag à un débit de 1 ml/min. L'absorbance est mesurée à 254 nm.

## 2.11 Spectrométrie de masse

La masse moléculaire du peptide purifié est déterminée par spectrométrie de masse, avec source d'ionisation "electrospray".

### 2.11.1 Principe

Les échantillons infusés sont, dans un premier temps, nébulisés à la pointe d'une aiguille maintenue à un potentiel élevé (3 à 6 kV) avec une assistance coaxiale d'air comprimé facilitant la nébulisation. Les ions multichargés ou non sont produits à partir des gouttelettes ionisées. Les ions ainsi formés entrent ensuite dans l'analyseur de masse par un orifice sous vide de 10<sup>-5</sup> torr. Un rideau d'azote empêche la formation de "clusters" lié au solvant et l'entrée du matériel non ionisé. L'application simultanée d'une tension continue et d'une radiofréquence donnée, impose aux ions passant à travers les cylindres d'un quadripôle, une trajectoire oscillante où seuls les ions d'énergie cinétique suffisante pourront atteindre l'extrémité du quadripôle. Les ions formés sont détectés (mesure par le rapport de la masse à la charge de l'ion m/z), après amplification du signal par un multiplicateur d'électrons.

### 2.11.2 Analyses des échantillons

Les échantillons lyophilisés sont solubilisés dans une solution contenant 20% (v/v) d'acétonitrile et 0,1% (v/v) d'acide formique, dans l'eau puis sont perfusés au moyen d'une pompe médicale (modèle 11, Harvard apparatus, South-Natick, USA) à un débit de 5 µl/min. Les spectres de masses sont enregistrés sur un spectromètre de masse quadripolaire Sciex API (Thornhill, Ontario, Canada) équipé d'une source "electrospray". Le quadripôle est préalablement calibré avec du propylène glycol. Le spectre est enregistré entre 400 (m/z) et 1800 Da. Le potentiel appliqué à l'aiguille de nébulisation est de 4,5 keV. Le courant à l'entrée de l'analyseur est de 60 V. Les masses moléculaires des échantillons sont calculées à l'aide du logiciel Mac Bio Spec 3.2.

### **-3- PROTOCOLES EXPERIMENTAUX**

#### **3.1 Préparation des fractions peptidiques décolorées**

Les hydrolysats d'hémoglobine sont décolorés selon la méthode décrite par Rossi Fanelli et coll. (1958), légèrement modifiée. Un volume d'hydrolysat à 20 °C, est versé goutte à goutte, sous agitation constante, dans 30 volumes d'acétone glacée (conservé au congélateur), contenant 2-3 ml d'acide chlorhydrique 2M. La fraction peptidique décolorée est récupérée par centrifugation 5 min à 5000 tr/min puis remise en solution dans un volume d'eau distillée. L'opération est répétée une fois pour assurer une décoloration optimale. Les fractions peptidiques sont finalement séchées par lyophilisation.

#### **3.2 Etude de la solubilité de l'hème en fonction du pH**

Les essais de solubilité de l'hème sont réalisés à 23°C, dans une gamme de pH allant de 2 à 12, avec l'hémine ou l'hydrolysat (coloré et décoloré), préalablement remis en solution dans la soude 50 mM. Une solution d'HCl diluée est additionnée, goutte à goutte, aux échantillons d'hydrolysat sous agitation constante jusqu'à ce que le pH désiré soit atteint. Les échantillons (4 ml) sont ensuite centrifugés 15 min à 3500 tr/min. Le culot (s'il y en a un) est alors remis en solution dans NaOH 25 mM (volume final : 4ml) pour permettre le dosage de l'hème et des peptides. Les concentrations en hème et en peptide sont également déterminées dans le surnageant dont le volume a été ramené à 4ml avec de l'eau.

#### **3.3 Solubilisation de l'hème par les peptides à pH acide**

##### *3.3.1 Solubilisation de l'hème par la fraction peptidique totale de l'hydrolysat*

Les fractions peptidiques lyophilisées sont remises en solution (32 mg/l) dans un mélange (75/25, v/v) acétone-tampon HCl/KCl 50 mM à pH 2. Une solution mère d'hémine (Sigma) est préparée dans le même mélange acétone/tampon. Deux millilitres de la solution de peptides sont additionnés à 2 ml de différentes solutions d'hémine préparées à partir de la solution mère et contenant des quantités croissantes d'hémine. La quantité d'hémine dans les 4 ml d'échantillons varie de 0 à 200 µg. La quantité de peptides est fixe (64 µg). L'acétone est ensuite évaporée sous vide. La fraction précipitée est éliminée par centrifugation 15 min à 5000 tr/min. Le volume du surnageant est complété à 4 ml par de l'acétone. La quantité

d'hémine solubilisée par la fraction peptidique est évaluée par lecture de l'absorbance de l'échantillon à 385 nm. Une gamme étalon est réalisée à partir d'hémine en solution dans le mélange acétone-tampon.

### 3.3.2 Solubilisation de l'hème par le peptide pur

L'étude de solubilisation de l'hème par le peptide pur est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. La concentration en peptide des échantillons reste fixe à 4  $\mu\text{M}$ . Les concentrations en hémine varient de 0  $\mu\text{M}$  à 12  $\mu\text{M}$ . Après évaporation de l'acétone, les échantillons sont traités comme précédemment.

## **3.4 Analyses spectrophotométriques**

La ferrihémoglobine (Sigma, St Louis, USA), l'hémine (Sigma) et l'hydrolysate peptidique d'hémoglobine sont mis en solution dans du tampon borate, 50 mM, pH 9,5. Les spectres des différentes solutions sont enregistrés entre 300 et 650 nm sur un spectrophotomètre Lambda 5 (Perkin-Elmer). Lorsque l'effet du cyanure de potassium est étudié, un cristal de ce sel est directement ajouté dans la cuvette échantillon avant d'enregistrer le spectre.

## **3.5 Etude des interactions hème-peptide**

### 3.5.1 Etude spectrométrique

#### *3.5.1.1 Spectroscopie de différences UV-visible*

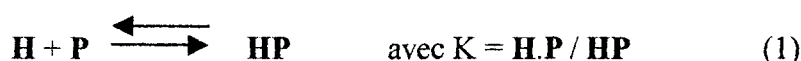
L'hémine (Sigma, Saint-Louis, USA) est solubilisée dans la soude 0,1 M à une concentration de 2 mM. La solution d'hémine obtenue est alors diluée à 9,8  $\mu\text{M}$  dans du tampon Tris-HCl 50mM, pH 7,5. Des aliquotes de 5  $\mu\text{l}$  d'une solution de peptide à 1,95 mM dans le même tampon, sont additionnés successivement dans une cuvette en quartz contenant 3 ml de la solution d'hémine (concentrations finales en peptides : 3,2  $\mu\text{M}$  à 44,8  $\mu\text{M}$ ). Cinq microlitres de tampon Tris-HCl 50mM, pH 7,5 sont additionnés simultanément dans la cuvette de référence contenant 3 ml de la même solution d'hémine. Les spectres de différence sont enregistrés entre 300 et 500 nm sur un spectrophotomètre Lambda 5 (Perkin-Elmer). Les spectres absolus de l'hème sont enregistrés au début et à la fin de chaque essai.

### 3.5.1.2 Spectroscopie de fluorescence

L'association hème-peptide est mise en évidence en spectroscopie de fluorescence par l'étude du déplacement de la longueur d'onde d'intensité maximale. L'hémine est additionnée (concentrations finales 0 à 5  $\mu\text{M}$ ) à une solution de peptide 5  $\mu\text{M}$  dans du tampon Tris-HCl, 50mM, pH 7,5. Le spectre d'émission de fluorescence du tryptophane contenu dans le peptide est mesurée entre 300 et 400 nm sur un spectrofluorimètre LS 50B (Perkin Elmer). La longueur d'onde d'excitation est fixée à 280 nm.

### 3.5.2 Détermination des constantes de dissociation des complexes hème-peptide

Un équilibre simple peut être représenté par :



Où **H**, **P** et **HP** sont respectivement les concentrations à l'équilibre, en hémine sous forme de dimère (ou en cyanhémine sous forme de monomère), en peptide et en complexe hème-peptide et où **K** représente la constante de dissociation du complexe. En considérant que **H<sub>0</sub>** et **P<sub>0</sub>** sont respectivement la concentration totale de la solution en hème (sous forme de dimère ou de monomère) et en peptide, la constante de dissociation déduite de (1) peut être écrite :  $K = (\mathbf{H_0 - HP})(\mathbf{P_0 - HP}) / \mathbf{HP}$

Dans notre protocole expérimental, les concentrations en hémine (**H<sub>0</sub>**) et en peptide (**P<sub>0</sub>**) sont du même ordre de grandeur. La représentation de Scatchard n'est donc pas appropriée à notre modèle. Nous devons exprimer la concentration en complexe hème-peptide (**HP**) en fonction de **H<sub>0</sub>** et **P<sub>0</sub>** :

$$\mathbf{HP} = [ (\mathbf{K + H_0 + P_0}) - ((\mathbf{K + H_0 + P_0})^2 - 4 \mathbf{H_0 P_0})^{1/2} ] / 2 \quad (2)$$

En mesurant la variation d'absorbance  $\Delta A$  à 417 nm des spectres de différence, correspondants à des concentrations variables en peptides (de 3,2 à 44,8  $\mu\text{M}$ ) pour une concentration en hémine constante (9,8  $\mu\text{M}$  sous forme de dimère et 4,9  $\mu\text{M}$  sous forme de monomère), nous pouvons déterminer  $\Delta A / \Delta A_{\text{max}}$  où  $\Delta A_{\text{max}}$  est la variation d'absorbance



maximale correspondant à une association totale de l'hémine, c'est à dire :  $\Delta A / \Delta A_{\max} = \mathbf{H}_P / \mathbf{H}_0$ .

A partir de l'équation (2), nous pouvons écrire :

$$\Delta A = \Delta A_{\max} [ [ (K + \mathbf{H}_0 + \mathbf{P}_0) - ((K + \mathbf{H}_0 + \mathbf{P}_0)^2 - 4 \mathbf{H}_0 \mathbf{P}_0)^{1/2} ] / 2 \times \mathbf{H}_0 ]$$

Etant donné la difficulté à estimer la valeur de  $\Delta A_{\max}$ , Nous avons choisi de déterminer les valeurs de K et  $\Delta A_{\max}$  à partir d'un quasi-algorithme de Newton à 2 inconnues (K et  $\Delta A_{\max}$ ), tracé à partir de nos résultats expérimentaux ( $\Delta A$ ,  $\mathbf{P}_0$ ,  $\mathbf{H}_0$ ).

## **3<sup>ème</sup> Partie : Résultats expérimentaux**

# -1- PREPARATION A L'ECHELLE PILOTE D'UN HYDROLYSAT D'HEMOGLOBINE BOVINE, ENRICHI EN HEME PAR ULTRAFILTRATION

## 1.1 Mise au point du procédé pilote

L'hémoglobine bovine constitue une source de fer héminique bien assimilée et d'un faible prix de revient. Pourtant, la faible solubilité de l'hème peut affecter l'absorption du fer héminique et doit être prise en considération lors de l'élaboration de préparations à base d'hémoglobine, notamment dans le cas d'hydrolyses poussées de l'hémoglobine, telles que les ont décrites Eriksson (1981), Chiba (1983) ou Inagoki et al. (1985). Dans cette étude, nous avons mis au point un procédé de fabrication d'un hydrolysat d'hémoglobine enrichi en fer héminique soluble, fondé sur une hydrolyse enzymatique ménagée de l'hémoglobine bovine, suivie d'une étape d'ultrafiltration permettant de concentrer la fraction qui solubilise l'hème. Une étape de séchage par atomisation permet finalement de stabiliser l'hydrolysat enrichi.

### 1.1.1 Hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine

#### 1.1.1.1 Choix des conditions d'hydrolyse

La détermination des conditions d'hydrolyse a été réalisée à l'échelle du laboratoire, sur des solutions d'hémoglobine à 50 g/l, avec trois enzymes de nature différente : la pepsine, la papaïne et l'Alcalase®.

Les critères de choix des conditions d'hydrolyse ont été définis, d'une part en fonction de la solubilité des hydrolysats à pH 2. Rappelons que l'hème est insoluble à pH acide ; La solubilité de l'hydrolysat à pH 2 permet donc d'évaluer la capacité de la fraction peptidique à maintenir l'hème en solution. Il semblerait en effet qu'il existe une corrélation entre la solubilité du fer ingéré et sa résorption (Miller et Berner 1989, Reinzenstein 1980). Le second critère retenu concerne le degré d'hydrolyse qui doit être suffisamment élevé pour permettre une augmentation sensible du rapport hème/protéine.

La proportion d'hème soluble dans les différents hydrolysats dont le pH a été ramené à pH 2, varie en fonction des conditions d'hydrolyse (**Tableau 6**). Seule l'hydrolyse ménagée par la pepsine à pH 4 et à 40°C permet d'obtenir une proportion importante d'hème soluble (78%). Les degrés d'hydrolyse les plus élevés au terme de 24 heures (25% avec l'alcalase® et 22% avec la pepsine à pH 2) semblent correspondre à des faibles pourcentages d'hème

solubilisé (respectivement 7% et 8%). Ces résultats confirment les observations de Sannier (1992) et montrent que les peptides de bas poids moléculaire ne peuvent empêcher l'agrégation des molécules d'hème entre elles. Au vu des résultats obtenus, l'utilisation de la pepsine à pH 4 et à 40°C apparaît la mieux adaptée à la préparation d'une fraction peptidique capable de véhiculer l'hème en solution et de réduire très significativement la précipitation des molécules d'hème.

Enzyme	Conditions d'hydrolyse		Degré d'hydrolyse après 24 H	Fraction d'hème soluble (% g/g)	
	pH	Température		pH 2	pH 8
Alcalase	8,5	50°C	25%	8%	96%
Pepsine	2	40°C	22%	7%	95%
<b>Pepsine</b>	<b>4</b>	<b>40°C</b>	<b>13%</b>	<b>78%</b>	<b>97%</b>
Papaine	7	50°C	4%	69%	83%
Hémoglobine bovine			-	19%	96%

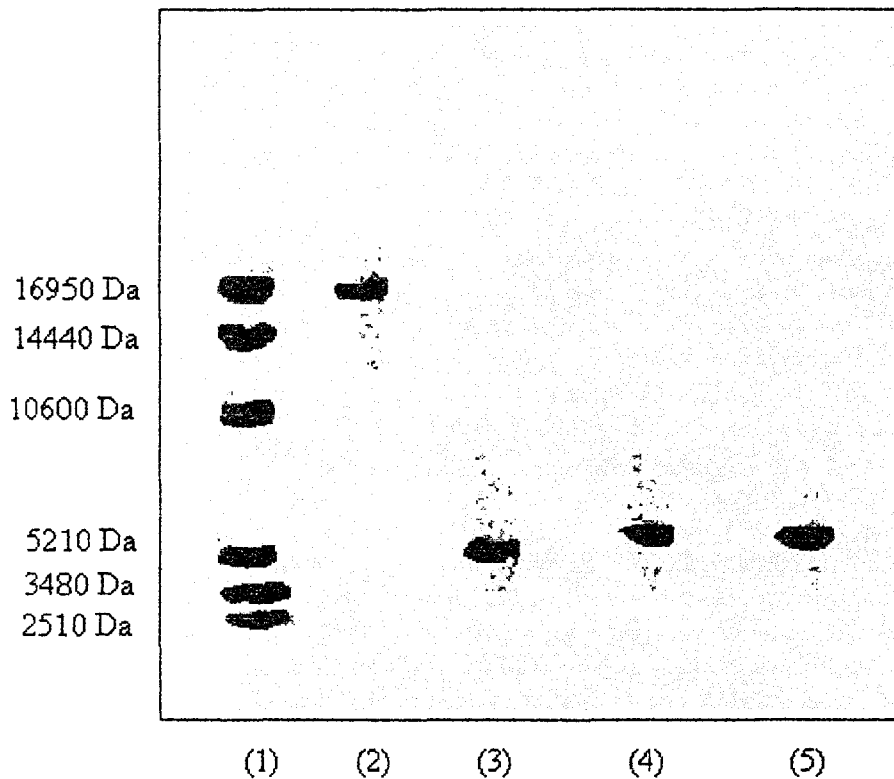
**-Tableau 6- Teneur en hème soluble dans l'hydrolysate d'hémoglobine en fonction des conditions d'hydrolyse**

Le choix de l'enzyme et des conditions d'hydrolyse étant arrêté, l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine a été transposée à l'échelle pilote.

#### *1.1.1.2 hydrolyse à l'échelle pilote*

Préparation de l'hémolysat : Le sang de boeuf est recueilli sur anticoagulant (EDTA 1g/litre) puis centrifugé. Les hématies contenues dans le cruor (culot de centrifugation) sont alors hémolysées par 3 volumes d'HCl 10 mM. L'hémolysat obtenu est maintenu à 4°C sous agitation dans une cuve thermostatée en acier inoxydable. La solution d'hémoglobine est diluée à 5,1% (p/v) avec de l'HCl 10 mM. Le pH est alors ajusté à 4 par addition d'HCl 4N.

Hydrolyse enzymatique : 80 Kg d'hémolysat ([hème]=1,8 g/Kg, [protéine]=51 g/Kg) sont introduits dans un réacteur pilote contrôlé en température et en pH. La température est amenée à 40°C et le pH est réajusté à 4. L'hydrolyse est alors initiée par addition de la pepsine (enzyme/substrat : 1,4% g/g). Au cours de l'hydrolyse, la température est maintenue à 40°C, le pH est régulé à 4 en continu par de l'HCl 4N. Le suivi du degré d'hydrolyse, au cours du temps, montre que l'hydrolyse est complète en 12 heures environ. Le degré d'hydrolyse déterminé au terme de 24 heures (11%) est sensiblement inférieur au degré d'hydrolyse obtenu à l'échelle du laboratoire (13%). L'électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS (**Figure 3**) confirme l'efficacité de l'hydrolyse, en révélant dans l'hydrolysats final l'existence de peptides de masse moléculaire inférieure à 5000 Da. D'un point de vue qualitatif, cette technique reste toutefois restrictive puisqu'elle permet difficilement la séparation des peptides de masse moléculaire inférieure à 3000 Da.



**-Figure 3-** Électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS : (1) témoins de masse moléculaire, (2) hémoglobine bovine, (3) hydrolysats d'hémoglobine avant ultrafiltration, (4) hydrolysats d'hémoglobine enrichi en fer héminique (rétentat d'UF), (5) filtrat.

### 1.1.2 Clarification

La fraction d'hème, insolubilisée au cours de l'hydrolyse enzymatique, est éliminée par centrifugation en continu. Le débit de circulation est de 20 litres par heure. Un débouillage est effectué tous les 5 litres. Le rendement en fer héminique de cette étape de clarification est de 75%. Après centrifugation, la pepsine est inactivée en amenant le pH de l'hydrolysate clarifié à pH 8 par de la soude concentrée. Cette étape de clarification permet de faciliter l'étape d'ultrafiltration en empêchant le colmatage des membranes par l'hème insoluble. Nous avons également observé que la clarification empêchait la précipitation de l'hydrolysate à long terme, probablement en empêchant les interactions de se développer au cours du temps entre l'hème soluble et l'hème précipité.

### 1.1.3 Filtration tangentielle

L'étape d'ultrafiltration permet d'enrichir la fraction soluble (surnageant) en fer héminique, en éliminant les peptides de bas poids moléculaire qui ne sont pas impliqués dans la solubilisation de l'hème.

#### *1.1.3.1 Choix de la membrane*

En présence de molécules hydrophobes telles que l'hème, les membranes de nature hydrophobe risquent de colmater rapidement et n'ont donc pas été retenues dans le cadre de cette étude.

Deux membranes de nature hydrophile ont été testées :

- ☞ Une membrane en cellulose régénérée, de seuil de coupure 10 kDa, de surface 0,3 m<sup>2</sup>, montée sur un module spiralé hélicon (Millipore Corporation, Bedford, MA).
- ☞ Une membrane en polyethersulfone modifié, de seuil de coupure 10 kDa, de surface 0,42 m<sup>2</sup>, montée sur un module plan centrassette cassette (Pall-Filtron, Northborough, MA).

Les essais d'ultrafiltration ont été réalisés à l'échelle du laboratoire sur 2 Kg d'hydrolysate peptidique clarifié et dilué à 1% ([peptides] = 10g/Kg), sous une pression transmembranaire de 1 bar, à 22°C et pH 7 avec deux membranes hydrophiles (PES modifié

et cellulose régénérée). Les taux de rétention en hème et en peptide ont été définis selon la formule :  $(C_r / C_0) \times 100$ , où  $C_0$  représente la concentration initiale et  $C_r$  la concentration dans le rétentat

Le **Tableau 7** montre que le débit de filtrat, obtenu avec la membrane en PES modifié ( $38 \text{ l.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ ), est quatre fois plus élevé que celui obtenu avec la membrane en cellulose régénérée ( $11 \text{ l.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ ). Le taux de rétention en hème, obtenu avec la membrane en PES modifié, est quasiment absolu (99%). Alors que ce taux de rétention ne dépasse pas 80% avec la membrane en cellulose régénérée (79%). D'autre part, le taux de rétention en peptide est sensiblement plus bas avec la membrane en PES modifié (40%). De plus, en fin de filtration, la surface de la membrane en PES modifié est très faiblement encrassée, prouvant ainsi que la membrane n'est pas colmatée et permet une régénération rapide de la membrane.

Membrane (module)	Taux de rétention		Débit de filtrat ( $\text{l.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ )	Encrassement de la membrane après filtration
	Hème	Peptide		
<b>Polyethersulfone modifié, hydrophile, 0,46 m<sup>2</sup>, 10kDa (module plan)</b>	<b>99%</b>	<b>40%</b>	<b>38</b>	<b>+/-</b>
Cellulose régénérée, hydrophile, 0,30 m <sup>2</sup> , 10 kDa (module spiralé)	79%	44%	11	+++

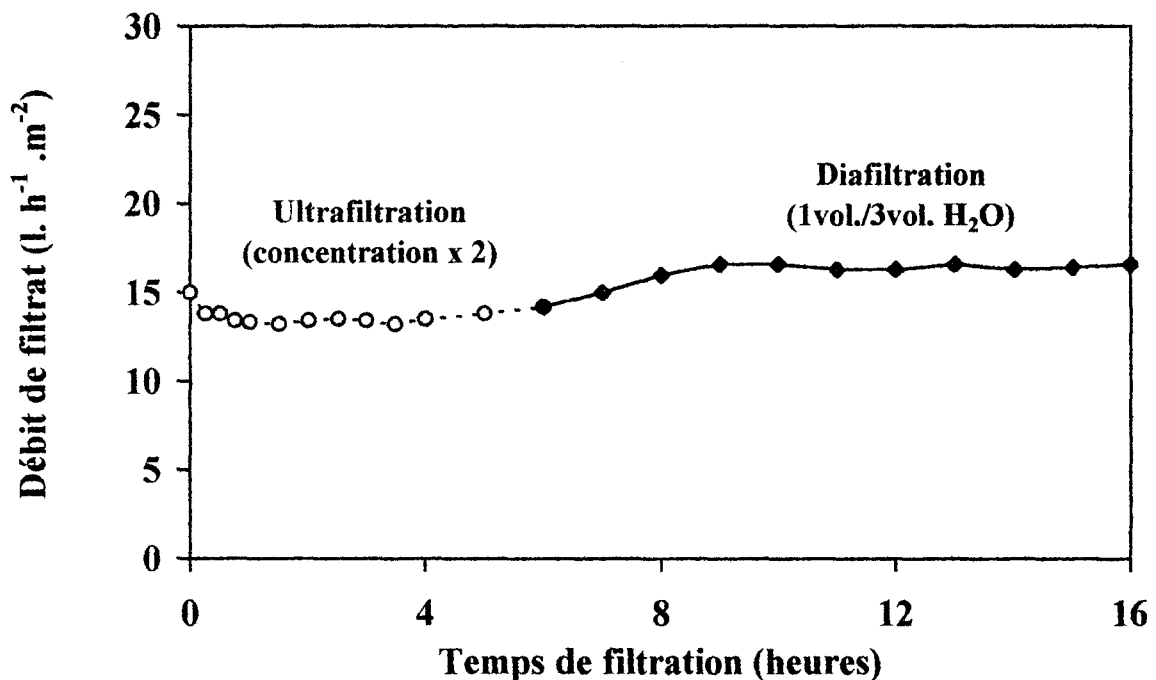
**-Tableau 7-** *Détermination des taux de rétention en hème et en peptide avec les deux membranes hydrophiles testées*

La membrane en PES modifié, permettant d'obtenir le meilleur rapport [hème]/[peptide] avec un débit de filtrat optimal, a donc été sélectionnée pour l'ultrafiltration à l'échelle pilote.

### 1.1.3.2 Ultrafiltration à l'échelle pilote

L'étape de filtration est transposée à l'échelle pilote avec 71 Kg d'hydrolysats clarifiés ([hème]=1,5 g/Kg, [protéine]=50 g/Kg) filtrés sur la membrane en PES modifié (10 kDa ;

0,46 m<sup>2</sup>). L'enrichissement en fer héminique se déroule en 2 étapes successives : l'hydrolysate est dans un premier temps concentré deux fois par ultrafiltration. Les 32 Kg de rétentat récolté sont alors diafiltrés par 100 litres d'eau déminéralisée. La diafiltration permet à la fois de dessaler et de concentrer la teneur en hème de l'hydrolysate. Au cours de l'étape de filtration, le débit de filtrat reste stable à 7 l.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> environ (**Figure 4**) et montre que la membrane n'est pas colmatée, même après 16 heures d'utilisation en continu. La légère augmentation du débit de filtrat observée au cours de la filtration, est vraisemblablement due à un réchauffement de l'hydrolysate dans le circuit au cours du temps (4°C à 18°C). Le débit de rétentat est évalué à 31 l.h<sup>-1</sup> après 11 heures de filtration. Ces résultats montrent que la membrane en PES modifiée est particulièrement bien adaptée à la filtration d'hydrolysats d'hémoglobine.



**-Figure 4-** Evolution du débit de filtrat au cours de l'étape d'enrichissement en hème par ultrafiltration à l'échelle pilote.

Membrane hydrophile en polyethersulfone modifié (10 kDa, 0,46 m<sup>2</sup>), pH 8, température 22°C et pression 10<sup>5</sup> Pa

La concentration en fer du rétentat, déterminée après filtration, est de 0,6% (g/100g de matière sèche), soit environ deux fois plus que la concentration en fer de l'hémoglobine. Le rendement en fer de la filtration est de 99%. Notons que la solubilité à pH 2 de l'hème contenu dans le rétentat n'est pas affectée par cette étape de concentration. Les peptides éliminés ne semblent donc pas jouer un rôle majeur dans la solubilisation de l'hème.



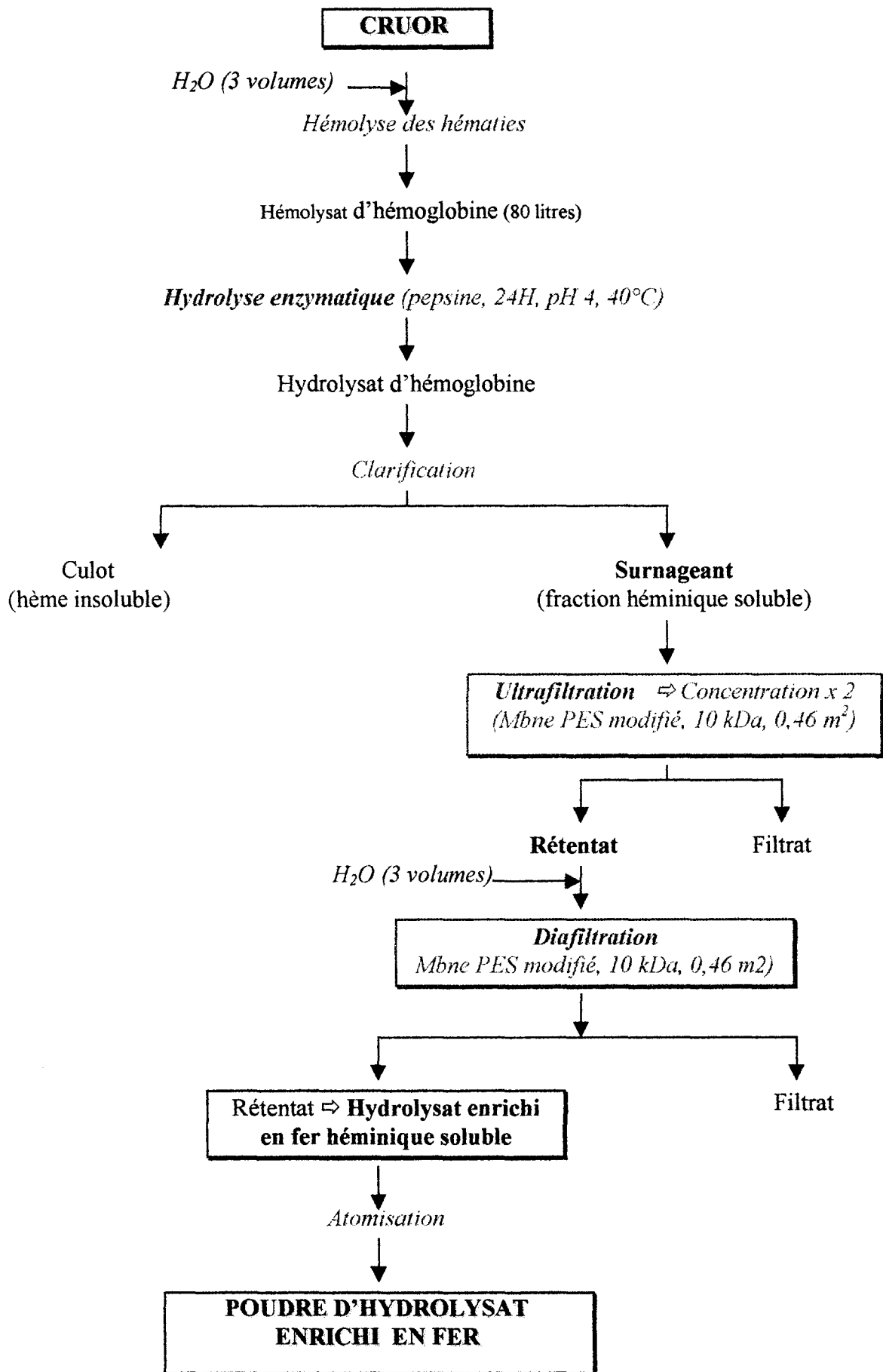
La durée de l'étape de filtration (16 heures au total) s'explique par la faible surface de membrane utilisée (0,46 m<sup>2</sup>). Pour être compatible avec une utilisation industrielle, il serait nécessaire de réduire le temps de filtration en augmentant cette surface membranaire. Dans cette optique, des essais de filtration réalisés dans des conditions identiques, sur seulement 5 Kg d'hydrolysate, en conservant la même surface membranaire, ont permis d'obtenir une concentration en fer proche de 0,9% (g/100g de matière sèche) en moins de deux heures.

Cette amélioration de la concentration en fer, aussi minime semble-t-elle, est primordiale pour la viabilité du produit. Rappelons que l'hémoglobine ne renferme qu'une faible quantité de fer (0,3% du poids total). Ainsi, pour couvrir 80% de l'apport en fer recommandé chez une femme enceinte (20 à 30 mg /jour), il faudrait environ 7 g d'hémoglobine soit 7 gélules ou comprimés par jour. Sur le plan marketing, une telle astreinte ne peut-être envisagée. En concentrant la teneur en fer d'un facteur de 2 à 3, la même dose de fer n'apporte que 3 g de protéine soit 3 gélules ou comprimés par jour.

#### 1.1.4 Atomisation

Les 32 Kg de rétentat ([hème] 3,5 g/Kg, [protéine] 48 g/Kg) sont séchés par atomisation afin de stabiliser et de conserver l'hydrolysate peptidique héminique sous forme de poudre. L'atomisation est réalisée dans un atomiseur pilote type minor production, à un débit moyen de 10 litres/heure, avec un flux d'air chaud à une température de 200°C et une température de sortie d'air de 80°C. Les rendements en fer et en peptides de cette étape sont respectivement de 73% et 77%. Ces rendements, relativement bas comparativement aux 90% habituellement obtenus pour ce type d'opération, peuvent avoir 2 origines. D'une part, l'hydrolysate séché, en raison de sa pulvérulence, a pu lors de l'atomisation être mal séparé du flux d'air chaud au niveau du cyclone, occasionnant ainsi une perte significative en peptides héminiques. D'autre part, la quantité d'hydrolysate initiale (32 Kg) est inférieure aux quantités recommandées pour ce type d'appareil. Les pertes sont donc proportionnellement plus importantes.

Les différentes étapes du procédé de fabrication de l'hydrolysate peptidique héminique sont décrites dans la **Figure 5**. Le bilan du procédé, les teneurs en fer, en hème et en peptide sont résumés dans le **Tableau 8** ainsi que le rendement en fer de chaque étape. Le rendement global en fer du procédé est de 58%.



-Figure 5- Procédé de préparation à l'échelle pilote, de l'hydrolysate d'hémoglobine enrichi en fer héminique

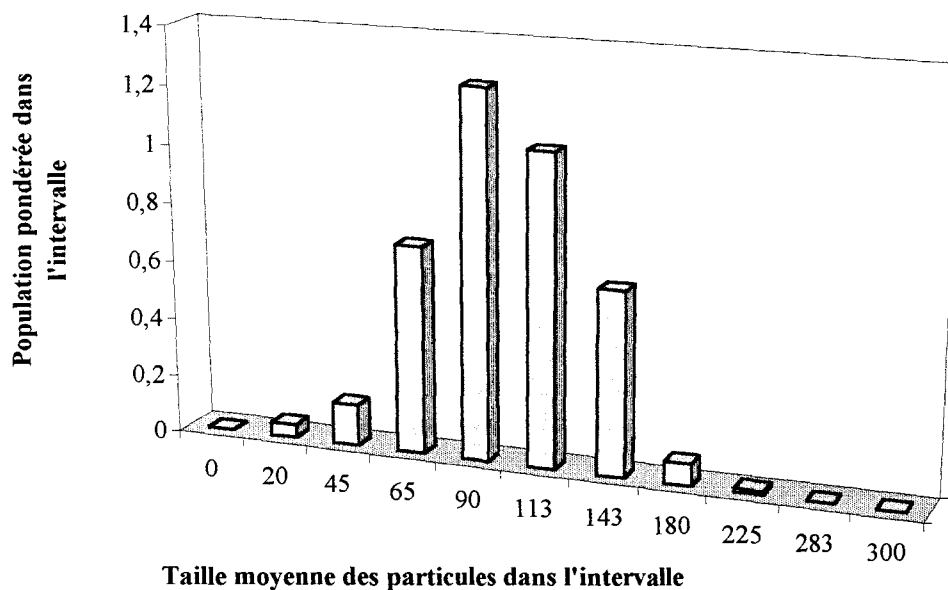
	<b>Rapport Fe/peptides % (g/g)</b>	<b>Rendement en fer</b>
<b>Hémolysat</b>	0.31	
	<i>Hydrolyse</i>	<b>100%</b>
<b>Hydrolysat</b>	0.30	
	<i>Clarification</i>	<b>75%</b>
<b>Hydrolysat clarifié</b>	0.27	
	<i>Ultrafiltration</i>	<b>99%</b>
<b>Hydrolysat enrichi en fer héminique</b>	0.61 (0.89*)	
	<i>Atomisation</i>	<b>77%</b>
<b>Poudre</b>	0.59	
<b>Rendement global en fer : 58%</b>		

**-Tableau 8- Evolution du rapport Fer/peptides et rendements en fer au cours des différentes étapes de fabrication.**

\*résultats obtenus au cours de l'ultrafiltration optimisée

### 1.1.5 Caractérisation physico-chimique de l'hydrolysat d'hémoglobine enrichi en fer héminique

L'hydrolysat peptidique héminique atomisé constitue une poudre d'aspect pulvérulent, facilement soluble dans l'eau, de couleur brun rouge et de goût légèrement amer. La teneur en fer de cet hydrolysat est de 0,6% (g/100 g de matière sèche) pour le procédé pilote et de 0,9% (g/100 g de matière sèche) lorsque l'ultrafiltration est optimisée. La concentration en protéine (N x 6,25) est évaluée à 93% (g/100 g de matière sèche). Le taux d'humidité déterminé par évaporation (48 heures à 120°C) est de 3%. Le pH de l'hydrolysat en solution à 50 g par litre est de 8. La répartition granulométrique de la poudre (**Figure 6**) montre que 96% des particules sont comprises dans un intervalle [50µm-160µm]. L'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS met en évidence dans l'hydrolysat enrichi en fer héminique, des peptides de masse moléculaire inférieure à 5 kDa (**Figure 3**). D'autre part, le procédé de fabrication ne semble pas altérer les propriétés nutritionnelles de l'hémoglobine puisque la composition en acides aminés de l'hydrolysat peptidique héminique reste proche de celle de l'hémoglobine de départ.



**-Figure 6- Répartition granulométrique de la poudre d'hydrolysat d'hémoglobine enrichi en hème**

## 1.2 Innocuité et assimilation de l'hydrolysate d'hémoglobine enrichi en hème : Etudes comparatives avec le sulfate de fer

### 1.2.1 Mise en évidence *in vitro* de l'innocuité de l'hydrolysate peptidique hémique vis-à-vis de la génération de radicaux hydroxyles

Dans cette étude, nous avons utilisé le test au deoxyribose (DOR) afin de comparer la capacité du fer hémique et des sels de fer à générer des radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^\bullet$ ) dans le milieu réactionnel. Les radicaux hydroxyles hautement réactifs et toxiques peuvent être générés lorsque des catalyseurs de la réaction de Fenton, tels que le fer, sont présents dans les milieux biologiques. Le test au DOR est couramment employé pour déceler la présence de radicaux  $\text{OH}^\bullet$  dans ces milieux biologiques. Des essais préliminaires réalisés sans deoxyribose ont démontré que la présence de peroxyde d'hydrogène n'entraînait pas de dégradation des fractions peptiques en malonyldialdéhyde susceptible d'interagir avec les produits de dégradation du deoxyribose et de perturber ainsi le test. La faible solubilité du sulfate de fer à pH alcalin ne permet pas d'utiliser le test au DOR. Nous avons pallié cet inconvénient en utilisant un complexe [Fe-EDTA] très soluble à pH 8. L'utilisation de fer hémique, provenant de l'hydrolysate d'hémoglobine ou d'hémine purifiée, décroît considérablement la génération de radicaux  $\text{OH}^\bullet$  (environ 70%) en présence de peroxyde d'hydrogène, comparativement aux résultats obtenus avec le sulfate de fer ou le complexe [Fe-EDTA] (**tableau 9**). La faible absorbance observée à 532 nm avec notre hydrolysate est vraisemblablement due à la présence de traces de métaux libres dans la préparation.

Cette étude démontre également que la complexation du fer minéral à la fraction peptidique de notre hydrolysate décoloré induit une inhibition de la génération de radicaux libres dans le milieu, à pH acide. Nous n'avons pas observé ce phénomène à pH basique car les peptides de l'hydrolysate ne peuvent pas déplacer l'EDTA qui est un ligand du fer relativement puissant. Ces résultats prouvent que les peptides doivent être intimement associés au fer minéral pour inhiber la formation de radicaux dans le milieu réactionnel.

Une étude complémentaire *in vivo* permettrait de savoir si l'utilisation de fer hémique diminue les risques de génération de radicaux  $\text{OH}^\bullet$  dans le tractus digestif et plus spécifiquement dans l'estomac où le sulfate de fer est particulièrement réactif en raison de sa

solubilité à pH acide. Dans le cas de résultats favorables, l'utilisation de l'hydrolysate peptidique héminique permettrait de diminuer les effets indésirables liés à l'utilisation de sels de fer.

<i>Test au deoxyribose avec :</i>	<i>A 532nm</i>	
	<i>pH 2</i>	<i>pH 8</i>
Blanc	0,083	0,091
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,195	0,212
FeSO <sub>4</sub>	0,128	0,111*
<b>FeSO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>1,253</b>	<b>1,174*</b>
Hydrolysate	0,106	0,121
<b>Hydrolysate + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>0,325</b>	<b>0,361</b>
Hème	-	0,132
<b>Hème + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	-	<b>0,371</b>
Peptides de l'hydrolysate décolorés+ FeSO <sub>4</sub>	0,087	0,091*
<b>Peptides de l'hydrolysate décolorés + FeSO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>0,408</b>	<b>1,357*</b>

**-Tableau 9- *Dégradation du deoxyribose induite par le sulfate de fer et par le fer héminique contenu dans l'hydrolysate enrichi par ultrafiltration, étude comparative.***

Les concentrations finales sont respectivement 2,5 mM pour le deoxyribose, 0,25 mM pour le Fer et 2,5 mM pour H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les résultats sont exprimés après soustractions des blancs (FeSO<sub>4</sub> ou hydrolysate). Les valeurs indiquées correspondent à la moyenne de trois dosages différant de moins de 5%.

\* A pH 8, le FeSO<sub>4</sub> insoluble a été remplacé par un complexe [Fe-EDTA] soluble.

### 1.2.2 Etude chez le rat de l'absorption du fer héminique contenu dans l'hydrolysate enrichi en hème

Ces travaux, menés sur notre hydrolysate d'hémoglobine enrichi en fer héminique, ont été entièrement réalisés par Martine Boudey-Mouly sous la direction du Docteur Bougle, dans le cadre d'un Doctorat préparé dans le Laboratoire de Physiologie Digestive du Professeur Arhan (CHU de Caen). Cette étude avait pour objectif d'évaluer l'efficacité de l'hydrolysate dans la réplétion en fer, chez des rats préalablement anémiés (régimes carencés en fer) et de comparer notre produit à d'autres sources de fer héminique (hémoglobine) et minéral (sulfate de fer). Notre hypothèse de départ postulait que l'utilisation d'un fer héminique, solubilisé par une fraction peptidique spécifique, pourrait favoriser l'absorption intestinale du fer.

Au vu des résultats obtenus par Madame Boudey-Mouly, et contrairement à notre hypothèse de départ, l'absorption du fer héminique contenu dans notre hydrolysate est plus faible que celles observées avec l'hémoglobine ou le sulfate de fer. Ce dernier résultat n'est pas forcément surprenant si l'on considère le degré de sévérité de la carence (rats en situation d'anémie). Rappelons qu'il a été montré que l'absorption du fer minéral, et en particulier du sulfate de fer dépendait plus de l'état des statuts en fer que le fer héminique (Cook 1990 et Olivares et al. 1993). Dans certains cas d'anémie sévère, la biodisponibilité du sulfate de fer peut atteindre jusqu'à 70% du fer initialement. En revanche, l'absorption du fer de l'hémoglobine est plus élevée que celle de notre hydrolysate d'hémoglobine enrichi, démontrant ainsi que la transformation de la protéine au cours de la préparation de l'hydrolysate a été préjudiciable à la biodisponibilité du fer.

Deux hypothèses sembleraient envisageables. D'une part, au cours de l'hydrolyse enzymatique, la poche de l'hème formée par la globine est détruite. L'hème n'est alors plus protégé par son environnement protéique et peut interagir avec d'autres molécules, et en particulier avec d'autres molécules d'hème, pour former des polymères difficilement absorbables. Néanmoins, une telle hypothèse ne suffit pas à expliquer la différence d'absorption entre l'hydrolysate et l'hémoglobine, cette dernière étant, elle aussi, hydrolysée lors de la digestion. Il est donc probable que lors de l'étape d'ultrafiltration nous ayons favorisé la formation de polymères en augmentant la concentration en hème de l'hydrolysate.

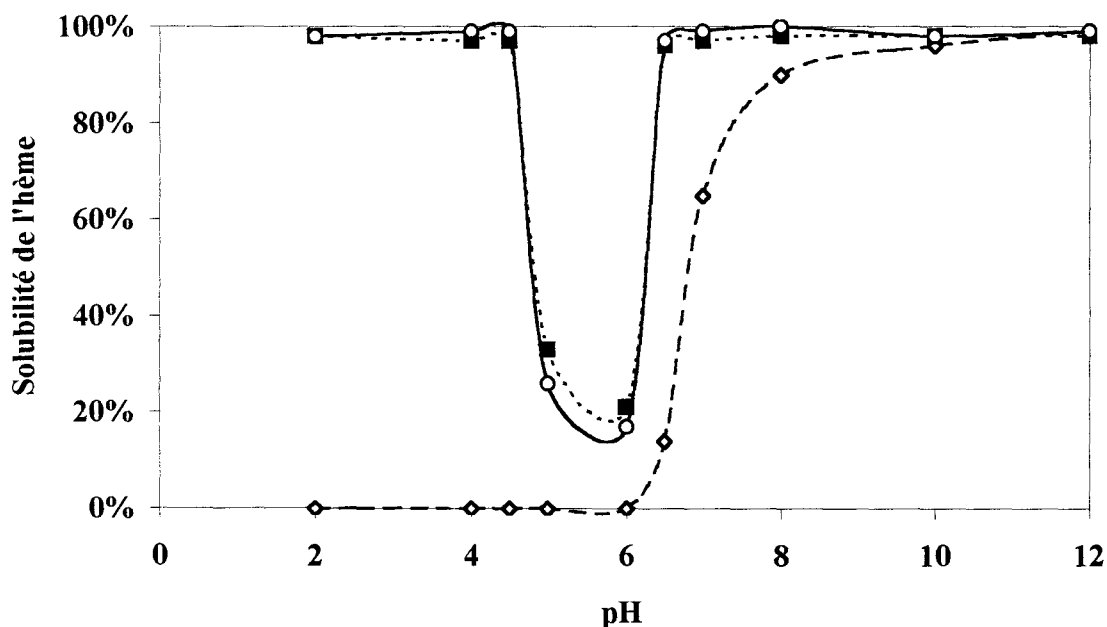
L'étude de l'effet des acides aminés sur l'absorption du fer vient conforter cette théorie des polymères d'hème. En effet, lorsqu'on ajoute à l'hydrolysate des acides aminés, tels que l'histidine ou la cystéine, l'absorption du fer héminique chez le rat augmente considérablement et devient supérieure à celles observées pour l'hémoglobine entière ou le sulfate de fer. Ces acides aminés, en se chélatant à l'atome de fer de l'hème, minimiseraient la formation de polymère et favoriseraient ainsi l'absorption intestinale du fer.

Ces travaux sur l'absorption du fer chez le rat ont été pour notre équipe doublement instructifs. Ils nous ont permis de tester l'efficacité thérapeutique de l'hydrolysate peptidique héminique et d'entrevoir des possibilités d'amélioration du procédé de fabrication, notamment en essayant de chélater le fer de l'hème avant hydrolyse, pour prévenir la formation de polymères d'hème, au cours de la coupure enzymatique.

## -2- RÔLE DES PEPTIDES DANS LA SOLUBILISATION DE L'HÈME

### 2.1 Mise en évidence d'interactions hème-peptide

Nous avons constaté, lors de la mise au point du procédé de préparation, que l'hème contenu dans l'hydrolysate peptidique enrichi par ultrafiltration était soluble à pH 2. Comme le montre la courbe de solubilité de l'hème en fonction du pH (**Figure 7**), l'hème pur est totalement insoluble pour des pH inférieurs à pH 6 et ne devient facilement soluble qu'au-delà de pH 8. En revanche, dans l'hydrolysate enrichi, l'hème est soluble dans une large gamme de pH allant de 2 à 12, démontrant ainsi la présence d'interactions entre l'hème et les peptides qui permettent la solubilisation de l'hème à pH acide. La **Figure 7** montre également que dans un intervalle de pH compris entre 4,5 et 6,5, la solubilité de l'hydrolysate diminue fortement. Cette zone de pH correspond à la zone de précipitation de la fraction peptidique décolorée (débarassée de l'hème). Dans cette zone de pH, la fixation d'anions sur les chaînes polypeptidiques diminue la charge nette des peptides et permet la formation d'interactions. Ces interactions provoquent alors la précipitation des peptides et de l'hème. Léonil et coll. (1994) ont décrit des mécanismes de précipitation similaires avec des hydrolysats peptiques de caséine. Ces résultats montrent que la solubilité de la fraction peptidique influence considérablement la solubilité de l'hydrolysate.

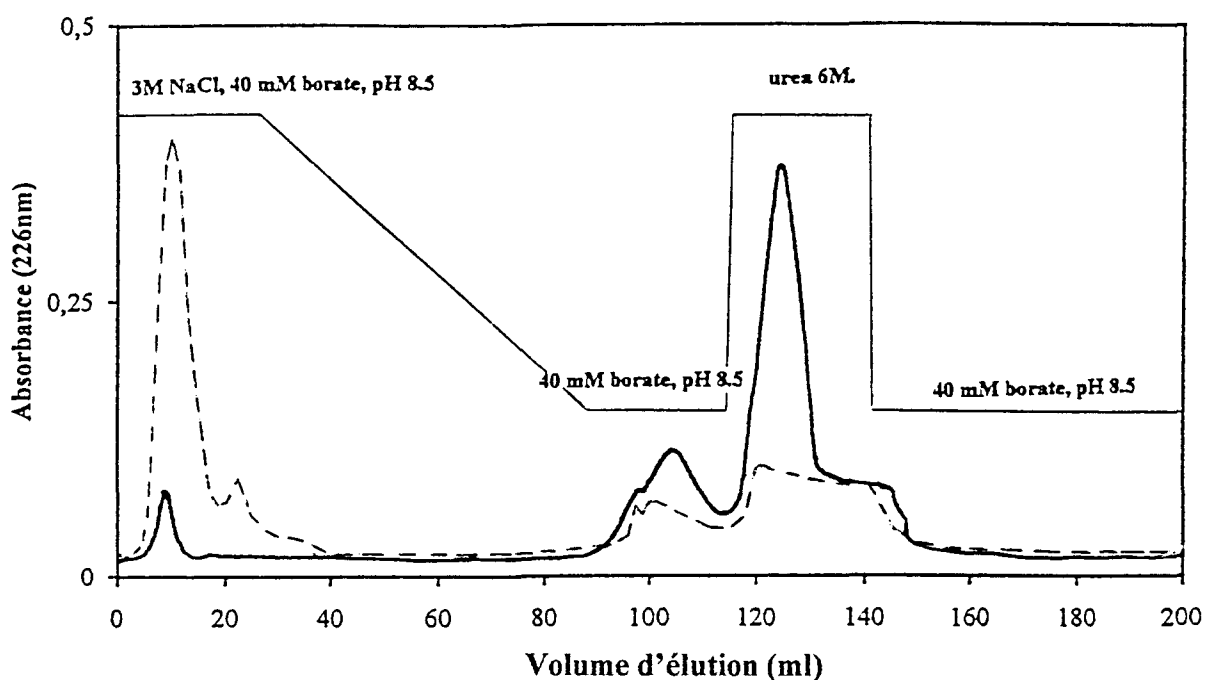


**-Figure 7-** *Solubilité de l'hème en fonction du pH.*  
(○) *Hydrolysate enrichi en fer héminique ; (◊) hème pur ;*  
(■) *solubilité de la fraction peptidique de l'hydrolysate enrichi après décoloration.*



L'existence d'interactions entre l'hème et les peptides de l'hydrolysat décoloré est confirmée par chromatographie d'interaction hydrophobe sur matrice d'hème-agarose. La **Figure 8** met en évidence, dans l'hydrolysat enrichi, une fraction peptidique fortement retenue sur la colonne et qui n'est éluée qu'en présence d'urée ou de chlorure de guanidine (résultat non montré). Ces sels sont assimilés à des sels de type "salting in". Ils facilitent la dissociation des complexes hème-peptide, en interagissant de façon préférentielle avec les zones hydrophobes des peptides et avec les molécules d'hémines greffées sur la phase stationnaire. L'augmentation de la solubilité des groupements hydrophobes facilite alors l'éluion des peptides retenus sur la colonne. En revanche, la **Figure 8** montre également que les peptides éliminés dans le filtrat, au cours de l'enrichissement par ultrafiltration sont élués dans le volume mort de la colonne. Les peptides contenus dans cette fraction ne contractent pas d'interaction avec l'hème, même en présence de concentrations élevées en NaCl. Les résultats obtenus avec la colonne d'hème-agarose répondent parfaitement aux effets de tension superficielle (théorie des cavités de Melender et horvath, 1977) et d'interaction préférentielle (Arakawa 1991) habituellement décrits en chromatographie hydrophobe classique.

Ces résultats démontrent l'existence d'interactions puissantes entre l'hème et les peptides du rétentat, en présence de NaCl.

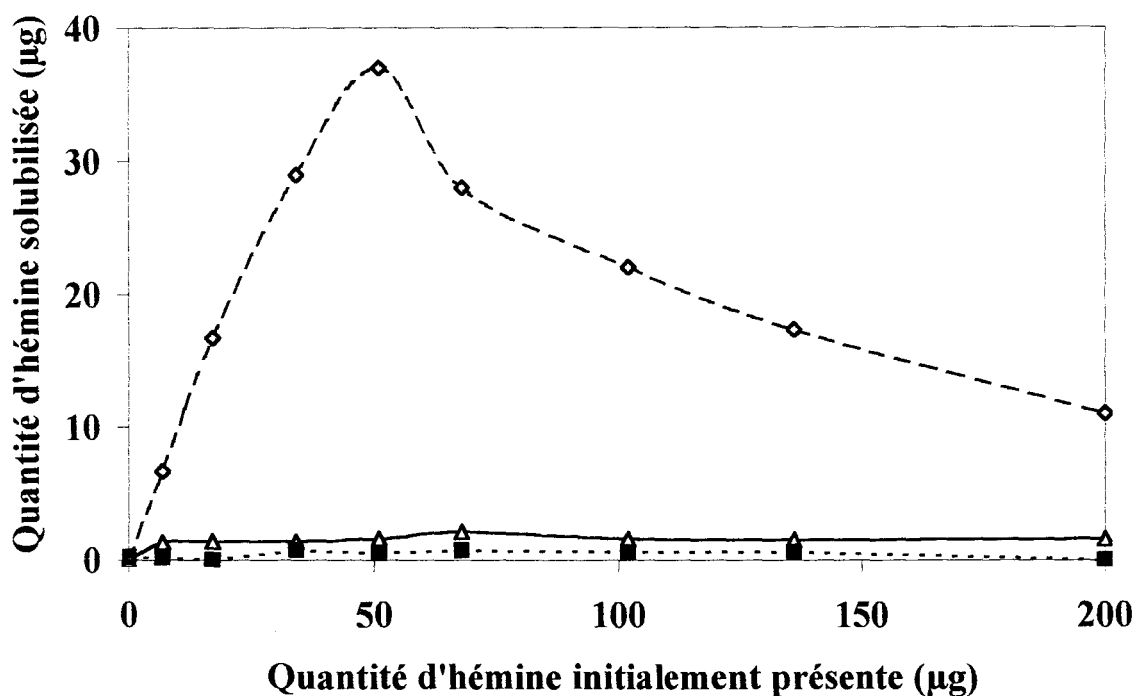


**-Figure 8-** *Chromatographie d'interaction hydrophobe sur hémine agarose, de la fraction peptidique de l'hydrolysat décoloré (—) et des peptides du filtrat (----).*

Elution : gradient linéaire décroissant de NaCl (3 M à 0 M) dans du tampon borate 40 mM, pH 8,5 puis urée 6M. Colonne : hémine-agarose 50 x 5,6 mm. Echantillons : 6 mg de peptides dans 250 µl de tampon de départ. Débit : 10 ml.h<sup>-1</sup>. Détection à 226 nm.

## 2.2 Capacité des peptides à solubiliser l'hème

Après avoir mis en évidence l'existence d'interactions hème-peptides, nous avons voulu quantifier la capacité des peptides de l'hydrolysate enrichi à solubiliser l'hème, en particulier à pH acide. Pour cela, la fraction peptidique (quantité constante de 64  $\mu\text{g}$ ) est réassociée avec des quantités croissantes d'hémine (0 à 200  $\mu\text{g}$ ) dans un mélange acétone-tampon HCl/KCl (3v/1v) à pH 2. L'acétone est ensuite évaporée sous vide. La **Figure 9** exprime la quantité d'hème, solubilisé par les peptides après évaporation de l'acétone. Elle montre que 64  $\mu\text{g}$  de peptides héminiques (rétentat) permettent de solubiliser jusqu'à 37  $\mu\text{g}$  d'hémine, soit un rapport [hème soluble]/[peptide] supérieur à 50% ! Ces résultats confirment également que les peptides éliminés par diafiltration n'ont qu'une très faible affinité pour l'hème. L'hémine incubée en présence des peptides du filtrat n'est, en effet, guère plus soluble à pH 2 que l'hémine pure.



**-Figure 9-** *Solubilisation de l'hème par une quantité constante (64  $\mu\text{g}$ ) de peptides issus des différentes fractions décolorées. (●) hémine + fraction peptidique de l'hydrolysate enrichi, (△) hémine + fraction peptidique du perméat, (■) hémine seule.*

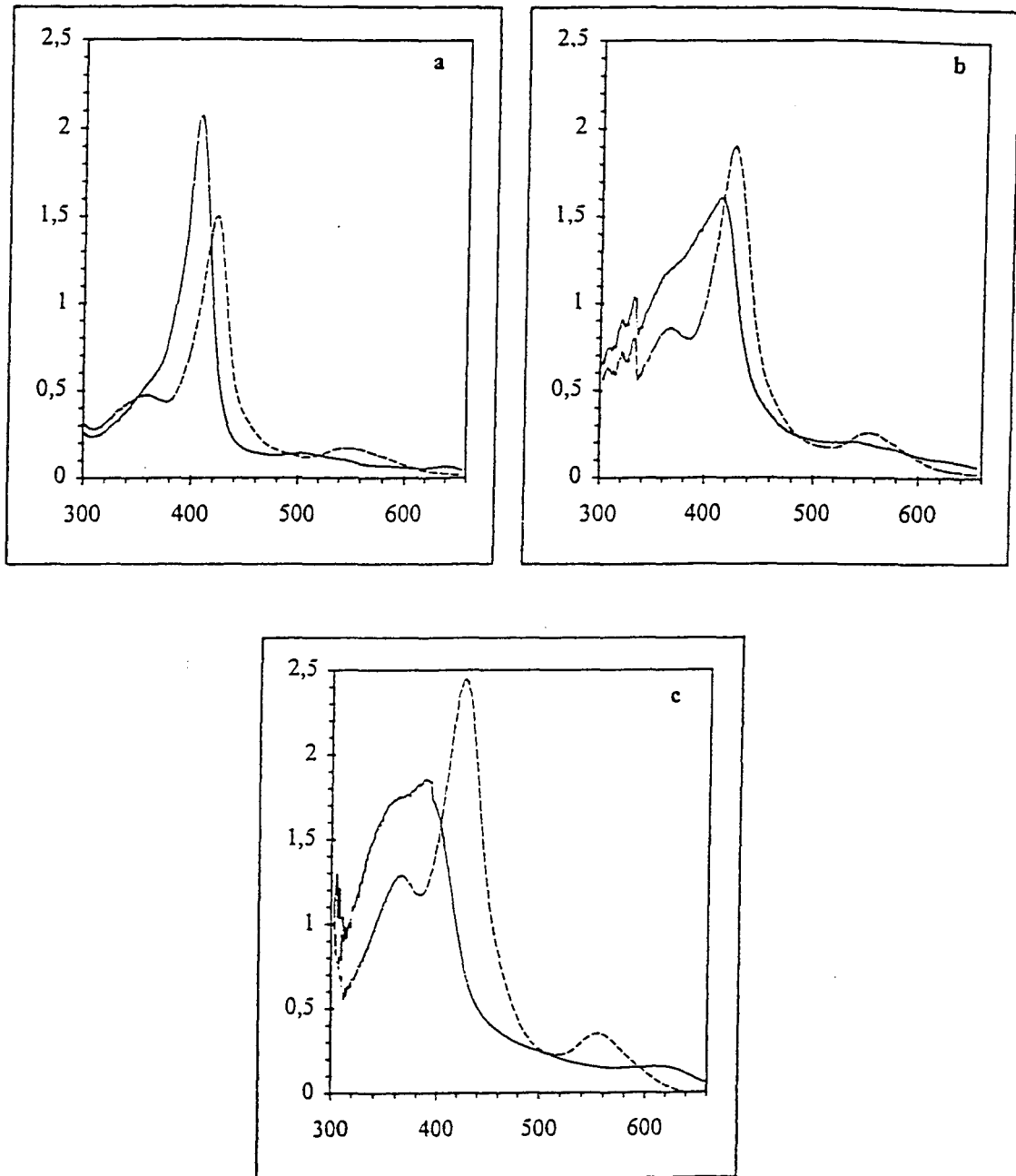
Notons que pour des rapports [hème]/[peptides] élevés (supérieurs à 50%, g/g), la quantité d'hème solubilisée décroît proportionnellement à la quantité d'hème initialement présente dans le milieu. Le dosage des peptides dans les surnageants de centrifugation montre

que l'agrégation des molécules d'hème s'accompagne d'une précipitation des peptides auxquels elles sont complexées. Ces résultats montrent que, outre les interactions hème-peptide, d'autres interactions sont susceptibles de se développer dans l'hydrolysate d'hémoglobine enrichi en hème.

### **-3- MISE EN EVIDENCE DES INTERACTIONS MOLECULAIRES AU SEIN DE L'HYDROLYSAT ENRICHI EN HEME**

#### **3.1 Interactions hème-hème**

Les interactions hème-hème ont été mises en évidence par étude spectrophotométrique UV-visible. Le spectre représenté en trait plein sur la **Figure 10a** est caractéristique de l'hème monomère avec une bande de Soret étroite et une absorbance élevée à 410 nm. Il s'agit du spectre de l'hème dans la structure de l'hémoglobine. Le spectre de l'hémoglobine, en présence de cyanure de potassium, est représenté en trait pointillé. Le spectre de l'hème pur en solution à pH 9,5, représenté sur la **Figure 10c** en trait plein, est quant à lui caractéristique de l'hème à l'état polymère avec une large bande de Soret et un maximum d'absorption à 410 nm, plus faible que celui de l'hème monomère. Le spectre de la **Figure 10b** semble montrer la présence d'une majorité d'hème à l'état polymérisé, dans l'hydrolysate d'hémoglobine enrichi, avec une bande de Soret large et dont l'intensité maximum est modérée. L'allure de ce spectre indique clairement, la présence d'interactions hème-hème au sein de l'hydrolysate enrichi.



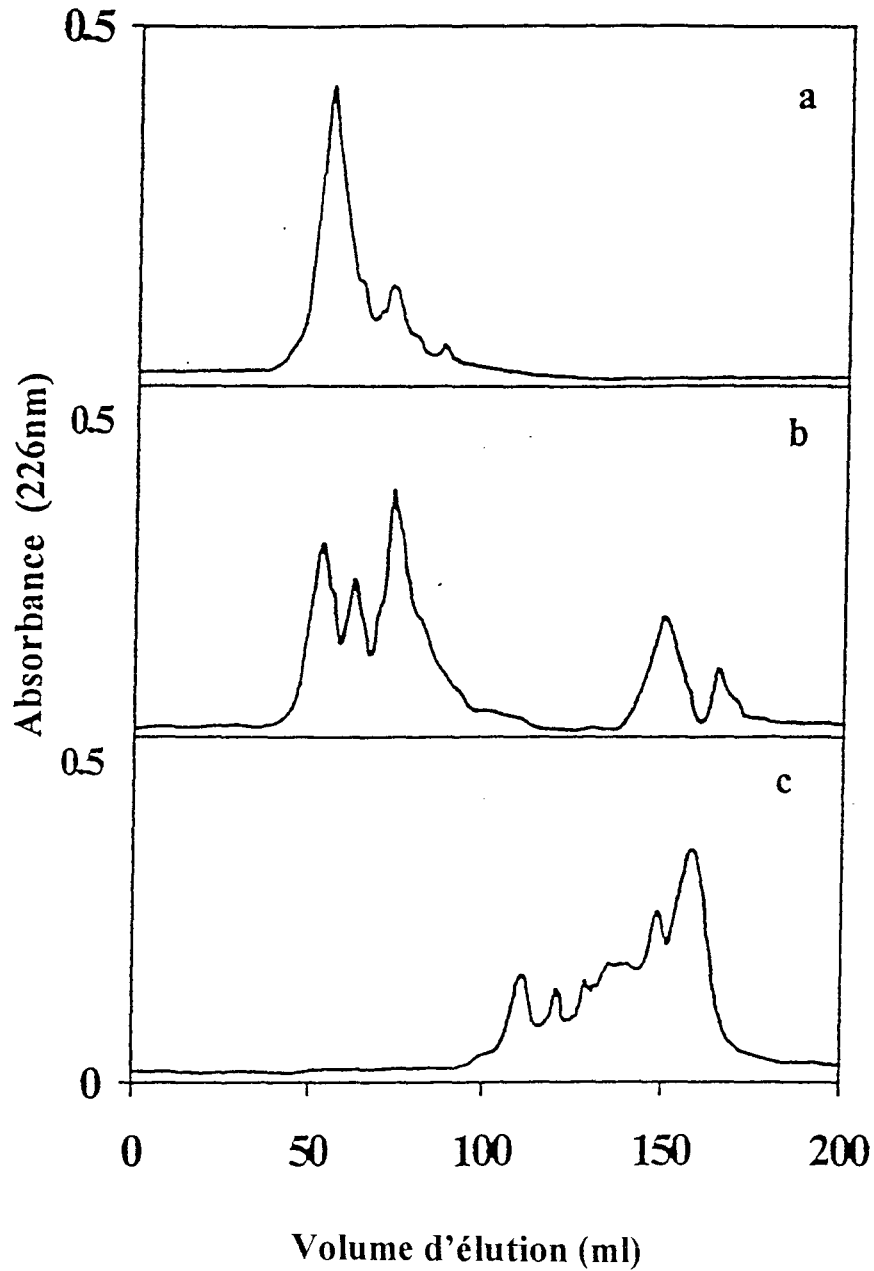
**-Figure 10-** *Spectre UV-visible de l'hémoglobine bovine (a), de l'hydrolysat peptidique (b) et de l'hémine pure (c), à pH 9,5 en absence (—) ou en présence (-----) de cyanure.*

### 3.2 Interactions peptide-peptide

L'existence d'interactions peptide-peptide dans l'hydrolysate enrichi en hème, a été démontré par chromatographie de gel filtration sur Sephadex G<sub>50</sub>. Les profils chromatographiques obtenus avec les peptides de l'hydrolysate enrichi (**Figure 11a**), mettent en évidence une importante fraction peptidique de poids moléculaire supérieur à 30 kDa (seuil d'exclusion du Sephadex G<sub>50</sub>). Rappelons que le poids moléculaire des mêmes peptides avaient été estimé à moins de 5 kDa par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS. En s'associant, ces peptides formeraient donc des agrégats de très haut poids moléculaire, exclus du Sephadex G<sub>50</sub>. Ces interactions semblent particulièrement puissantes puisqu'elles résistent en partie à l'action de sels chaotropiques tels que le SDS 0,3% ou l'urée 6M (résultats non montrés) et ne sont dissociées que par le chlorure de guanidine 5M (**Figure 11b**). De nombreux auteurs considèrent le chlorure de guanidine comme le sel le plus puissant pour dissocier les interactions hydrophobes contractées entre les protéines. Ce sel agit en diminuant la tension superficielle de l'eau. Ce type d'interactions est bien souvent dépendant de la concentration en peptides ou en protéines. Il est donc probable que des concentrations plus faibles minimiseraient les interactions peptide-peptide, mais nous nous éloignerions alors des concentrations effectives de l'hydrolysate. D'autre part, la dilution observée lors du passage sur les colonnes de chromatographie basse pression ne permet pas de détecter des échantillons de trop faible concentration en peptides et nécessiteraient l'emploi de systèmes chromatographiques haute pression. Notons que les peptides éliminés dans le filtrat sont retenus sur la colonne de Sephadex G<sub>50</sub> démontrant ainsi l'absence d'association de haut poids moléculaire au sein du filtrat.

L'étude des différentes fractions peptidiques décolorées, par chromatographie liquide haute performance de phase inverse (**Figure 12**), corrobore l'hypothèse d'interactions peptide-peptides. En effet, le chromatogramme obtenu avec l'hydrolysate d'hémoglobine enrichi (**Figure 12b**) présente un grand nombre de fractions peptidiques mal résolues, dans la zone la plus hydrophobe du chromatogramme (40%-60% d'acétonitrile). Le chromatogramme obtenu avec les peptides du filtrat montre des fractions plus hydrophiles (0%-35% d'acétonitrile) et bien résolues (**Figure 12c**).

L'étude HPLC confirme l'existence d'associations entre les peptides du filtrat. Elle montre également que l'étape de filtration permet la séparation sélective de deux populations de peptides différentes sur le plan physico-chimique.

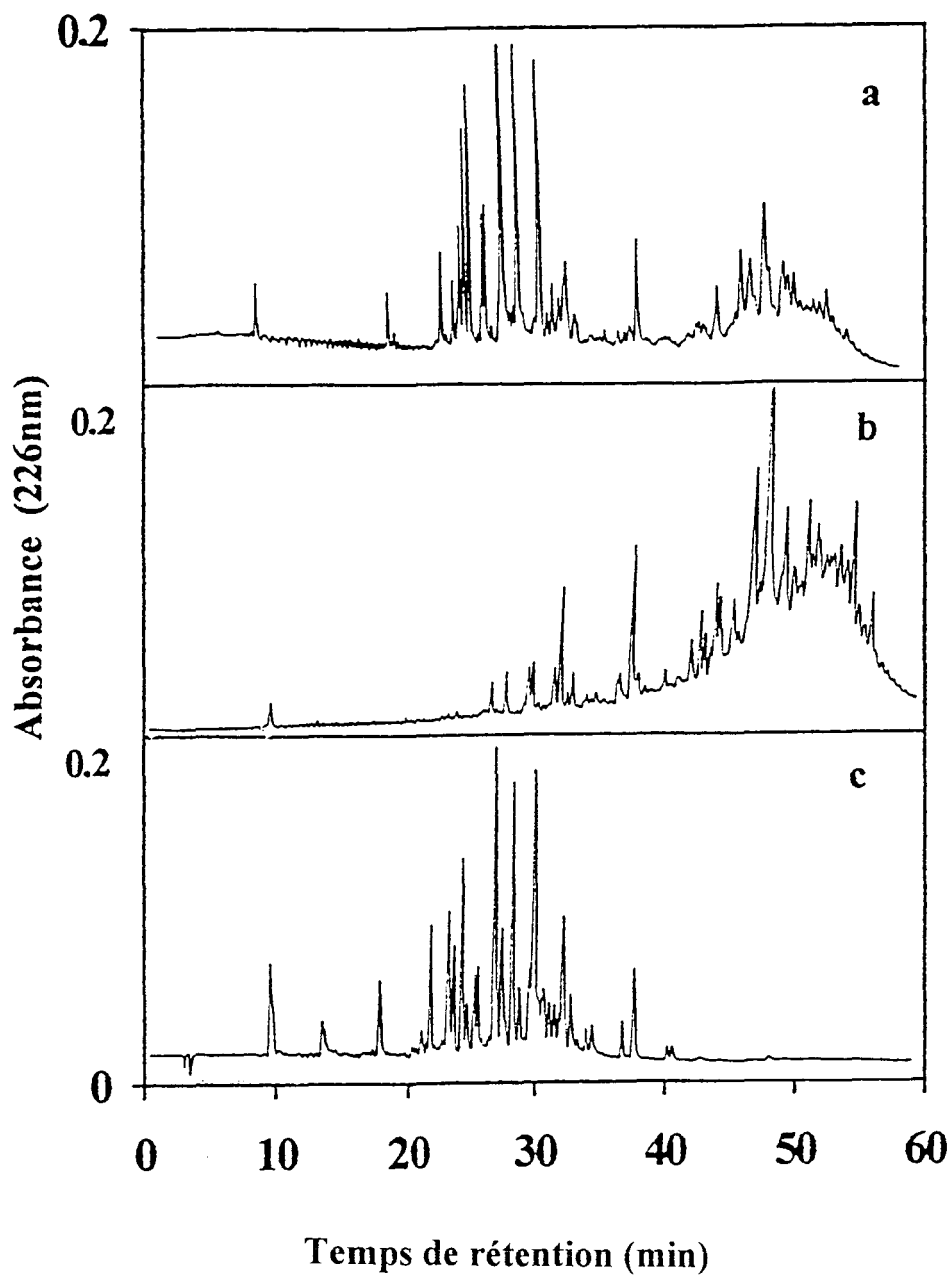


**-Figure 11- *Chromatographie de gel filtration sur Sephadex G50, des différentes fractions peptidiques de l'hydrolysate d'hémoglobine (colonne : 2,5 x 34 cm ; débit 15 ml h).***

a : hydrolysate enrichi décoloré ; éluant tampon borate 40 mM, pH 9

b : hydrolysate enrichi décoloré ; éluant Chlorure de guanidine dans tampon borate 40 mM, pH 9

c : Peptides du filtrat ; éluant tampon borate 40 mM, pH 9



**-Figure 12-** *Analyse chromatographique CLHP en phase inverse (colonne Vydac, C<sub>18</sub>, 0.46 x 25 cm), des différentes fractions peptidiques décolorées : de l'hydrolysât d'hémoglobine total (a) ; de l'hydrolysât enrichi en hème par ultrafiltration (b) ; du filtrat (c).*

Conditions d'éluôn : Solvant A, H<sub>2</sub>O/TFA 0.1% (v/v) ; Solvant B, acéonitrile/TFA 0.05% (v/v) ; 0 à 60% de solvant B en 60 minutes ; débit 1 ml.min<sup>-1</sup> ; détection 226 nm ; Echantillons 200 µg dans 100 µl de solvant A

Contrairement aux peptides éliminés dans le filtrat, les peptides de l'hydrolysate enrichi ont une grande affinité pour l'hème et montrent une excellente capacité à solubiliser l'hème à pH acide. Cette étude montre également l'hétérogénéité de ce type d'hydrolysate, puisque nous avons pu mettre en évidence de multiples associations : hème-peptides, hème-hème et peptides-peptides. Ainsi, il semblerait que l'hème, à l'état polymérisé, contracte des interactions avec des peptides eux-mêmes associés à d'autres peptides. Ces agrégats formeraient des édifices de très haut poids moléculaire et permettraient d'expliquer d'une part l'exclusion observée en gel filtration sur Sephadex G<sub>50</sub> et d'autre part les taux de rétention élevés, observés lors de l'ultrafiltration.

#### **-4- CARACTERISATION DES INTERACTIONS HEME-PEPTIDES.**

Dans un milieu aussi complexe que notre hydrolysate d'hémoglobine enrichi, il est très difficile de pouvoir caractériser correctement un type d'interaction en particulier. Nous avons donc choisi, pour l'étude de la caractérisation des interactions hème-peptide, d'utiliser un modèle plus simple composé d'hémine pure et d'un peptide purifié, représentatif de la fraction peptidique de l'hydrolysate enrichi.

##### **4.1 Purification d'un peptide de la fraction peptidique de l'hydrolysate enrichi**

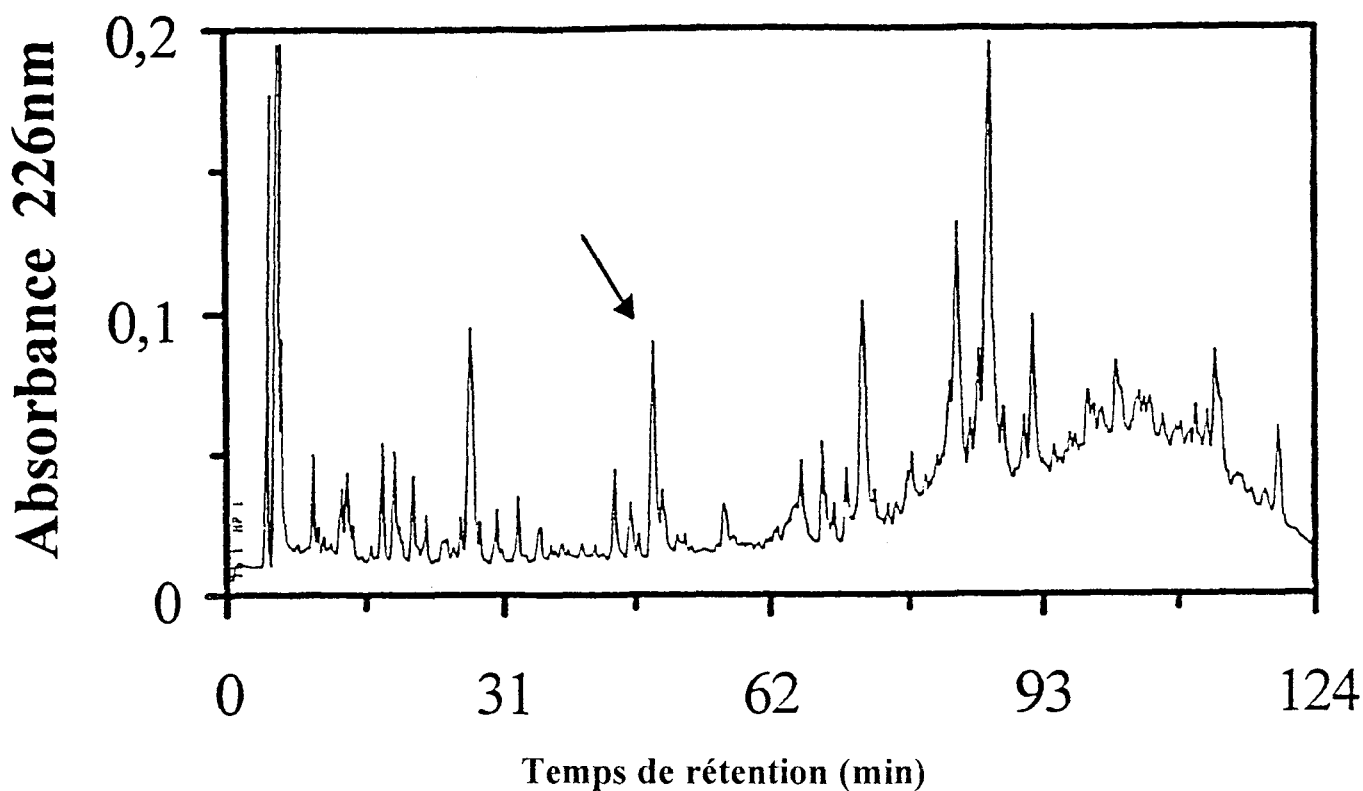
La séparation de l'hydrolysate peptidique par chromatographie liquide haute performance de phase inverse a été réalisée à l'échelle analytique (colonne Vydack C18, 4,6 x 250 mm) en optimisant le gradient d'élution : 19 à 50% d'acétonitrile en 124 min puis transposée à l'échelle semi-préparative (**Figure 13**) sur une colonne Vydack C18, (10 x 250 mm). La colonne utilisée montre un pouvoir résolutif important et permet d'isoler des fractions peptidiques à partir d'un échantillon complexe.

Le choix du peptide repose sur trois critères :

- ☞ Le peptide ne doit pas être trop hydrophile, pour permettre les interactions avec l'hème.
- ☞ Le peptide doit se trouver dans une fraction bien résolue du chromatogramme pour éviter toute interaction avec d'autres peptides, pouvant venir perturber l'étude d'interaction hème-peptide.



☞ Finalement, pour des raisons purement pratiques, le peptide doit se trouver dans une fraction quantitativement majoritaire, pour pouvoir collecter rapidement les quantités de peptide nécessaires aux études d'interaction.



**-Figure 13-** *Purification d'un peptide de l'hydrolysate par CLHP semi-préparative en phase inverse (colonne C18, 250 x 10 mm).*

Eluant A : H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% (v/v) ; Eluant B : Acétonitrile/TFA 0,1% (v/v) ; Gradient 19 à 50% de B en 124 min. Débit 3,5 ml/min. La flèche indique le peptide sélectionné pour l'étude des interactions hème-peptide

La fraction peptidique sélectionnée est indiquée par une flèche sur la **Figure 13**. Elle est éluée en 45 minutes, par 31% d'acétonitrile. Le peptide est ensuite identifié par sa masse et sa composition en acides aminés. La masse exacte du peptide déterminée par spectrométrie de masse est de 3175 Da. Le spectre de masse transformé (**Figure 14**) montre un pic d'intensité maximale à 3176 Da correspondant à la forme protonée du peptide. La présence des pics de moindre intensité représente la forme oxydée (pic à 3192 Da) et le sel de sodium (pic à 3198 Da) du peptide.

L'analyse de la composition en acides aminés, associée à la spectrométrie de masse permet l'identification précise du peptide sélectionné. Le poids moléculaire (3179 Da) déduit de la composition en acides aminés (**Tableau 10**) est similaire à celui précédemment obtenu

en spectrométrie de masse. Ce résultat confirme la pureté du peptide et permet d'identifier de façon certaine la structure primaire du peptide qui correspond au fragment Met<sub>1</sub>-Leu<sub>30</sub> de la chaîne β de l'hémoglobine bovine. La structure primaire du peptide montre que le peptide sélectionné est composé en majorité de résidus aminés acides, qu'il ne contient ni tyrosine, ni histidine et qu'il renferme un résidu tryptophane (amino acide fluorescent).

Dans la structure tertiaire de l'hémoglobine, cette séquence correspond à une double hélice α: hélice I [Thr<sub>3</sub>-His<sub>18</sub>] et hélice II [Asp<sub>20</sub>-Leu<sub>30</sub>] reliées par un acide aminé charnière : Val<sub>19</sub> (**Figure 15**).

---

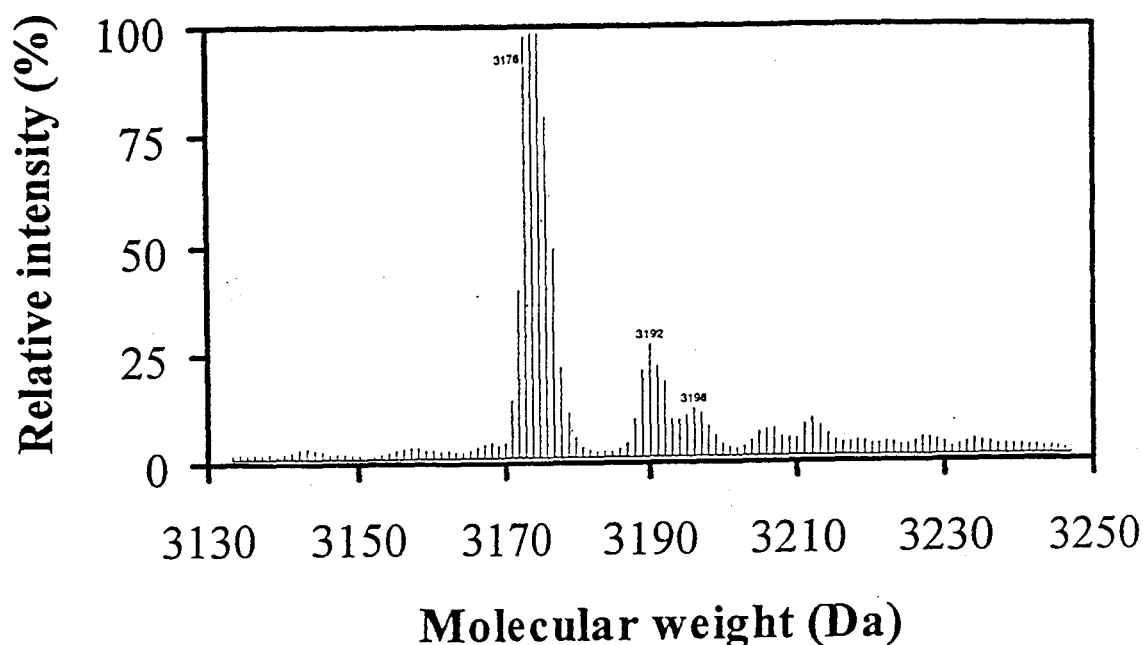
*Composition en acides aminés du peptides (g 100 g d'acides aminés)*

<i>Asp</i>	<i>Thr</i>	<i>Ser</i>	<i>Glu</i>	<i>Gly</i>	<i>Ala</i>	<i>Val</i>	<i>Met</i>	<i>Leu</i>	<i>Phe</i>	<i>Lys</i>	<i>Arg</i>	<i>Trp</i>
7	6,7	14	13,7	15,7	15,8	11	2,8	10	4,1	8,5	5,8	nd

*Deduced molecular weight : 3179 Da*

---

**-Tableau 10-** *Composition en acide aminé du peptide isolé de l'hydrolysate enrichi (valeurs exprimées en g pour 100 g d'acides aminés)*



**-Figure 14-** *Spectre de masse transformé du peptide isolé de l'hydrolysate d'hémoglobine enrichi en hème*

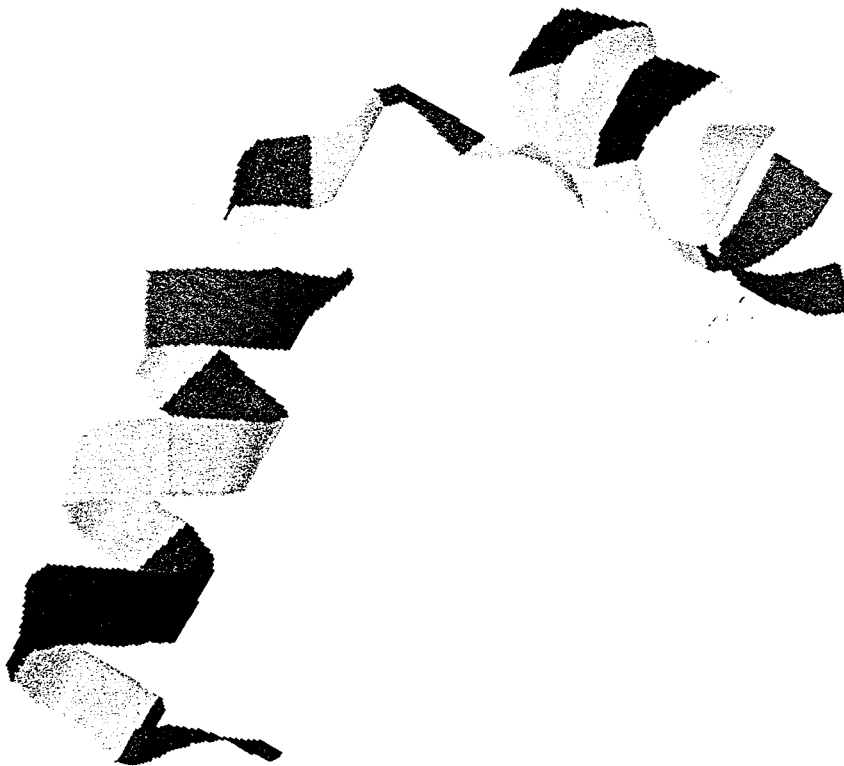
*- Identification du peptide isolé par CLHP -*

<i>Masse</i>	<i>Chaîne</i>	<i>Position</i>	<i>Hélice 1</i>	<i>Hélice 2</i>
3176 Da	Hémoglobine $\beta$	Met <sub>1</sub> - Leu <sub>30</sub>	[Thr <sub>3</sub> - His <sub>18</sub> ]	[Asp <sub>20</sub> - Leu <sub>30</sub> ]

*- Structure primaire du peptide -*

<sup>1</sup>Met-Leu-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys-Ala-Ala-<sup>10</sup>Val-Thr-Ala-Phe-Trp-Gly-  
Lys-Val-Lys-Val-<sup>20</sup>Asp-Glu-Val-Gly-Gly-Glu-Ala-Leu-Gly-Arg-<sup>30</sup>Leu

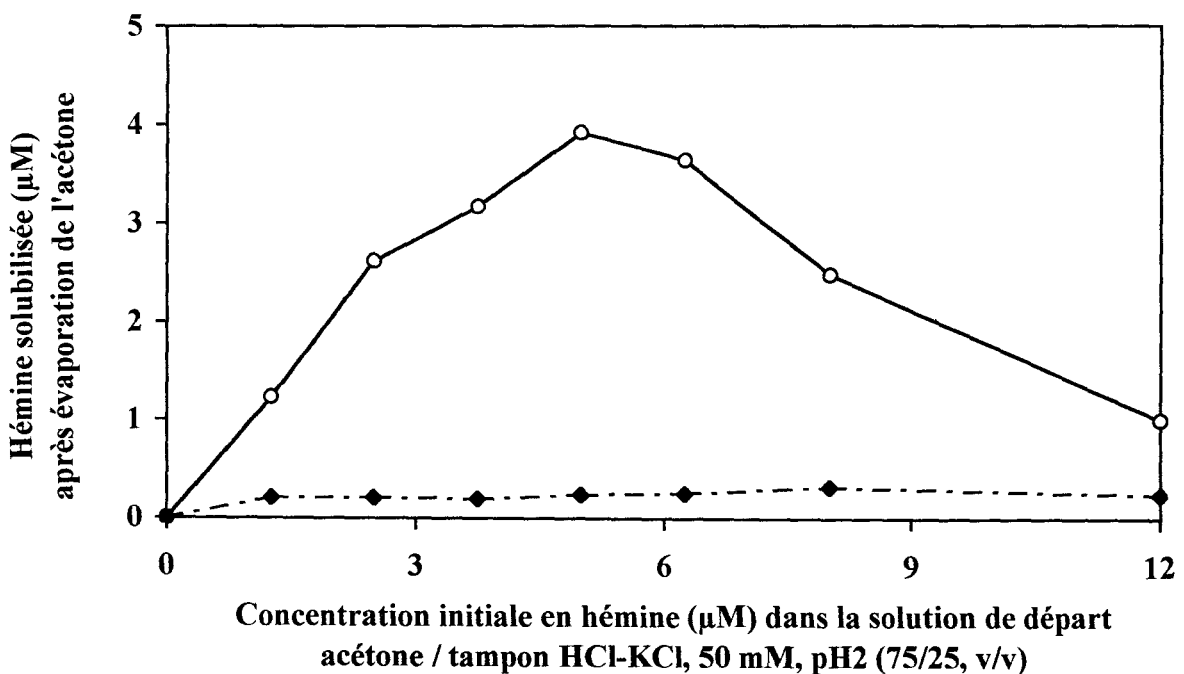
*- Représentation du peptide dans la structure de l'hémoglobine -*



*-Figure 15- Identification et représentation du peptide sélectionné  
pour l'étude des interactions hème-peptide*

### 3.2 Capacité du peptide sélectionné à solubiliser l'hémine

Afin de vérifier que le peptide sélectionné est bien représentatif de la population peptidique de l'hydrolysate enrichi, nous avons évalué la capacité de ce peptide à solubiliser l'hème à pH acide. L'hémine, en solution dans un mélange Acétone / Tampon HCl-KCl 50mM (75/25) pH 2, est incubée avec le peptide ; puis l'acétone est évaporée sous vide. L'étude de la formation du complexe hémine-peptide est réalisée pour une concentration en peptide constante (4  $\mu$ M) et des concentrations en hémine croissantes (0 à 12  $\mu$ M). La courbe obtenue avec le peptide isolé (**Figure 16**) est similaire à celle obtenue avec la fraction peptidique totale (**Figure 9**) ; démontrant ainsi qu'en terme de solubilisation de l'hème, le peptide sélectionné est bien représentatif de l'ensemble des peptides de l'hydrolysate enrichi. La concentration en hémine solubilisée (i.e. en complexe hémine-peptide) est directement proportionnelle à la concentration en hémine initialement présente dans le mélange acétone/tampon. La capacité maximale de solubilisation du peptide est obtenue pour une stœchiométrie 1:1 (M/M), alors que dans les mêmes conditions, l'hémine libre est quasiment insoluble. Il est à noter que pour des concentrations en hémine supérieures à 6  $\mu$ M, la capacité du peptide à solubiliser l'hémine décroît très significativement pour aboutir à la formation de polymères d'hème de haut poids moléculaire et insolubles à pH acide. Leclerc et al. (1993) ont relaté la présence de ces polymères d'hème lors d'interactions entre la carboxyhème et certains peptides amphiphiles.



**-Figure 16- Solubilisation de l'hémine par le peptide à pH 2. La concentration en hémine varie de 0 à 12  $\mu$ M pour une concentration en peptide constante à 4  $\mu$ M. (○) hémine en présence du peptide (4  $\mu$ M), (◆) hémine pure.**

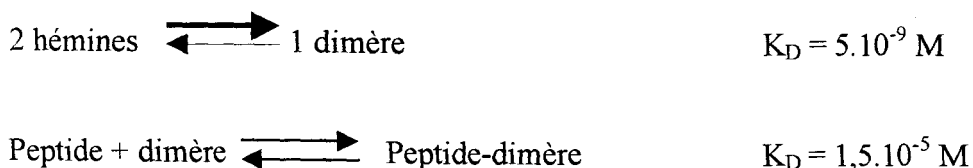
### 3.2 Caractérisation des interactions hème-peptide

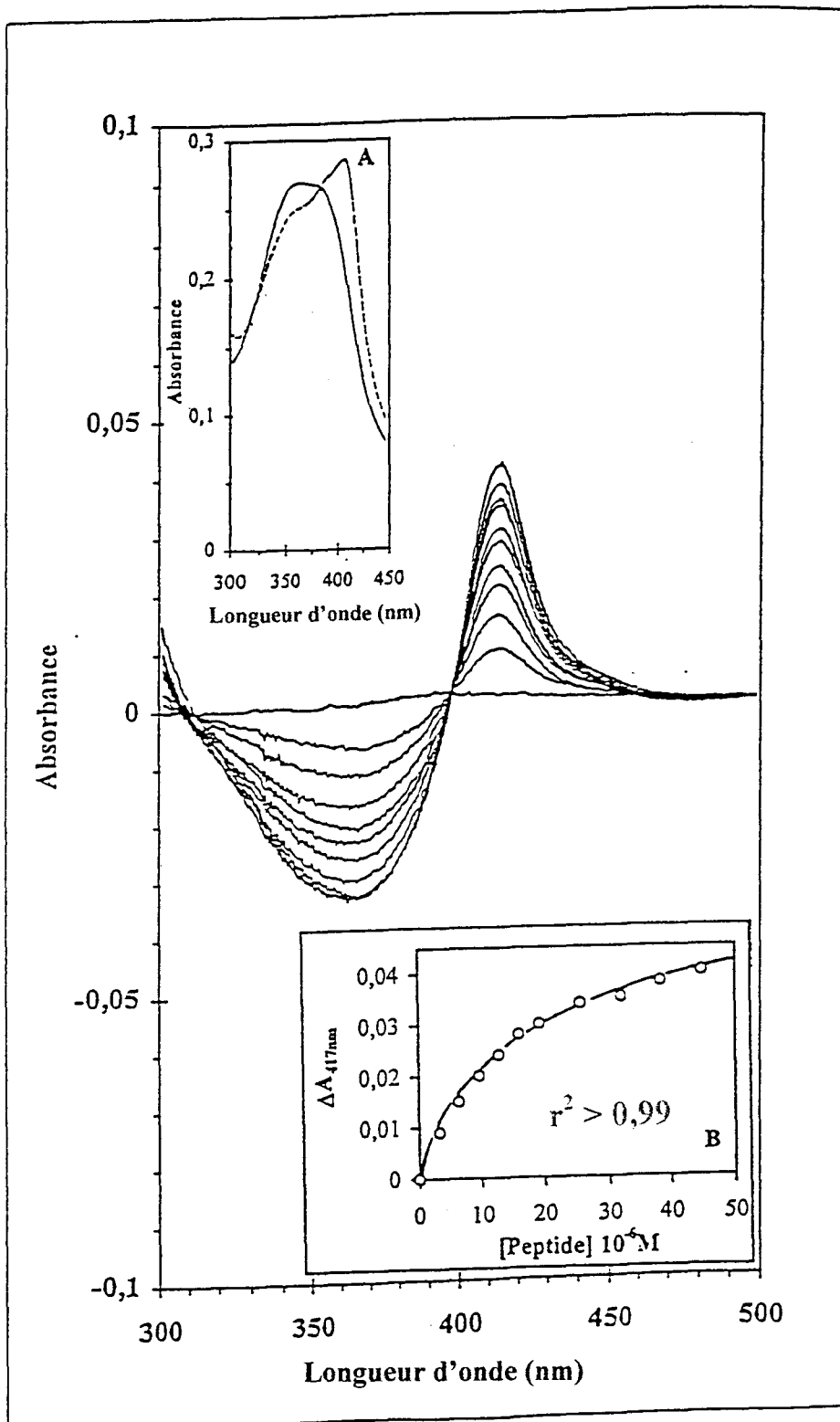
D'une manière générale, les interactions entre l'hème et les peptides peuvent être de 3 types :

- ☞ Interactions de type électrostatique entre les groupements acide propionique de l'hème et les groupements terminaux ou des chaînes latérales des peptides
- ☞ Interactions de type ligand entre l'atome de fer et certains acides aminés tels que les résidus cystéine, histidine ou tyrosine.
- ☞ Interactions de type hydrophobe entre les molécules d'hème et les groupements hydrophobes exposés des peptides.

#### 3.2.1 Mise en évidence de l'association hème-peptide à pH 7,5

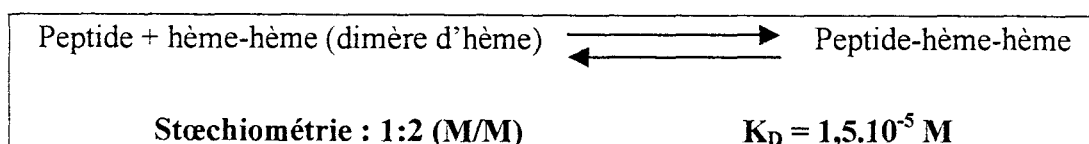
Les associations hème-peptide ont été mises en évidence par spectrométrie UV-visible de différence, à pH 7,5 (dans ces conditions l'hème et le peptide sont solubles), en ajoutant des quantités croissantes de peptide à une solution d'hème de concentration donnée. Le spectre de différence obtenu (**Figure 17**) montre clairement deux points isobestiques, ainsi qu'un pic à 417 nm et une dépression à 363 nm. Ces résultats démontrent l'existence d'un état d'équilibre caractéristique d'une association hème-peptide. Bakes et al. (1986) ont rapporté une constante de dissociation de  $5 \cdot 10^{-9}$  M pour la dimérisation de l'hème en solution aqueuse, dans des conditions proches des nôtres (pH 7,7 et concentrations du même ordre de grandeur). Aussi, dans nos conditions expérimentales (pH 7,5 et concentration en hème de 9,8  $\mu$ M), nous pouvons considérer que 98% des molécules d'hème sont sous forme de dimère. La concentration en dimère d'hème est alors de 4,9  $\mu$ M. Le spectre de différence observé pourrait donc s'expliquer par un équilibre simple entre un peptide et un dimère d'hème (rapport peptide/hème = 1:2 mol/mol). L'existence de cet équilibre est confirmée par le tracé de l'algorithme correspondant (**Figure 17**, encadré B) qui donne un coefficient de corrélation de 99%. La constante de dissociation du complexe peptide-dimère d'hème est estimée à  $1,5 \cdot 10^{-5}$  M. La formation du complexe peptide-dimère d'hème peut être représentée par :





-Figure 17- *Spectre de différence résultant de l'association peptide hémine*

Concentration finale en hémine : 9,8  $\mu\text{M}$ . Concentration en peptide : 3,2 à 44,8  $\mu\text{M}$ . Encadré A : spectre absolu avant addition du peptide (—) et après la dernière addition de peptide (-----).



### 3.2.2 Nature de l'association hémine-peptide à pH 7,5

#### *3.2.2.1 Interactions électrostatiques*

Rappelons que le peptide est en majorité composé de résidus aminés acides. A pH 7,5 le peptide est donc chargé négativement. A ce pH, l'hème est également chargé négativement. Il y a alors répulsion électrostatique entre les deux molécules. Si elles existent, les interactions de type électrostatique sont donc très fortement minoritaires.

#### *3.2.2.2 Interactions de type ligand*

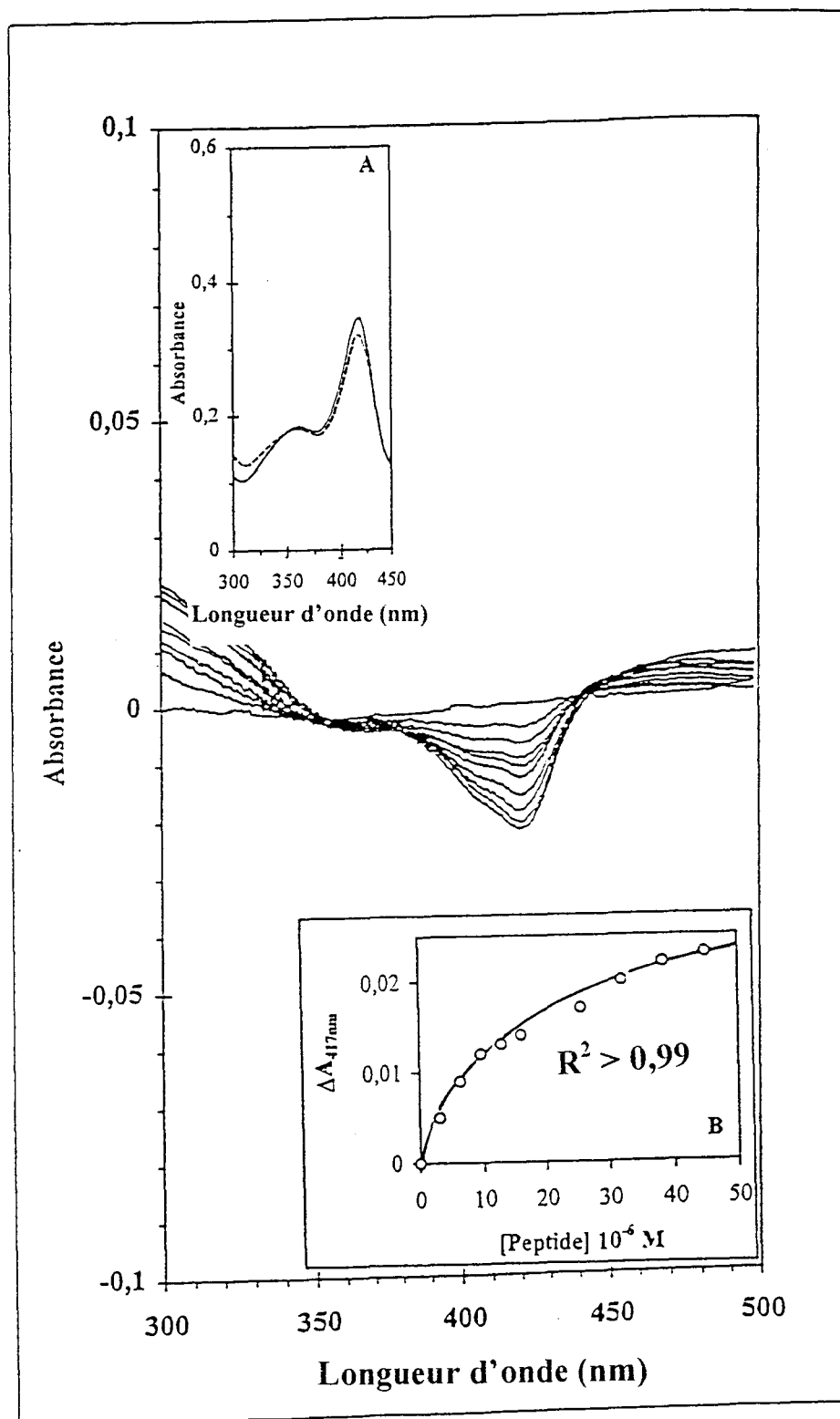
Pour démontrer l'existence éventuelle d'interactions de type ligand, nous avons étudié l'association hémine-peptide par spectrométrie de différence, en ayant complexé au préalable les molécules d'hémine avec un ligand fort du fer : le cyanure. Le spectre de différence représenté à la **Figure 18** est caractéristique d'une association, avec deux points isobestiques ; démontrant ainsi que, quand le fer ne peut pas échanger de doublet électronique, il existe tout de même une association entre le l'hème et le peptide. L'étude de l'équilibre entre le peptide et la cyanhémine (à l'état de monomère) montre une stœchiométrie de 1:1 (M/M), un coefficient de corrélation de 99% et une constante de dissociation du complexe cyanhémine-peptide de  $1,7 \cdot 10^{-5}$  M (**Figure 18**, encadré B). Leclerc et al. (1993), lors de l'association cyanhémine-Mastoporan (peptide de 14 acides aminés, isolé d'une toxine), avaient obtenu une constante de dissociation de  $10^{-5}$  M et une stœchiométrie de 1:1 (M/M). La constante de dissociation obtenue en présence de cyanure, est très proche de celle obtenue avec l'hémine seule et démontre que, dans nos conditions expérimentales, les interactions de type ligand entre l'hème et le peptide sont également très minoritaires. La structure du peptide est peu favorable à ce type d'interactions puisqu'elle ne contient pas d'acide aminé ligand du fer.

#### *3.2.2.3 Interactions de type hydrophobe*

L'existence de ces interactions a été démontrée en réalisant l'association hémine-peptide en présence d'un agent dénaturant des liaisons hydrophobes : l'éthylène glycol. Le spectre de différence présenté à la **Figure 19** montre que l'hémine, en solution dans l'éthylène glycol 50% (v/v), n'est plus capable de s'associer au peptide et démontre ainsi la nature hydrophobe de la liaison hémine-peptide.

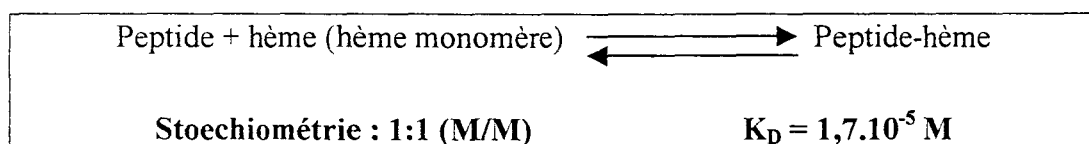
L'hypothèse d'une interaction de type hydrophobe entre l'hème et le peptide est confirmée par spectrofluorimétrie. La **Figure 20** montre en effet un déplacement de la longueur d'onde d'émission de fluorescence maximale vers l'UV. Cet effet ipsochrome est caractéristique des associations hydrophobes.

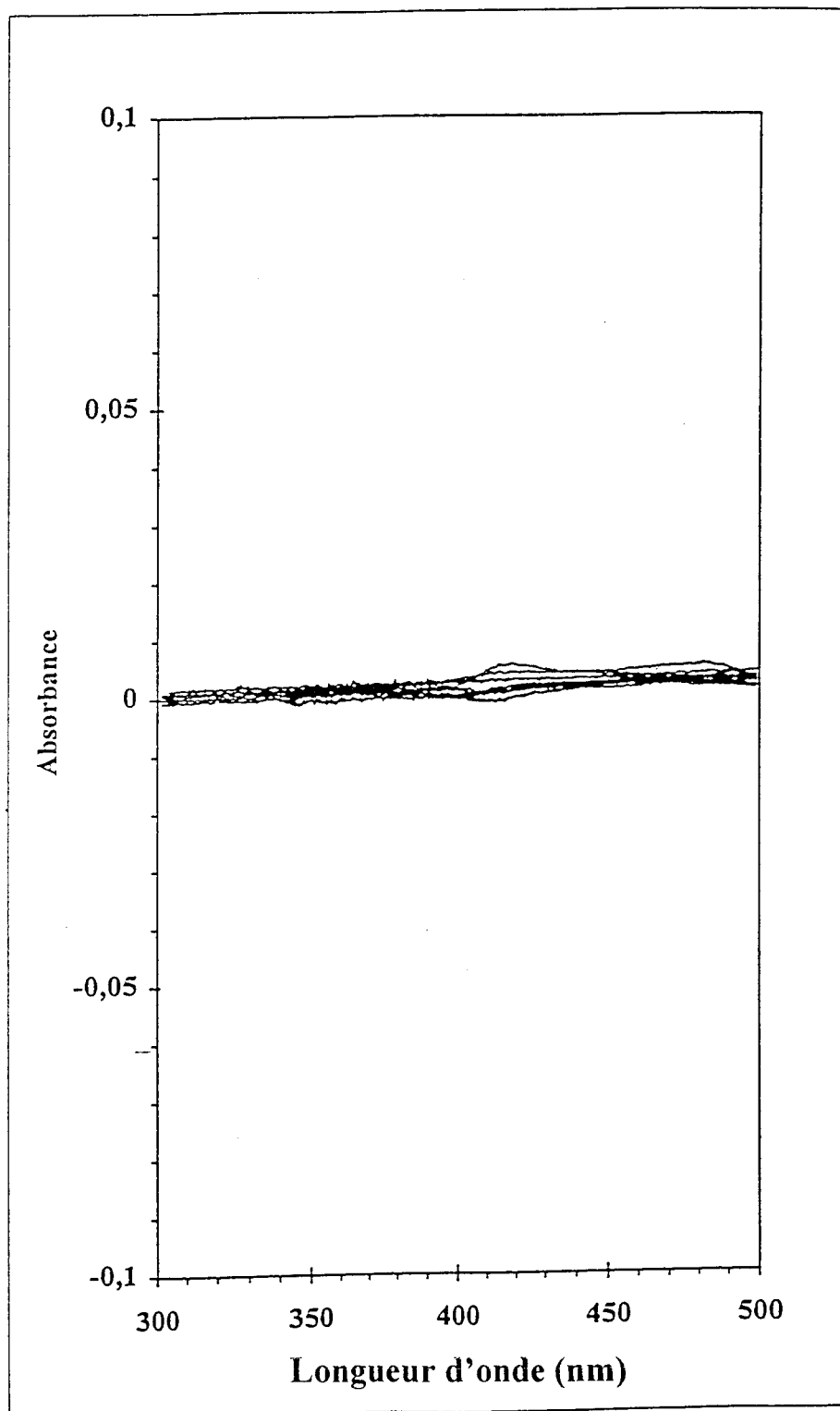




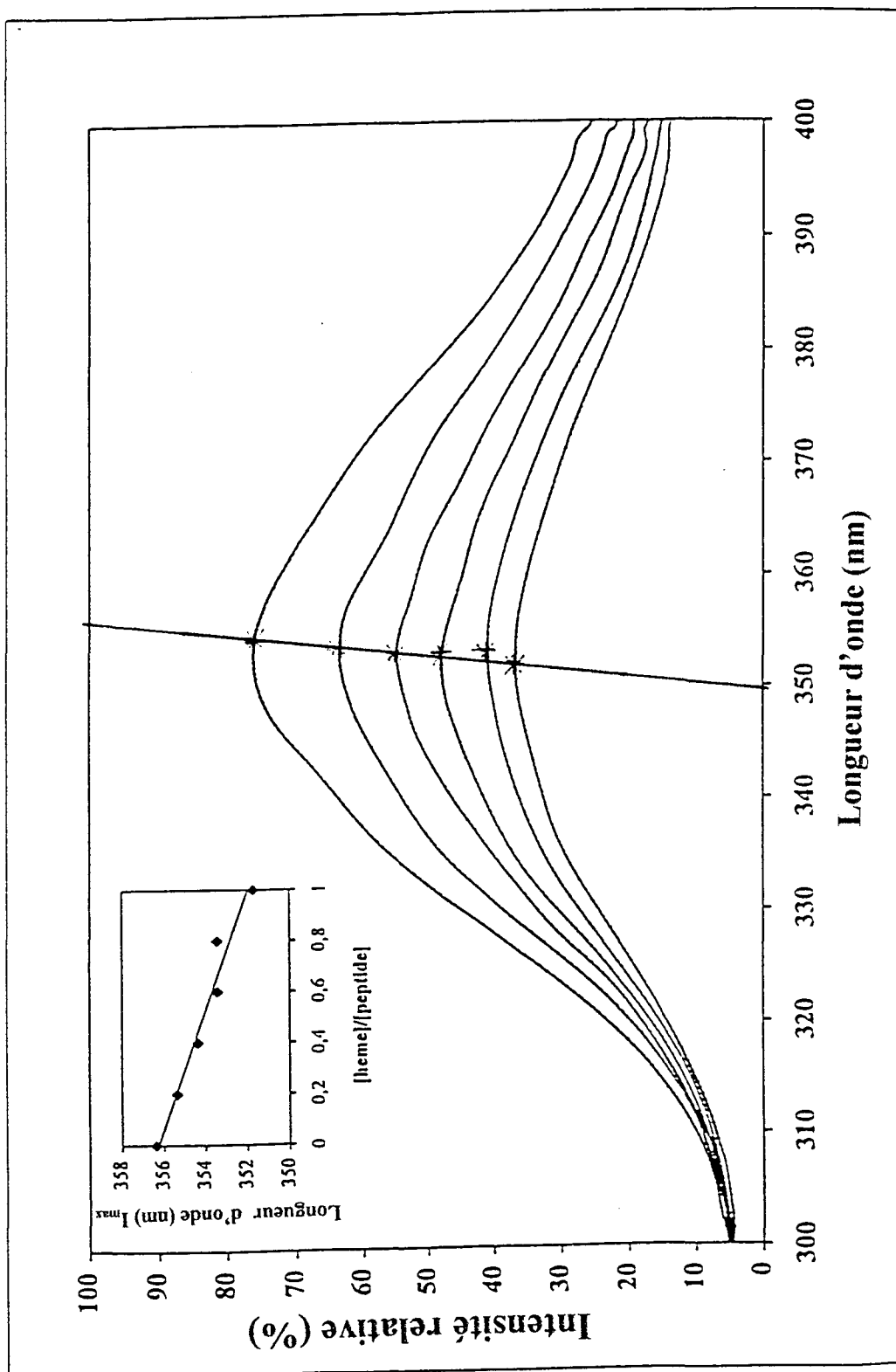
-Figure 18- *Spectre de différence résultant de l'association peptide-cyanhémine*

Concentration finale en hème : 9,8  $\mu\text{M}$ . Concentration en peptide : 3,2 à 44,8  $\mu\text{M}$ . Encadré A : spectre absolu avant addition du peptide (—) et après la dernière addition de peptide (-----).





**-Figure 19-** Spectre de différence résultant de l'addition du peptide à une solution d'hémine contenant de l'éthylène glycol (50%, v/v).



**-Figure 20-** *Déplacement de l'émission de fluorescence maximale du tryptophane au cours de l'association hémine-peptide.*

Conditions : peptide 5  $\mu$ M ; hémine 0 à 5  $\mu$ M dans un tampon Tris-HCl, 50 mM, pH 7,5 ; 22°C ; longueur d'onde d'excitation : 280 nm

**4<sup>ème</sup> partie : Recherche de méthodes alternatives pour augmenter  
la teneur en hème des hydrolysats d'hémoglobine**

Nous avons montré précédemment que l'ultrafiltration de hydrolysats pepsiques d'hémoglobine à l'échelle pilote permettait d'amener le rapport [hème]/[peptide] à 6% (g/g). Un enrichissement plus poussé en hème permettrait une diminution supplémentaire du nombre de "prise orale" et améliorerait ainsi le confort des patients traités. Il semblait donc intéressant d'exploiter les propriétés hydrophobes de la fraction peptidique héminique afin de développer une méthode simple et peu coûteuse d'enrichissement en fer héminique. Deux observations paraissaient particulièrement appropriées à la réalisation d'un tel projet :

☞ D'une part, les études d'ultrafiltration de l'hydrolysats pepsiques ont permis de mettre en évidence des différences de solubilité importantes entre la fraction peptidique héminique contenue dans le rétentat (plus de 90% des peptides précipitent à pH acide pour une concentration en NaCl de 0,75M) et les peptides hydrophiles éliminés dans le filtrat (dont la quasi-totalité restent soluble dans des conditions identiques). Une précipitation fractionnée de l'hydrolysats pepsiques d'hémoglobine par NaCl, suivie d'un dessalage par électrodialyse a donc été entreprise pour préparer une fraction peptidique enrichie en fer héminique.

☞ D'autre part, les essais de réassociation de l'hème avec la fraction peptidique décolorée du rétentat ont établi que cette fraction peptidique héminique possédait un fort potentiel de solubilisation de l'hème puisqu'il était possible d'atteindre un rapport [hème]/[peptide] de 50%. Il semblait donc réalisable de surenrichir en hème la fraction peptidique héminique du rétentat, en apportant de l'hème extrinsèque à l'hydrolysats. Pour des raisons d'ordre économique, la valeur ajoutée du produit était trop faible pour permettre l'utilisation d'hème pur d'un coût trop élevé. En nous basant sur les travaux de Sannier (1992) qui avait isolé par hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine bovine une fraction insoluble très riche en hème, nous avons choisi d'utiliser l'hème issu d'une hydrolyse pepsique de l'hémoglobine à haut degré d'hydrolyse (21%), pour le resolubiliser ensuite par l'hydrolysats peptidique héminique issu du procédé.

## **-1- PRECIPITATION PAR LE CHLORURE DE SODIUM ET ELECTRODIALYSE**

### **1.1 Matériels et méthodes**

Deux litres d'une solution d'hémoglobine à 5,6% (p/v) sont hydrolysés par la pepsine à pH 4 et à 40°C, dans les conditions décrites dans le procédé. Après centrifugation de

l'hydrolysate 15 minutes à 5000 tr/min, du chlorure de sodium est ajouté au surnageant à une concentration de 0,75 M. Après 30 minutes, la fraction précipitée contenant l'hème est récupérée par centrifugation puis diluée par 1,5 litres d'eau déminéralisée. Le pH est ajusté à 8 par de la soude, et le volume de la solution est ajusté à 2 litres.

Cette solution est ensuite dessalée par électrodialyse avec un électrodialyseur Eurodia LB. Les deux litres d'hydrolysate sont introduits dans le compartiment de dilution D2. Les autres compartiments sont remplis avec deux litres de NaCl (10g/l) pour le compartiment de concentration C1 et trois litres de NaCl (30 g/l) pour le compartiment de l'électrode. Le système est dégazé à un débit de 300 l/h puis le débit est ramené à 200 l/h. La conductivité est mesurée dans chacune des cuves C1 et D2. La tension appliquée aux bornes de l'électrodialyseur est fixée à 18 Volts. L'intensité est relevée régulièrement afin de déterminer la résistivité des solutions et d'en déduire la conductivité des solutions. Des échantillons sont prélevés en début et en fin de dessalage afin de déterminer la teneur en hème, en peptides et en chlorure (méthode de Mohr, selon Audigie et al. 1978).

## 1.2 Résultats

Les concentrations en hème et en peptides, déterminées au cours de l'étape d'électrodialyse (**Tableau 11**), montrent que la précipitation de l'hydrolysate par le chlorure de sodium permet d'accroître le rapport [hème]/[peptide] d'un facteur 2,2, avec un rendement en fer hémique de 89%. Le rapport hème/peptide de l'hydrolysate en fin d'électrodialyse est de 7%. Ce rapport est proche du rapport hème/peptide obtenu lors de l'enrichissement en hème par ultrafiltration. Notons que le surnageant de centrifugation est très pauvre en hème (0,004 g/l).

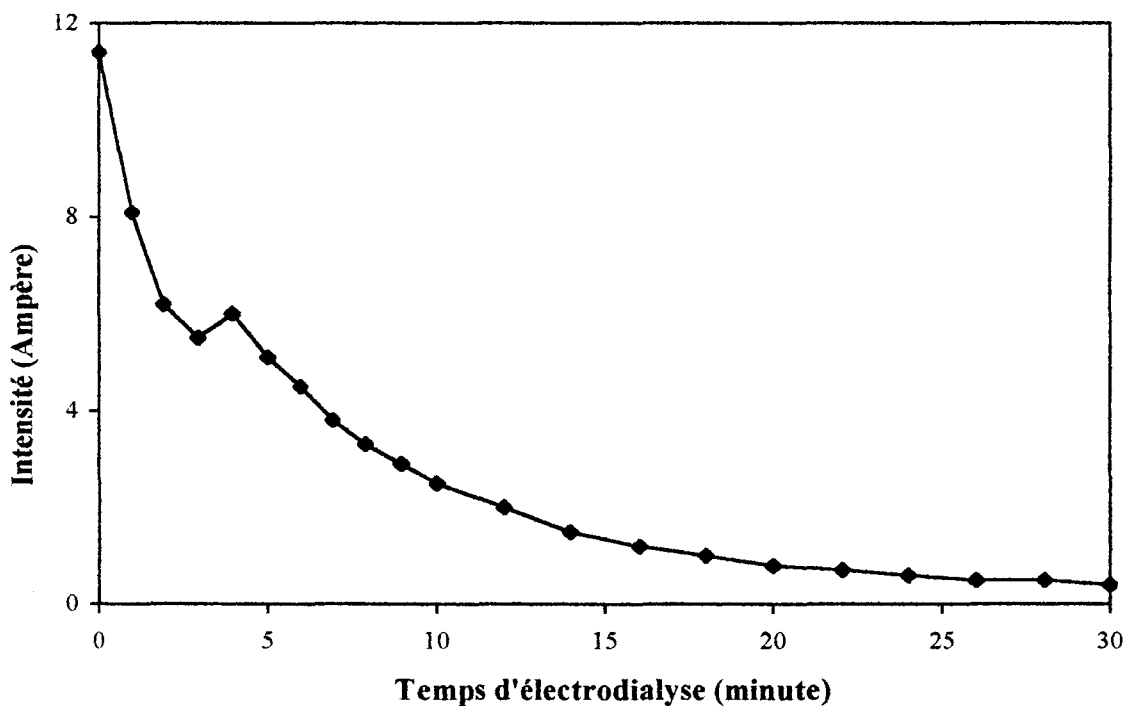
La **Figure 21** illustre la baisse d'intensité au cours du dessalage, mesurée aux bornes du compartiment de dilution (hydrolysate) pour une tension constante appliquée de 18 Volts. Cette baisse d'intensité correspond à une baisse de la conductivité de l'hydrolysate peptique d'hémoglobine. Au terme de 30 minutes, la conductivité de l'hydrolysate passe de 23 mS à 0,8 mS. L'électrodialyse permet d'éliminer plus de 90% des chlorures contenus initialement dans la fraction colorée. Les rendements en hème et en peptides de l'étape d'électrodialyse sont élevés (respectivement 98% et 89%). Leconte (1989) obtient des rendements en protéine de l'ordre de 85 à 90% lors de l'électrodialyse d'hydrolysats d'hémoglobine décolorés. Chow et Mandler (1984) décrivent des rendements similaires en dessalant des solutions de protéines,

de peptides et d'enzymes. Ces derniers auteurs attribuent la perte en peptides, à un transfert de molécules au travers des membranes de dialyse.

Si la précipitation par le chlorure de sodium ne constitue pas une méthode d'enrichissement en hème plus efficace que l'ultrafiltration sur membrane organique (le rapport [hème]/[peptides] en fin d'opération est peu différent de ceux obtenus par diafiltration), cette technique reste une bonne alternative pour l'obtention sélective de la fraction peptidique héminique, avec notamment un rendement en fer héminique élevé (87%). Il convient toutefois d'émettre quelques réserves quant à l'utilisation de cette méthode :

☞ Au cours de l'opération, l'hydrolysate passe par différents états de solubilité (précipitation, resolubilisation...) pouvant être à l'origine d'éventuelles dénaturations. A titre de rappel, l'hydrolysate restait soluble tout au long du procédé utilisant la diafiltration.

☞ D'autre part, cette méthode implique la mise en œuvre d'une étape de dessalage supplémentaire nécessitant un temps de production plus long donc un coût de production plus élevé. Alors que la diafiltration permet de dessaler et de séparer les fractions peptidiques en une seule opération.



**-Figure 21-** Courbe d'intensité mesurée aux bornes du compartiment de dilution de l'électrodialyseur en fonction du temps de dessalage

	Volume (l)	[Hème] (g/l)	[peptides] (g/l)	[Hème]/[peptides] % en poids	[Chlorures] (g/l)	Conductivité (mS)
Hydrolysats total clarifié	1,9	1,8	56	3,20%	—	—
Surnageant	1,4	0,004	40	0,10%	—	—
Hydrolysats peptidique héminique	1,9	1,6	23	7%	4,45	22
Hydrolysats peptidique héminique dessalé	2,3	1,3	18	7%	0,39	0,8
Compartiment de concentration avant dessalage	—	—	—	—	—	98
Compartiment de concentration après dessalage	—	—	—	—	—	800

***Rendement global en fer : 87%***

***Dessalage : 91%***

**-Tableau 11- Evolution des paramètres au cours du procédé d'enrichissement en hème par précipitation au NaCl - électrodialyse**



## **-2- SURENRIICHISSEMENT DE L'HYDROLYSAT PEPTIDIQUE HEMINIQUE PAR DE L'HEME EXTRINSEQUE.**

### **2.1 Matériels et méthodes**

L'hydrolysat peptidique héminique a été obtenu par hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine en conditions ménagées (pH 4), suivie d'une ultrafiltration telle que décrite dans le procédé. Le rapport [hème]/[peptides] du rétentat était de 6,5%.

L'hème extrinsèque a été préparé par hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine en conditions optimales à pH 2 et à 40°C pendant 48 heures. L'hydrolysat centrifugé et la fraction précipitée contenant l'hème ont été remis en solution à pH 8 dans de la soude diluée. Le rapport [hème]/[peptides] de la solution contenant l'hème extrinsèque était de 18% (g/g).

Les essais de surenrichissement ont été réalisés afin de déterminer la quantité optimale d'hème extrinsèque à ajouter à l'hydrolysat peptidique héminique. Des aliquotes, contenant 0 à 20 mg d'hème extrinsèque et 0 à 112 mg de peptides à pH 8, ont été additionnés à des aliquotes de l'hydrolysat enrichi contenant 1 mg d'hème et 15 mg de peptides héminique également à pH 8. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, le pH du mélange a été amené à 2 par de l'acide chlorhydrique. Après centrifugation, l'hème et les peptides ont été dosés dans le surnageant afin de déterminer la quantité d'hème solubilisée par les peptides.

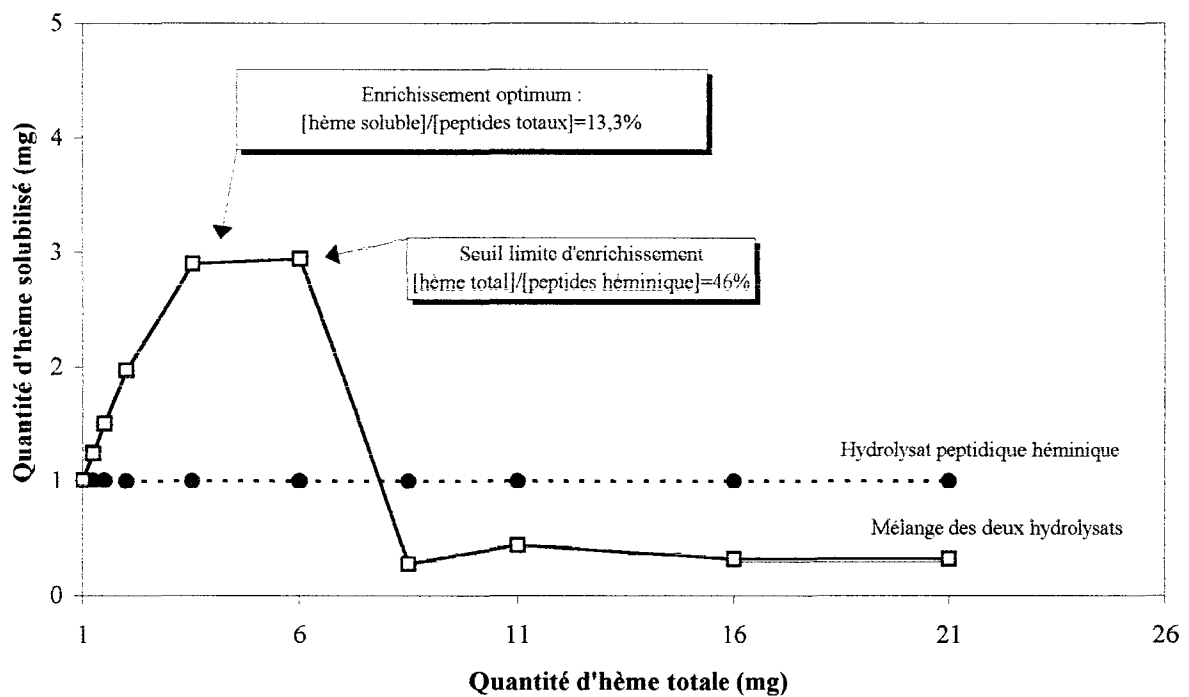
### **2.2 Résultats**

La **Figure 22** montre l'évolution du rapport [hème solubilisé]/[peptides] en fonction de la quantité d'hème extrinsèque apporté au cours des essais de surenrichissement. Le rapport maximum [hème solubilisé]/[peptides] obtenu dans le surnageant de centrifugation à pH 2 est supérieur à 13% alors que ce rapport était de 6,5% dans notre hydrolysat peptidique héminique de départ : soit un surenrichissement en hème d'un facteur 2.

D'autre part, la **Figure 22** montre qu'un apport trop important d'hème extrinsèque induit une précipitation, non seulement de l'hème extrinsèque, mais également de l'hème et des peptides initialement solubles dans notre hydrolysat d'hémoglobine. Nous avons rencontré un phénomène similaire lors de la réassociation de l'hydrolysat décoloré à de l'hémine pure. Ces résultats semblent montrer qu'il ne soit pas possible d'accroître

abusivement le rapport [hème solubilisé]/[peptides] sans risquer de provoquer une agrégation des molécules d'hème et d'altérer ainsi la solubilité des complexes hème-peptides. Il existerait de ce fait un seuil d'enrichissement en fer héminique des hydrolysats d'hémoglobine solubles. Pour notre hydrolysats, ce seuil semble atteint pour un rapport [hème total]/[peptides] de l'ordre de 50%.

Au vu des résultats obtenus, cette méthode d'enrichissement constitue un moyen économique pour obtenir un hydrolysats peptidique enrichi en hème (près de 4 fois plus que l'hémoglobine native) et soluble à pH acide.



**-Figure 22 - *Courbe de solubilité de l'hème lors des essais d'enrichissement en fer héminique de l'hydrolysats peptidique héminique par de l'hème extrinsèque.***

La quantité de peptides **héminiques** présents en solution reste constante à 15 mg.

## **Conclusion générale**

Ces travaux nous ont permis de mettre au point et de transposer à l'échelle pilote un procédé de préparation d'un hydrolysats d'hémoglobine bovine, enrichi en fer héminique soluble et destiné au traitement des carences en fer. Ce procédé repose sur une hydrolyse ménagée de l'hémoglobine par la pepsine, suivie d'une étape d'ultrafiltration ayant pour but de concentrer l'hydrolysats en hème. Les résultats expérimentaux, concernant l'étude du rôle des interactions moléculaires au cours de l'ultrafiltration, ont démontré que la membrane en polyethersulfone modifié permettait d'ultrafiltrer et de diafiltrer l'hydrolysats d'hémoglobine avec un minimum de colmatage et avec une rétention en hème quasiment absolue. L'hydrolysats enrichi en fer héminique, obtenu par ce procédé, est soluble dans une large gamme de pH (même à pH 2 où l'hème est normalement insoluble). Lorsque l'étape d'ultrafiltration est optimisée, la concentration en fer héminique peut être jusqu'à 2,5 fois plus élevée (0,9%, g/g) que celle de l'hémoglobine de départ.

L'étape d'enrichissement par ultrafiltration nous a permis d'isoler, de façon sélective, une fraction peptidique contenue dans le rétentat et composée de peptides amphiphiles. Cette fraction montre une forte affinité pour l'hème et permet la solubilisation de cette molécule hydrophobe en solution aqueuse. La seconde fraction, éliminée dans le filtrat, est essentiellement composée de petits peptides hydrophiles sans affinité pour l'hème. Ces résultats démontrent également que les taux élevés de rétention en hème, rapportés par plusieurs auteurs lors de l'ultrafiltration d'hydrolysats d'hémoglobine, peuvent s'expliquer par les nombreuses interactions se développant entre les molécules du rétentat plutôt que par des interactions de l'hème et/ou des peptides avec les membranes ou par des phénomènes de colmatage. Les associations hydrophobes forment des agrégats d'hème ou de peptides de poids moléculaires importants incapables de traverser la membrane. Nous avons également montré, qu'indépendamment de l'hème, les interactions peptides-peptides jouaient un rôle important dans les phénomènes de rétention.

Il est très difficile d'appréhender les mécanismes d'interaction hème-peptide dans les milieux complexes que sont les hydrolysats d'hémoglobine. Nous avons donc choisi d'isoler un peptide représentatif des peptides du rétentat et de nous en servir comme modèle pour étudier les phénomènes de solubilisation de l'hème par les peptides. Nous avons montré que l'hème était essentiellement solubilisé grâce à des interactions hydrophobes contractées avec le peptide. Dans les conditions expérimentales de cette étude, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'interaction électrostatique ou de type ligand. La stœchiométrie de l'association hème-peptide semble dépendre du pH. A pH acide où l'hème est totalement insoluble, un dimère d'hème est solubilisé par deux molécules de peptide (stœchiométrie 1:1, M/M) ; alors

qu'à pH légèrement basique, l'association se fait selon une stœchiométrie 2 : 1 (M/M) entre un dimère d'hème et une molécule de peptide. Ces résultats ont été obtenus dans des milieux réactionnels faiblement concentrés en hème et en peptide ; aussi ne pouvons nous pas exclure que dans l'hydrolysate enrichi en hème, l'hème soit sous forme de dimère mais aussi d'agrégat de plus haut poids moléculaire.

L'étude de la biodisponibilité du fer héminique chez le rat anémié (Boudey-Mouly, 1997) a montré que le fer de l'hydrolysate d'hémoglobine enrichi en fer héminique n'était pas mieux assimilé que le sulfate de fer. Cette étude confirme *in vivo* que la présence d'interactions importantes entre les différents constituants de notre hydrolysate est préjudiciable à l'assimilation du fer héminique par l'organisme ; cela, en dépit de la bonne solubilité de l'hème et du bon rapport [hème]/[peptides] obtenu dans l'hydrolysate enrichi

Finalement, nous avons pu démontrer que le fer héminique montrait, *in vitro*, une faible réactivité vis à vis des radicaux oxygénés. Il serait intéressant de pouvoir extrapoler ces résultats en étudiant l'innocuité de l'hydrolysate peptidique enrichi en hème sur le tube digestif (évaluation des effets indésirables, étude histologique...).

L'hydrolysate d'hémoglobine, enrichi en fer héminique soluble et générant peu d'espèces activées de l'oxygène, pourrait constituer une alternative intéressante dans le traitement et la prévention des carences en fer. Néanmoins, certaines études complémentaires sont nécessaires pour optimiser la biodisponibilité du fer héminique et envisager l'application industrielle de cet hydrolysate peptidique. Des études sont en cours dans notre laboratoire pour essayer de prévenir l'agrégation de l'hème au cours de la transformation de l'hémoglobine, en chélatant le fer héminique avant hydrolyse enzymatique. Il serait également intéressant d'étudier l'influence de la composition en acides aminés et de la forme galénique (forme solide ou liquide) sur la biodisponibilité du fer de l'hydrolysate peptidique héminique.

*Références Bibliographiques*

- Abish S. & Whitehead M.V. (1994). Les anémies chez le prématuré, le nouveau-né et les enfants. In les anémies : notions fondamentales, Masson, Montréal, 194-226.
- Adler-Nissen J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysate by trinitro benzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.* 27, 6, 1256.
- Akoyunoglou J.H., Olcott H.S. & Brown W.D. (1963). Ferrihemochrome and ferrohemochrome formation with aminoacids, aminoacid-esters, pyridine, derivatives and related compounds. *Biochemistry*, 2, 1033.
- Alberts B., Bray D., Lewis J. Raff M., Roberts K. & Watson J.D. (1990). *Biologie moléculaire de la cellule*. Médecine-Sciences, Flammarion Ed.
- Allen L.H. (1993). Iron-deficiency anemia increases risk of preterm delivery. *Nutr. Rev.*, 51, 2, 49.
- Anderson G.J., Powell L.W. & Halliday J.W. (1990). Transferrin receptor distribution and regulation in the rat small intestine. *Gastroenterology*, 98, 576.
- Arakawa T. & Narhi L.O. (1991). Solvent modulation in hydrophobic interaction chromatography. *Biotechnol. & Appl. Biochem.*, 13, 151.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), (1975). Biological evaluation of protein quality. In *Official Methods of Analysis of the Association of official Analytical Chemists*, ed. W. Horwitz, 12th, Washington DC, p. 857.
- Audigie C.I., Figarella J. & Zonszain F. (1978). Méthode de Mohr, In *Manipulation d'analyse biochimique*, Ed Doin, Paris, 621.
- Autio, K. ; Kiesvaara, M. ; Mulki, Y (1983). A method for dividing blood hemoglobin into heme and globin. International Patent n°83 03 198.
- Barkve H. & Djupesland V. (1968). Oezona and iron deficiency. *Brit. Med. J.*, 2, 336.
- Barneje D., Flanagan P.R., Cluett J. & Valberg L.S. (1986). Transferrin receptor in the, human gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 91, 861.

Baynes R.D., Bothwell T.H., Bezwoda W.R., MacPhail A.P. & Derman D.P. (1987). Relationship between absorption of inorganic and food iron in field studies. *Ann. Nutr; Metab.*, 31, 109.

Bedar Y.C., Pinkerton P.H. & Simon G.T. (1971). Radioautographic observations on iron absorption by the normal mouse duodenum. *Blood*, 38, 232.

Bedar Y.C., Pinkerton P.H. & Simon (1973). Radioautographic observations on iron absorption by the duodenum of mice with iron overload, iron deficiency and X-linked anemia. *Blood*, 42, 131.

Bernard J., Levy J.P., Varet B., Clauvel J.P., Rain J.D. & Sultan Y. (1996). *Hématologie*, Masson, Paris.

Bidlingmeyer B.A., Cohen S.A. & Tarvin T.L. (1984). *J. Chromatogr.*, 336, 93.

Berger J., Scheinder D., Dyck J.L., Joseph A., Aplogan A., Galan P. & Herberg S. (1992). Iron deficiency, cell-mediated immunity and infection among 6-36 month old children living in rural Togo. *Nutr. Res.*, 12, 39.

Bjorn-Rasmussen E. & Hallberg L. (1974). Iron absorption from maize. Effect of ascorbic acid iron absorption from maize supplemented with ferrous sulfate; *Nutr. Metab.*, 16, 94.

Bjorn-Rasmussen E. & Hallberg L. (1979). Effect of animal proteins on the absorption of food iron in man. *Nutr. Med.*, 23, 192.

Bothwell T.H. (1966). The diagnosis of iron deficiency. *N.Z. Med. J.*, 65, 880.

Bothwell T.H. (1995). Overview and mechanisms of iron regulation. *Nutr. Rev.*, 53, 9, 237-245.

Boudey-Mouly M. (1997). Correction de la carence martiale d'origine ferriprive par un hydrolysate de peptides héminiques - Etude chez le rat. Thèse de l'Université de Caen.



Breton-Gorius J., Reyes F., Rochant H., Rosa J. & Vernant J.P. (1992). L'hématologie de Bernard Dreyfus. Médecine-Sciences, Flammarion ed., Paris.

Brimblecombe R.W., Duncan W.A.M., Durant G.J., Ganelin C.R., Parsons M.E. & Black J.W. (1975). The pharmacology of cimetidine, a new histamine H<sub>2</sub>-receptor antagonist. Br. J. Pharm., 53, 435.

Brise H. & Hallberg L. (1962); Effect of succinic acid on iron absorption; Acta Med. Scand., 376, suppl. 59.

Brune M., Magnusson B., Persson H. & Hallberg I. (1986). Iron losses in sweat. Amer. J. Clin. Nutr., 43, 438.

Brune M., Rosander L. & Hallberg L. (1989); Iron absorption and phenolic compounds : the importance of different phenolic structures. Eur. J. Clin. Nutr., 43, 547.

Buchowski M.S., Mahoney A.W. & Kalpalathika M.P.V. (1989). Nonheme iron absorption, apparent iron absorption and hemoglobin regeneration efficiency in anemic and normal rats fed with dietary heme and nonheme iron at various levels. Nutr. Res., 9, 773.

Callender S.T., Mallett B.J. & Smith M.D. (1957). Absorption of haemoglobin iron. Brit. J. Haemat., 3, 186.

Caramazza I., Andrioli G., Scagnol I. & Soldato P. (1990). Comparison of anti-anaemic effects of iron protein succinylate (ITF 282) and ferrous sulfate in the rat. Drugs Exptl. Clin. Res., XVI, 7, 333.

Carpenter C.E. & Mahoney A.W. (1989). Proteolytic digestion of meat is not necessary for iron solubilisation. J. Nutr., 119, 1418.

Carpenter C.E. & Mahoney A.W. (1992). Contribution of heme and non heme iron to human nutrition. Crit. Rev. in Food Sci. & Nutr., 31(4), 333.

Carpenter C.E. & Madhavi Ummadi M.S. (1995). Iron status alters the adsorption, uptake, and absorption capacities of rat duodenum for ferrous and ferric iron. Nutr. Res., 15(8), 1129.

Champagne E.T. (1988). Effects of pH on mineral-phytate, protein-mineral-phytate and mineral-fiber interactions. Possible consequences of atrophic gastritis on mineral bioavailability. *J. Am. Coll. Nutr.*, 6, 499.

Chow M., et Mandler R. (1984). Two new laboratory systems for rapid desalting of biological solutions. *World Biotech. Rep.*, 2, 247.

Clydesdale F.M. (1983). Physicochemical determinants of iron bioavailability. *Food Technol.*, october, 133.

Committee of iron deficiency. A.M.A. Council of food and nutrition. Iron deficiency in the united states. *J.A.M.A.*, 203, 497.

Conrad M.E., Weintraub L.R., Sears D.A. & Crosby W.H. (1966-1). Absorption of haemoglobin iron. *Am. J. Physiol.*, 211, 123.

Conrad M.E., Cortell S., Williams H.F. & Foy A.L. (1966-2). Polymerization and intraluminal factors in the absorption of hemoglobin iron. *J. Lab. Clin. Invest.*, 68, 659.

Conrad M.E., Benjamin B.I., Williams H.L. & Foy A.L. (1967). Human absorption of hemoglobin iron. *Gastroenterology*, 53, 5.

Conrad M.E. & Schade S.G. (1968). Ascorbic acid chelate in iron absorption. A role for HCl and bile. *Gastroenterology*, 55, 35.

Conrad M.E. (1970). Factors affecting iron absorption. In : Hallberg L. -Iron deficiency, pathogenesis, clinical aspects, therapy, p 87, London & New-york academic press.

Conrad M.E. (1987). Iron absorption, in *Physiology of the gastrointestinal tract*, 2nd ed., Jhonson L.R., Ed. Raven Press, New York, 1437.

Conrad M.E., Umbert J.N. & Moore E.G. (1991). A role for mucine in the absorption of inorganic iron and other metals. *Gastroenterology*, 55, 35.

Conrad M.E., Umbreit J.N. & Moore E.G. (1993). Regulation of iron absorption : proteins involved in duodenal uptake and transport. *J. Am. Coll. Nutr.*, 12, 6, 720-728.

Cook J.D., Layrisse M. & Finch C.A. (1969). The measurement of iron absorption. *Blood*, 33, 421.

Cook J.D., Lipschitz D.A., Miles L.E. & Finch C.A. (1974). Serum ferritin as a measure of iron stores in normal human subject. *Am. J. Clin. Nutr.*, 27, 681.

Cook J.D. & Monsen E.R. (1976). Food iron absorption. III. Comparison of the effect of animal proteins on nonheme iron absorption; *Am. J. Clin. Nutri.*, 30, 235.

Cook J.D., Dassenko S. & Skikne B.S. (1990). Serum transferrin receptor as an index of iron absorption. *Brit. J. Haematol.*, 75, 603.

Cook J.D. (1990). Adaptation in iron metabolism. *Am. J. Nutr.*, 51, 301.

Craven C.M., Alexander J., Elridge M., Kushner J.P., Bernstein S. & Kaplan J. (1987). Tissue distribution and clearance kinetics of non-transferrin-bound-iron in the hypotransferrinemic mouse : a rodent model for hematochromatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84, 3457.

Dallman P.R. & Schwartz H.C. (1965). Distribution of cytochrome C and myoglobin in rats with dietary iron deficiency. *Pediatrics*, 35, 677.

Dawson R.B., Rafal S. & Weintraub L.R. (1970). absorption of hemoglobin iron ; The role of xanthine-oxydase in the intestinal heme-splitting reaction. *Blood*, 35, 94.

De Mayer E. & Adiels-Tegman M. (1985). La prévalence de l'anémie dans le monde. Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales, 38, 302.

Derman D.P., Bothwell T.H., MacPhail A.P., Torrance J.D., Bezwoda W.R., Charlton R.W., Mayet F. (1980). Importance of ascorbic acid in the absorption of iron from infant foods. *Scand. J. Haematol.*, 25, 193.

Di Schiena M.G. (1993). Iron complexes with sulfomucopolysaccharides salts for martial therapy. *Eur. Pat. Appl. EP 563,753*.

- Disler P.P., Lynch S.R., Charlton R.W., Torrance J.D., Bothwell T.H., Walker R.B. & Mayet F. (1975). The effect of tea on iron absorption. *Gut*, 16, 193.
- Dhur A., Galan P. & Hercberg S. (1989). Effects of doses and duration of iron supplement on iron deficiency in rats. *Ann. Nutr. Metab.*, 7, 193-200.
- Elwood P.C. & Hughes D. (1970). Clinical trial of iron therapy on psychomotor function in anemic women. *Br. Med. J.*, 3, 254.
- Eklom B., Goldberg A.N. & Gulbring B. (1972). Response to exercise after blood loss and reinfusion. *J. Appl. Physiol.*, 33, 175.
- Ericsson P. (1970). The effect of iron supplementation on the physical work capacity in the elderly. *Acta Med. Scand.*, 188, 361.
- Eriksson, C. (1981). Heme-iron enriched amino acid preparation and a process for the preparation of heme-iron enriched amino acid preparations from hemoproteins. *Eur. Pat. EP 00 61 556*.
- Fairweather-Tait S.J. (1989). Iron in food and its availability. *Acta Paediatr. Scand., Suppl.*, 361, 12.
- Favier A. (1991). Les oligoéléments en nutrition humaine. *In les oligoéléments en médecine et en biologie. SFERETE Tech. & Doc. Lavoisier, EM Inter*, 41-76.
- Felt B.T. & Lozoff B. (1996). Brain iron and behavior of rats are not normalized by treatment of iron deficiency anemia during early development. *J. Nutr.*, 126, 3, 693-701.
- Ferrari G., Pagella P.G. & Bajarda O. (1993). Iron complexes containing conalbumin and their derivatives. *Eur. Pat. EP 537,634*.
- Finch C.A., Miller L.R., Inamdar A.R., Person R., Seiler K. & Mackler B. (1976). Iron deficiency in the rat. Physiological and biochemical studies of muscle dysfunction. *J. Clin. Invest.*, 58, 447.

- Flanagan P.R. (1989). Mechanism and regulation of intestinal uptake and transfer of iron. *Acta Paediatr; Scand.*, Suppl., 361, 21.
- Fox M.R.S. & Tao S.H. (1989). Antinutritive effects of phytate and other phosphorylated derivatives. *Nutr. Toxicol.*, 3, 59
- Freeman S. & Ivy A.C. (1942). The influence of antiacids upon iron retention by the anemic rat. *Am. J. Physiol.*, 137, 706.
- Galan P., Hercberg S. & Touitou Y. (1984). The activity of tissue enzymes in iron deficient rat and man : an overview. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77 B, 647.
- Gardner G.W., Edgerton V.R., Senewiratne B., Barnard R.J. & Ohira Y. (1977). Physical work capacity and metabolic stress in subjects with iron deficiency anemia. *Am. J. Clin. Nutr.*, 30, 910.
- Gerard M. (1998). Thèse de l'Université de Technologie de Compiègne.
- Gillooly M., Bothwell T.H., Torrance J.D., MacPhail A.P., Derman D.P., Bezwoda W.R., Mills W., Charlton R.W. & Mayet F. (1983). The effects of organic acids, phytates and polyphenols on the absorption of iron from vegetables. *Br. J. Nutr.*, 49, 331.
- Glahn R.P., Wien E.M., Van Campen D.R. & Miller D.D. (1995). CaCo-2 cell iron uptake from meat and casein digests parallels in vivo studies : Use of a novel in vitro method for rapid estimation of iron bioavailability. *J. Nutr.*, 126, 332.
- Gobulov J., Flanagan P. & Adams P. (1991). Inhibition of iron absorption by omeprazole in rat model. *Dig. Dis. Sci.*, 36, 405.
- Granick S. (1954). Iron metabolism. *Bul. N.Y. Academ. Med.*, 30, 81.
- Grebe G., Martinez-Torres C., & Layrisse M. (1975). Effect of meal and ascorbic acid on the absorption of a therapeutic dose of iron as ferrous and ferric salts. *Curr. Therap. Res.*, 17, 382.

Greenberger N.J., Balcerzack S.P. & Ackerman G.A. (1969). Iron uptake by isolated intestinal brush borders : Changes induced by alterations in iron stores. *J. Lab. Clin. Med.*, 73, 711.

Hagler L., Askew E.M., Neville J.R., Mellick P.W., Coppes R.I. & Lowder J.F. (1981). Influence of dietary iron deficiency on hemoglobin, myoglobin, their respective reductases and skeletal muscle mitochondrial respiration. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2169.

Hallberg L., Solvell L & Zederfeldt B. (1966). Iron absorption after partial gastrectomy. A comparative study on the absorption from ferrous sulfate and haemoglobin iron. *Acta Med. Scand.*, 179 (suppl.445), 269.

Hallberg L. & Solvell L. (1967). Absorption of hemoglobin iron in man; *Acta med. Scand.*, 181, 335.

Hallberg L. (1981). Bioavailability of dietary iron in man. *Ann. Rev. Nutr.*, 1, 123.

Hallberg L. (1981). Bioavailable nutrient density : a new concept applied in the interpretation of food iron absorption data. *Am. J. Clin. Nutr.*, 34, 2242.

Hallberg L. (1987); Wheat fiber, phytates and iron absorption. *Scand. J. Gastroenterol.*, 22, 68.

Hallberg L., Brune M. & Rossander L. (1990). Iron absorption. In *Aspects actuels des carences en fer eten folates dans le monde. Recent Knowledge on iron and folate deficiencies in the world.* INSERM, 235-245.

Hallberg L., Rossander-Hulten L., Brune M. & Gleerup A. (1992). Inhibition of haem-iron absorption in man by calcium. *Brit. J. Nutr.*, 69, 533-540.

Hallberg L. & Rossander-Hulten L. (1993). Factors influencing the bioavailability of dietary iron in man. In *Bioavailability' 1993. Nutritional, chemical and food processing implications of nutrient availability*, Ettlingen, May 9-12, BFE 2, 23-32.

Halliday J.W., Powell L.W. & Marck V. (1976). Iron absorption in the rat; the search for possible intestinal mucosal carriers. *Br. J. Haematol.*, 34, 237.

Hames B.D. (1990). In *Gel electrophoresis of proteins-A practical approach*, ed B.D. Hames & D. Rickwood, 2nd, IRL Press, pp 106-107.

Harland B.F. (1989). Dietary fiber and mineral bioavailability. *Nutr.Res. Rev.*, 2, 133.

Harris E.D. (1995). Rôle of ligands in the translocation of metals ion in biofluids. *In* Handbook of metal ligand interactions in biological fluids, New York Bassel, Hong Kong, 71-85.

Hazel T., Leward D.A. & Neale R.J. (1978). Iron biavailability from meat. *Br. J. Nutr.*, 39, 631.

Hazel T., Leward D.A., Neale R.J. & Root I.C. (1981). The rule of proteins in meat haemoprotein digestion; *Meat Sc.*, 5, 397.

Heilmeyer K. & Plötner K. (1937). Das serumeisen und die eisenmangelkrankheit. Fisher G. (ed). Iena.

Heilmeyer L., Keller W., Vivell O., Keiderling W., Betke K., Wohler F & Schultze H.E. (1961). Kongenitale atransferranemie bei einem sieben jahre alten kind. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 86, 1475.

Heinrich H.C. (1968). Iron deficiency without anemia. *Lancet*, 2, 460.

Hercberg S. (1988). La carence en fer en nutrition humaine. Ed.Médicales internationales, Paris.

Hercberg S., Preziosi P. & Galan P. (1991). Le fer, *in* Les oligoéléments en médecine et en biologie. Tech & Doc Lavoisier, E. M. inter, 233-246.

Higgins A.C., Pencharz P.B., Strawbridge P.E., Maughan G.B. & Moxley J.E. (1982). Maternal hemoglobin changes and their relationship to infant birth weight in mother receiving a program of nutritional assessment and rehabilitation. *Nutr. Res.*, 2, 641.

Huebers H., Huebers E., Cisba E., Forth W. & Rummel W. (1971). Binding of iron to a non ferritin protein in the mucosal cells of normal and iron deficient rats during absorption. *Life Sci.*, 10, 1147.

Huebers H., Huebers E., Cisba E., Rummel W. & Fynch C.A. (1983). The significance of transferrine on intestinal iron absorption. *Blood*, 61, 283.

Hunt J.R., Zito C.A., Erjavec J. & Johnson L.K. (1994). Severe or marginal iron deficiency affects spontaneous physical activity in rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, 59, 413.

Iacopetta B.J. & Morgan E.H. (1983). The kinetic of transferrin endocytosis and iron uptake from transferrine in rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.*, 258, 9108.

Johnson G., Jacobs P. & Purves L.R. (1983). Iron binding proteins of iron-absorbing rat intestinal mucosa. *J. Clin. Invest.*, 71, 1467.

Kalpalathika M.P.V., Mahoney A.W., Whitaker P. & Hendrycx D.G. (1991). Incorporation of absorbed iron from different dietary sources into hemoglobin. *Nutr. Res.*, 11, 185.

Kamino H. & Ebihara K. (1996). Comparison of ferrous and ferric iron bioavailability following rat cecal infusion. *In Metals ions in Biology and Medicine*, John Libbey Eurotext, Paris, 342-345.

Kane A.P. & Miller D.D. (1984). In vitro estimation of selected proteins on iron bioavailabiity. *Am. J. Clin. Nutr.*, 39, 393.

Kapsokefalou M. & Miller D.D. (1993). Lean beef and beef fat interact to enhance nonheme iron absorption in rats. *J. Nutr.*, 123, 1429-1434.

Keilin J. (1960). Nature of the haem-binding groups in nature and denatured haemoglobin and myoglobin. *Nature*, 187, 365.

Kim M. & Atallah M.T. (1992). Structure of dietary pectin, ironbioavailability and hemoglobin repletion in anemic rats. *Am. Inst. Nutr.*, 2298.



Kim Y., Carpenter C.E. & Mahoney A.W. (1991). Iron solubilizing capacity of meat and bioavailability of bee-iron complex. *FASEB J.*, 5, A 589.

Kim Y., Carpenter C.E. & Mahoney A.W. (1993). Gastric acid production, iron status and dietary phytate alter enhancement by meat of iron absorption in rat. *J. Nutr.*, 123, 940.

Kim M., Lee D.T. & Lee Y.S. (1995). Iron absorption and intestinal solubility in rats are influenced by dietary proteins. *Nutr. Res.*, 15, 1705.

Kimber C.L., Mukherjee T. & Deller D.J. (1973). In vitro iron attachment to the intestinal brush border : effect of iron stores and other environmental factors. *Am. J. Dig. Sci.*, 18, 781.

Klausner R.D., Ashwell G., Van Ranswoude J., Harford J.B. & Bridges K.R. (1983). Binding of transferrin to K 562 cells, explanation of the transferrin-cycle. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 80, 2263.

Layrisse M., Martinez-Torres C. & Roche M. (1968). The effect of interaction of various foods on iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.*, 21, 1175.

Layrisse M., Cook J.D., Martinez-Torres C., Roche M., Kuhlmann I.M., Walker R.B. & Finch C.A. (1969). Food iron absorption. A comparison of vegetable and animal foods; *Blood*, 33, 430.

Layrisse M., Martinez-torres C., Leets I., Taylor P. & Ramirez J. (1984). Effect of histidine, cysteine, glutathione or beef on iron absorption in humans. *J. Nutr.*, 114, 217.

Le Cœur C. (1996). Contribution à l'étude d'un hydrolysate peptidique de myoglobine de muscle squelettique rouge de thon *Thunnus Albacares*. Thèse de L'Université de La Rochelle

Leconte D. (1989). Contribution à l'étude de la valorisation du cruor des abattoirs : Application de l'ultrafiltration à la préparation d'hydrolysats peptidiques à partir de l'hémoglobine bovine. Thèse de l'Université de Technologie de Compiègne (France).

Lederer J. (1940). La physiopathologie du fer. Warny (ed), Louvain.

Lederer J. (1988). Le fer aux confins de la vie. Nauwelaerts (ed), Bruxelles.

Lee G.R. (1993). Iron deficiency and iron-deficiency anemia. In *Wintrobe's Clinical haematologie*, Lea & Febiger, Philadelphia, London, 808-838.

Leibel R., Greefield D. & Pollitt E. (1979). Iron deficiency : Iron deficiency : behavior and brain biochemistry. In *Nutrition, pre and postnatal development*. Ed. Winick M., 1, 383. New-York

Leibel R., Pollitt E., Kim I. & Viteri F. (1982). Studies regarding the impact of micronutrient status on behavior in man : iron deficiency as a model. *Am. J. Clin. Nutr.*, 35 (suppl.), 1211.

Léonil J., Mollé D., Bouhallab S. & Henry G. (1994). Precipitation of hydrophobic peptides from tryptic casein hydrolysate by salt and pH. *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 591.

Levine J.S. & Seligman P.A. (1984). The ultrastructural immunocytochemical localization of transferrin of transferrin receptor (TFR) and transferrin (TF) in the gastrointestinal tract of man. *Gastroenterology*, 86, 1161.

Linder M.C., Dunn V., Isaacs E., Jones D., Lim S., Vanvolkom M. & Munro H.N. (1975). Ferritin and intestinal iron absorption. *Am. J. Physiol.*, 228, 196.

Lindross, P. (1981). Heme concentrate and method for the preparation there of. *International patent*, n° 81 02 834.

Longpré B. *Les anémies : notions fondamentales* (1994). Masson ed., Montreal.

Luijterink, J.H. (1983). Process for the manufacture of globin or blood cell protein and heme from hemoglobin. *Eur. Pat. EP 0068537*.

Lynch S.R. & Cook J.D. (1980). Interaction of vitamin C and iron. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 355, 32.

Mac Arthur K.E., Walsh J.H. & Richardson C.T. (1988). Soy protein meals stimulate less gastric acid secretion and gastrin release than beef meals. *Gastroenterology*, 95, 920.

Magnusson B., Bjorn-Rasmussen E., Hallberg L. & Rossander L. (1981). Iron absorption in relation to iron status. Model proposed to express results of iron absorption measurements. *Scand. J. Haematol.*, 27, 201.

Martinez-Torres C. & Layrisse M. (1973). Nutritional factors in iron deficiency : Food iron absorption. *In Callenders.-Clinics in haematology*, Vol 2, 339. W.B. Saunders & Co Ed., London.

Martinez-Torres C. Romano E. & Mayrisse M. (1981). Effect of cysteine on iron absorption in man. *Am. J. Clin. Nutr.*, 34, 322-327.

Melander W. & Horvath C. (1977). *Arch. Biochem. Biophys.*, 183, 200.

Miller D.D. & Berner L.A. (1989), Is solubility in vitro a reliable predictor of iron bioavailability? *Biol. Trace Element Res.*, 19, 11.

Minnich V., Ockuoglua A., Tarcon Y., Arcasoy A., Clin S., Yörükoglu O., Renda F. & Demirag B. (1968). Pica in Turkey-II-Effect of clay on iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.*, 21, 78.

Mira M., Alperstein G., Karr M., Ranmuthugala G., Causer J., Niec A. & Liburne A.M. (1996). Haem-iron intake in 12-36 month old children depleted in iron : Case-control study. *B.M.J.*, 6, 881-883.

Mitsubishi Chem. Ind. (1984). Preparation of chocolate used in treating anemia-comprises adding haem iron obtained by removing globin protein from haemoglobin to chocolate. *Jap. Pat. JP 59,140,834*.

Mitsubishi Chem. Ind. (1987). Pill composition containing haem or haemoglobin with coating of shellac, used as dietary supplement for supplying iron. *Jap. Pat. JP 62,036,320*.

Monsen E.R., Hallberg L., Layrisse M., Hegsted D.M., Cook J.D., Mertz W. & Finch C.A. (1978). Estimation of available dietary iron. *Am. J; Clin. Nutr.*, 31, 134.

Morgan E.H. (1981). Inhibition of reticulocytes iron uptake by  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and  $\text{CH}_3\text{NH}_2$ . *Biochem. Biophys. Acta*, 642, 119.

Morris E.R. & Green F.E. (1972). Utilisation of the iron of egg yolk for Hb formation by the growing rat. *J. Nutr.*, 102, 901.

Murray M.J. & Stain N. (1967). The integrity of the stomach as a requirement for maximal iron absorption. *J. Lab. Clin. Med.*, 60, 673.

Najean Y., Acuto G. & Scotti A. (1995). Multicentre double-blind clinical trial of iron protein succinylate in comparison with iron sulfate in the treatment of iron deficiency anaemia. *Clin. Drug Invest.*, 10, 4, 198.

Nakanishi N. & Kitada Y. (1993). Metal-peptin hydrolyzate complexes with good bioavailability and their manufacture. *Jap. Pat. JP 05,238,940*.

National Research council (1989). Recommended daily allowances, 10th National Academic Press, Washington D.C.

Navarro J., Faure C. & Frelut M.L. (1993). Les conséquences non hématologique de la carence martiale. *Cah. Nutr. Diet.*, XXVIII, 4, 209-212.

Neuvonen P.J., Gothoni G., Hackman R. & Björkstén K. (1970). Interference of iron with the absorption of tetracyclines in man. *Brit. Med. J.*, 4, 532.

Ohira Y., Edgerton V.R., Gardner G.W., Senewiratne B., Barnard R.J. & Simpson D.R. (1976). Work capacity, heart rate and blood lactate responses to iron treatment. *Br. J. Haemat.*, 23, 1.

Olivares M., Hertrampf E. & Pizzaro F. (1993). Effect of iron stores on heme iron absorption. *Nutr. Res.*, 13, 633.

Oski F.A., Honig A.S., Helu B.M. & Hoanitz P. (1983). Effect of iron therapy on behavior and performance of non-anemic iron deficient infants. *Pediatrics*, 71, 877.

Pallarès I., Lisbona F., Lopez-Alliaga I. & Barrionuevo M. (1993). Effect of iron deficiency on the digestive utilization of iron, phosphorus, calcium and magnesium in rats. *Br. J. Nutr.*, 70, 609-620.

Parmley R.T., Barton J.C. & Conrad M.E. (1985). Ultrastructural localisation of transferrine receptor and iron binding sites on human placental and duodenal microvilli. *Br. J. Haematol.*, 60, 81.

Paul K.G., Theorell H. & Akeson A. (1953). The molar light absorption of pyridine ferroprotoporphyrin (pyridine haemochromogen). *Acta Chem. Scand.*, 7, 1284.

Peters T., Apt L. & Ross J.F. (1971). Effect of phosphates upon iron absorption studied in normal human subjects and experimental model using dialysis. *Gastroenterology*, 61, 315.

Pollack S. & Lasky F.D. (1976). A new binding protein from intestinal mucosa. *J. Lab. Clin. Med.*, 87, 670.

Pollitt E & Leibel R.L. (1982). *Iron deficiency : brain biochemistry and behavior*, New-york, Raven Press ed.

Pollitt E. (1993). Iron deficiency and cognitive function. *Annu. Rev. Nutr.*, 13, 521.

Pollitz M.L. & Clydesdale F.M. (1988). Effect of enzymatic digestion, pH and molecular weight on the iron solubilizing properties of chicken muscle. *J. Food Sci.*, 53, 1081.

Raffin S.B., Choong H.W., Roost K.T., Price D.C. & Schmidt R. (1974). Intestinal absorption of hemoglobin iron. Heme cleavage by mucosal heme-oxygenase. *J. Clin. Invest.*, 54, 1344.

Reddy M.B. & Cook J.D. (1991). Assessment of dietary determinants of non heme-iron absorption in humans and rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54, 723-728.

Refsum S.B. & Schreiner B.B. (1980). Iron excretion from the goblet cells of the small intestine in man. Additional regulatory mechanism in iron homeostasis. *Scand. J. Gastroenterol.*, 15, 1013.

Refsum S.B. & Schreiner B.B. (1984). Regulation of iron balance by absorption and excretion. A critical review and a new hypothesis. *Scan. J. Gastroenterol.*, 19, 867.

- Reinzenstein P. (1980). Hemoglobin fortification of food and prevention of iron deficiency with heme iron. *Acta Med Scand.*, Suppl. 629, 7.
- Raja K.B., Bjarhason I., Simpson R.J. & Peters T.J. (1987). In vitro measurement and adaptative response of Fe<sup>3+</sup> uptake by mouse small intestine. *Cell. Biochem. Funct.*, 5, 69.
- Raja K.B., Simpson R.J. & Peters T.J. (1987). Comparison of <sup>59</sup>Fe<sup>3+</sup> uptake in vitro and in vivo by mouse duodenum; *Biochem. Biophys. Acta*, 901, 52.
- Salmon H.A. (1962). The cytochrome C content of the heart, kidney, liver and skeletal muscle of iron deficiency rats. *J. Physiol.*, 164, 17.
- Sannier F. (1992). Contribution à la mise en oeuvre des proteases dans des systèmes ouverts : hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine. Thèse de l'Université de Technologie de Compiègne (France).
- Sato R., Lee Y.S., Noguchi T. & Naito H. (1984). Iron solubility in the small intestine of rats fed egg yolk protein. *Nutr. Rep. Int.*, 30, 1319.
- Sayers M.H., Lynch S.R., Charlton R.W., Bothwell T.H., Walker R.B. & Mayet F. (1974). Iron absorption from rice meals cooked with fortified salt containing iron sulfate and ascorbic acid. *Br. J. Nutr.*, 31, 367.
- Sayers M.H., Lynch S.R., Jacobs P., Charlton R.W., Bothwell T.H., Walker R.B. & Mayet F. (1973). The effects of ascorbic acid supplementation on the absorption of iron in maize wheat and soja. *Br. J. Haematol.*, 24, 209.
- Scholl T.O., Hediger M.L., Fischer R.L. & Shearer J.W. (1992). Anemia vs iron deficiency : increased risk of preterm delivery in a prospective study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 55, 985.
- Scholl T.O. & Hediger M.L. (1994); Anemia and iron-deficiency anemia : compilation of data on pregnancy outcome. *Am. J. Clin. Nutr.*, 59 (suppl.), 492S.
- Sharpe L.M., Peacock W.C., Cooke R. & Harris R.S. (1950). The effects of phytate and other food factors on iron absorption. *J. Nutr.*, 41, 433.

Siengenber D., Baynes R.D., Bothwell T.H., Macfarlane B.J., Lamparelli R.D., Car N.G., Macphail P., Schmidt U., Tal A. & Mayet F. (1991). Ascorbic acids prevents the dose-dependant inhibitory effect of polyphenols and phytates on non-heme-iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 537.

Silbernag S. & Despopoulos A. (1993). *Atlas de poche de physiologie, Médecine-Sciences*, Flammarion ed., Paris.

Skikne B.S., Lynch S.R. & Cook J.D. (1981). Rule of gastric acid in food iron absorption. *Gastroenterology*, 81, 1068.

Skikne B. & Baynes R.D. (1994). Iron absorption. *In iron metabolism in health and disease*, W.B. Saunders Company Ltd, 151-187.

Sölvell L. (1970). Oral iron therapy-side effects. *In : Iron deficiency*. Hallberg L., Harwerth H.G. & Vannotti A. (ed), Academic Press, London, p 573.

Sportoletti G., Pagella G.P. & Cremonesi P. (1983). Dérivés de fer biodisponible non dommageables au système gastrique, leur procédé de préparation et leur application thérapeutique. *Fr. Pat. FR 2,522,664*.

Sydenham T. (1850). *The works of Thomas Sydenham translated from the latin by doctor Greenhill*. London.

Tanaka M., Tojima T., Dousako S. & Tatsumi K. (1990). Sterilizable iron-fortified lactoferrin-containing beverages. *Eur. Pat. EP 454,084*.

Taylor I.L., Byrne W.J., Ament M.E. & Walsh J.H. (1982). Effect of individual L-amino acids on gastric acid secretion and serum gastrin and pancreatic polypeptide release in humans. *Gastroenterology*, 83, 272.

Thannoun A.M., Mahoney A.W. & Hendrycks D.G. (1987). Hemoglobin regeneration and iron absorption from meat loaf diets fed to anemic and healthy rats. *Nutr. Rep. Int.*, 36, 273.

Thannoun A.M., Mahoney A.W., Buchowski M.S. & Hendrycks D.G. (1988). Heme and non heme iron absorption from meat and meat loaf by anemic and healthy rats. *Nutr. Rep. Int.*, 37, 487.

Torre M., Rodriguez A.R. & Saura-Calixto F. (1991); Effect of dietary fiber and phytic acid on mineral bioavailability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1, 1.

Tovey F.I. & Clark C.G. (1980). Anemia after partial gastrectomy : a neglected curable condition. *Lancet*, 1, 956.

Tuntawiroon M., Sritongkul N., Brune M., Rossander L. Pleetachinda R., Suwanik R & Hallberg L. (1991). Dose-dependent inhibitory effect of phenolic compounds in food on non-heme iron absorption in men. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 554.

Turnbull A., Cleton F. & Finch C.A. (1962). Iron absorption. IV : The absorption of hemoglobin iron. *J. Clin. Invest.*, 41, 1897.

Uchida T. (1995). Overview of iron metabolism. *Int. J. Hem.*, 62, 193-202.

Verloop M.C. (1970). Iron depletion without anemia. *Blood*, 36, 657.

Viteri F.E. & Torun B. (1974). Anemia and physical work capacity. *Clin. Haematol.*, 3, 609.

Vyas D. & Chandra R.K. (1984). Functional implication of iron deficiency. In Steckel A. (ed) iron nutrition in infancy and childhood. New-York raven press.p 45

Wada H.G., Hass P.E. & Sussman H.H. (1979). Transferrin receptor in human placental brush bordure membranes. *J. Biol. Chem.*, 254, 12629

Wajcman H. (1994). Hémoglobine : Structure, fonction et génétique. In *Hématologie, précis des maladies du sang*, Najman A., Verdi E., Potron G., Isnard-Grivaux F., Ellipses, Paris, 97-113.

Walter T., Kovalskys J. & Steel A. (1983). Effect of mild iron deficiency on infant mental development scores. *J. Pediatr.*, 102, 293.



Walter T., Hertrampf E., Pizzaro F., Olivares M., Llaguno S., Letelier A, Vega V. & Stekel A. (1993). Effect of bovine-hemoglobin-fortified cookies on iron status of schoolchildren : a nationwide program in Chile. *Am. J. Clin. Nutr.*, 57, 190.

Weinberg E.D. (1989). Cellular regulation of iron assimilation. *Q. Rev. Biol.*, 2,29

Weintraub L.R., Weinstein M.B., Huser H.J. & Rafal S. (1968). Absorption of hemoglobin iron : The rule of a heme splitting substance in the intestinal mucosa. *J. Clin. Invest.*, 47, 531.

Wheby M.S., Suttle G.E. & Ford K.T. (1970). Intestinal absorption of hemoglobin iron. *Gastroenterology*, 58, 647.

Whitby L.E. & Britton C.J. (1963). Disorders of the blood. Churchill J. & A. (ed). London, p 231.

White W.I. (1973). Ph D. Thesis, Cornell University, Ithaca, New-York.

White W.I. (1978). Aggregation of porphyrins and metalloporphyrins. In Dolphin D.-The porphyrins, Vol. 7, p 303. Academic Press, London.

Worwood M. & Jacobs A. (1971). The subcellular distribution of orally administered <sup>59</sup>Fe in rat small intestinal mucosa. *Brit. J. Haematol.*, 20, 587

Worwood M. & Jacobs A. (1972). The subcellular distribution of orally administered <sup>59</sup>Fe in rat small intestinal mucosa : studies with normal, iron deficient and iron overload rats. *Brit. J. Haematol.* 22, 265

Wranne B. & Woodson R.D. (1973). A graded treat mill for rats : maximal work performance in normal and anemic animals. *J. Appl. Physiol.*, 34, 732.

Yip R. & Mehra M. (1995). Individual functionnal roles of metal ions in vivo. Iron. In *Handbook of metal-ligand interactions in biological fluids*. New York, Bassel, Hong Kong, 207-218.

Yoshimo Y. & Manis J. (1973). Iron binding substance isolated from particulate fraction of rat intestine. *Am. J. Physiol.*, 225, 1276.

Youdim M.B.H. (1988). Brain iron : neurochemical and behavioural aspects, Vol 2. London : Taylor & Francis.

Youdim M.B.H. (1990). Neuropharmacological and neurobiochemical aspects of iron deficiency. In Dobbing J. ed., Brain, behaviour and iron in the infant diet, p 83. London : springer-Verlag.

Youdim M.B.H., Ben-Shachar D. & Yehuda S. (1989). Putative biological mechanisms of the effect of iron deficiency on brain biochemistry and behavior. Am. J. Clin. Nutr., 50 (suppl;), 607.

Young S.P. & Aisen P. (1981). Transferrin receptors & uptake and release of iron by isolated hepatocytes. Hepatology, 1, 114.

Young S.P. (1982). Evidence for the functional equivalence of the iron binding sites of rat transferrin. Biochem. Biophys. Acta, 718, 35.

Young S.P. & Bomford A. (1984). Transferrin and cellular iron exchange. Clin. Science, 67, 273.

Zhang D., Hendrycks D.G., Mahoney A.W. & Yaxim Y. (1988). Effect of tea on iron bioavailability in anemic and healthy rats. Nutr. Rep. Int., 37, 1225.

Zhang D., Hendrycks D.G. & Mahoney A.W. (1989). Bioavailability of total iron from meat, spinach (*Spinacea oleracea* L.) and meat-spinach mixtures by anemic and non anemic rats. Br. J. Nutr., 61, 331.

Zhang D., Carpenter C.E. & Mahoney A.W. (1990). A mechanistic hypothesis for meat enhancement of iron absorption : stimulation of gastric secretions and ironchelation. Nutr. Res., 10, 929.

**Annexe : Publications**

---

**A1 : Preparation at pilot plant scale of a soluble  
enriched heme-iron hydrolysate from bovine hemoglobin**  
(soumis à publication dans Journal of Chemical Technology and Biotechnology)

---

Frédéric LEBRUN, Anne BAZUS, Pascal DHULSTER & Didier GUILLOCHON\*  
Laboratoire de Technologie des Substances Naturelles ; IUT 'A' ; Lille I  
B.P. 179, 59653 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

**ABSTRACT**

The production at pilot-plant-scale of a soluble enriched heme-iron hydrolysate from bovine hemoglobin was developed for iron deficiency therapy. Optimum hydrolysis conditions for soluble heme-iron obtention were achieved with porcine pepsin [EC.3.4.23.1] at pH 4 and 40°C. Heme-iron enrichment was performed by ultrafiltration on an hydrophilic modified polyethersulfone membrane with a molecular cut off of 10 kDa and the resultant retentate was spray-dried. The powder obtained contained 0.89% (w/w) heme-iron, i.e. a heme/peptide ratio 2.7 as high as in hemoglobin. The heme-iron preparation harmlessness, in relation to hydroxyl radical generation usually reported for mineral iron therapy, was demonstrated in vitro.

**Key words :** heme-iron, hemoglobin, hydrolysate, pepsin, ultrafiltration

\*To Whom correspondence should be addressed.

Present adress :

Laboratoire de Technologie des Substances Naturelles,  
IUT "A" Lille I, B.P. 179, 59653 Villeneuve d'Ascq Cedex. France

FAX : (33) 3 20 43 44 72

e-mail : LTSN@univ-lille1.fr

## INTRODUCTION

Iron deficiency is considered as a main nutritional disease with more than millions of people classified iron deficient<sup>1</sup>. If etiology of iron diseases have been established for a long time (malnutrition, repeating blood losses, parasitosis...), repletion and prevention based on mineral iron therapy remain unsatisfactory because of the inhibition of ferrous salt absorption by many nutrients which decrease iron availability : polyphenols<sup>2</sup>, phytates<sup>3,4</sup>, fibers<sup>5</sup> ... Moreover, mineral iron has been reported to cause serious gastrointestinal injuries (mucosa perforation, tumor necrosis...) at term by generating activated oxygen species. For these reasons, iron complexed with polysaccharides, protein or organic acids has been developed.

In the sixties, hemoglobin iron was proved to be assimilated better than mineral iron<sup>6,7</sup> and many studies have shown that hemoglobin iron absorption is less dependent upon dietary composition<sup>8,9</sup> and produces less side effects<sup>10</sup>, peptides from gastric or intestinal digestion of globin would enhance heme iron intestinal absorption. However hemoglobin processing for iron therapy must be considered with care, because the complex state of heme in solution could influence iron bioavailability. Heme extraction<sup>11,12</sup> could be the most convenient way to bring heme-iron, but at duodenal pH, heme forms polymers of large molecular sizes that decrease considerably iron availability<sup>13</sup>. Whole hemoglobin have successfully been used in childhood iron deficiency<sup>14</sup>. However, the low proportion of iron in hemoglobin should rapidly be a limiting factor for the dietary protein balance and also for an appropriate formulation. Studies on hemoglobin hydrolysis have been reported in order to increase the [Fe]/[protein] ratio<sup>15,16</sup>. However, the high degree of hydrolysis generally reported in these studies, dramatically decreases the heme solubility, which makes the formulation difficult and probably decreases iron absorption.

The aim of the present investigation was to develop an efficient process to produce from bovine hemoglobin a peptidic hydrolysate rich in soluble heme-iron. This process performed at pilot plant scale involved a moderate hydrolysis of hemoglobin by pepsin and a diafiltration with an hydrophilic ultrafiltration membrane to increase the [Fe]/[protein] ratio. After spray-drying, a water soluble heme-iron powder was obtained. The amino-acid composition and heme content were determined, and hydroxyl-radical-generating ability of heme-iron from the heme peptidic hydrolysate was compared to ferrous sulfate as mineral iron.

## EXPERIMENTAL

### *Preparation of hemoglobin hemolysate*

Bovine hemoglobin hemolysate was prepared from slaughterhouse blood by hemolysing erythrocytes with 10 mmol dm<sup>-3</sup> HCl (1v/3v). Centrifuged red cells were provided by Veos Novo, (Zwevezele, Belgium). Hemoglobin solution was then adjusted to 5.1 % (w/v) with 10 mmol dm<sup>-3</sup> HCl. Hemoglobin concentration was determined according to the cyanmethemoglobin method<sup>17</sup>. For laboratory studies, hemoglobin solutions were prepared with demineralized water and pH was adjusted to the appropriate hydrolysis pH with 1M HCl or 1M NaOH.

### *Hemoglobin hydrolysis*

In order to determine hydrolysis conditions, three proteolytic enzymes (Alcalase<sup>®</sup>, pepsin and papain) were tested on 5.1% (w/v) hemoglobin solution in a 2 dm<sup>3</sup> reactor, up to complete hydrolysis (24 h). Pepsin hydrolysis was carried out at pH 2 and at pH 4 by addition of porcine pepsin (pepsin A, EC.3.4.23.1, from porcine stomach mucosa, Sigma Chemical Co, St Louis, MO) with an enzyme/protein ratio of 1.4 % (w/w). pH was maintained constant by using a pH-stat (titroprocessor Metrohm 665, Roucaire, France) and the reaction was stopped by adjusting the solution to pH 8 with 1M NaOH. Alcalase<sup>®</sup> hydrolysis (Subtilisin Carlsberg, EC.3.4.21.14, Novo industry, Copenhagen, Denmark) was performed at pH 8.5 and 50°C with an enzyme/protein ratio of 2% (w/w) and the enzyme was inactivated by heating at 80°C for 2 minutes. Papain hydrolysis (EC.3.4.22.2, Coopérative Pharmaceutique Française, Meulun, France) was carried out at pH 7 and 50°C with an enzyme/protein ratio of 1.5%.

### *Ultrafiltration Experiments*

Ultrafiltration of 1% (w/v) hemoglobin hydrolysate was performed at 22°C, pH 7 with a transmembrane differential pressure of 10<sup>5</sup> Pa. Two types of hydrophilic membranes were studied : a 0.3 m<sup>2</sup> regenerated cellulose spiral wound membrane with a molecular weight cut off of 10 kDa (Millipore Corporation, Bedford, MA) ; a 0.46 m<sup>2</sup> plane modified polyethersulfone membrane with a molecular weight cut off of 10 kDa (Pall-Filtron, Northborough, MA). The ultrafiltration systems were constituted of a feed tank with a capacity of 10 L, a Helicon system (Millipore) with a spiral wound membrane in the case of the regenerated cellulose membrane

or a Pelicon system (Millipore) in the case of the modified polyethersulfone membrane (Centrasette cassette, Pall-Filtron). Amounts of peptides and heme were determined in the hydrolysate (Qo) and after ultrafiltration and diafiltration in the retentate (Qr). The rejection coefficients were calculated as  $(Qr/Qo) \times 100$ .

### *Pilot plant scale process*

#### *Hemoglobin hydrolysis*

80 kg of hemoglobin hemolysate containing  $1.8 \text{ g kg}^{-1}$  heme and  $51 \text{ g kg}^{-1}$  protein, ie 5.3 % (w/w) dried material, were heated up to  $40^\circ\text{C}$  in a pilot reactor (Inceltech LH SGI, Toulouse, France). pH was then adjusted to 4 with  $4 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl. The enzymic digestion was started by addition of pepsin at an enzyme/protein ratio of 1.4% (w/w). The pH was maintained at 4 by addition of  $4 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl using a pH stat (Inceltech LH SGI). The hydrolysis was carried out for 24 hours.

#### *Clarification*

Hemoglobin hydrolysate was clarified with a SAOOH 205 separator (Westfalia, Hoelde, Germany) with a flow rate of  $20 \text{ dm}^3 \text{ h}^{-1}$ . Pepsin was then inactivated by raising the pH to 8 with concentrated NaOH.

#### *Tangential ultrafiltration*

Filtration was carried out with a Procon pump and a pelicon ultrafiltration system (Millipore) equipped with a  $0.46 \text{ m}^2$  modified polyethersulfone membrane with a molecular weight cut off of 10 kDa (Centrasette cassette, Pall-Filtron). First, 70 kg of clarified hydrolysate were concentrated twice at room temperature by ultrafiltration with a transmembrane differential pressure of  $10^5 \text{ Pa}$ . The retentate was then diafiltered with 3 volumes of demineralised water (about  $110 \text{ dm}^3$ ).

#### *Spray Drying*

The resulting 35 kg diafiltered retentate obtained were dried by atomization (Atomizer Minor Production, type Niro, Copenhagen, Denmark). Spray drying was carried out between  $200^\circ\text{C}$  and  $80^\circ\text{C}$  with a solution flow rate of  $10 \text{ dm}^3 \text{ h}^{-1}$ .

#### *Analytical methods*

Peptidic nitrogen was determined according to the method of Kjeldhal<sup>18</sup>. Peptide content was expressed as  $N \times 6.25$  where N was the nitrogen content expressed in grams. Heme concentration was determined by the pyridine hemochromogen method<sup>19</sup>. Iron content was determined by atomic absorption spectrometry : mineralisation was carried out at  $150^\circ\text{C}$  in a mixture of  $10 \text{ cm}^3$  nitric acid and  $2 \text{ cm}^3$  perchloric acid, iron containing samples (about 10 ppm) were nebulized in an Argon plasma torch and iron was detected at  $259.94 \text{ nm}$  with an ARL 3510 ICP spectrophotometer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). Peptidic fraction molecular weights were estimated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis according to the method of the Anderson et al<sup>20</sup>. The degrees of hydrolysis were determined with by the trinitro benzene sulfonate method (TNBS) according to Addler-Nielsen<sup>21</sup>. Amino acids were analyzed using a Picotag Work Station (Waters, Milford, MA). Peptide hydrolysis was achieved with constant-boiling HCl containing 1 % (w/v) phenol for 24 h at  $100^\circ\text{C}$ . Precolumn derivatizations of amino acids with phenyl isothiocyanate and HPLC separation of derivatized amino acids on a Waters RP-Picotag Column ( $150 \times 3.9 \text{ mm I.D.}$ ) were performed according to the method of Bidlingmeyer et al<sup>22</sup>.

#### *Deoxyribose degradation test*

In order to prevent iron contamination, flasks were previously washed with nitric acid and traces of metals in the buffers were removed with 8-hydroxyquinolein according to the method of Waring et al.<sup>23</sup>. Deoxyribose and hydrogen peroxyde in  $25 \text{ mmol dm}^{-3}$  HCl/KCl pH 2 or  $25 \text{ mmol dm}^{-3}$  phosphate buffer pH 8 study, was incubated for 2 h at  $37^\circ\text{C}$  with peptidic hydrolysate heme-iron. Final concentrations were :  $2.5 \text{ mmol dm}^{-3}$  in desoxyribose  $0.25 \text{ mmol dm}^{-3}$  in iron and  $2.5 \text{ mmol dm}^{-3}$  in  $\text{H}_2\text{O}_2$ . After incubation,  $1 \text{ cm}^3$  thiobarbituric acid (1% w/v, in  $0.05 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH) and  $1 \text{ cm}^3$  Trichloroacetic acid (2.8% w/v), were added, then the solution was heated at  $100^\circ\text{C}$  for 20 min. The resulting chromogen was extracted into butan-1-ol and detected at  $532 \text{ nm}$ .

## **RESULTS & DISCUSSION**

### **Determination of hydrolysis conditions**

Hemoglobin digestion tests were performed in a large range of pH with three industrial proteolytic enzymes of broad specificity : pepsin in acidic conditions, papain at neutral pH and Alcalase<sup>R</sup> at alkaline pH.

The degrees of hydrolysis infunction of time for alcalase and pepsin during the first 24 hours (Fig. 1) show similar behaviour with respectively at pH 8.5, 25 % and at pH 2, 22 % hydrolysis after 24 hours, which is close to the degrees of hydrolysis usually obtained with hemoglobin proteolysis<sup>24</sup>. Peptic hydrolysis under mild conditions (pH 4) gave a degree of hydrolysis of about 13% after 24 hours. Curiously, the lowest proteolytic activity was obtained with papain under near optimal conditions (pH 7). All hydrolysis were practically complete after six hours, suggesting similar kinetics for the four hydrolysis conditions. As reported in Table 1, heme in the soluble state contained in the final hydrolysates after adjustment at pH 8 reached about 100% (except for papain with only 83%). On the contrary, at pH 2 only the peptidic fraction resulting from the mild hydrolysis by pepsin at pH 4, and 40°C allowed a high heme solubilization : 78% (w/w) of total heme. Heme solubility at acidic pH can be considered as a reliable indicator of the peptide role in heme solubilization because of the very low solubility of free heme in this range of pH. Moreover, in vitro iron solubility seems to be a significant parameter for intestinal absorption, both for mineral<sup>25</sup> and heme-iron<sup>26</sup>. The degree of hydrolysis represents another sensitive parameter in the choice of hydrolysis conditions. Indeed, the high degree of hydrolysis (22% with pepsin at pH 2 and 25% with Alcalase at pH 8.5), seemed to be correlated with the low heme solubility at acidic pH (respectively 7% and 8% of initial heme), showing that too low molecular size peptides could not prevent heme insolubilization. Digestion by pepsin under mild conditions (pH 4 and 40°C) was considered to be the most suitable conditions for nutritional applications since this enzyme is physiological and allows to prepare a peptidic hydrolysate which can solubilize heme.

### Choice of the ultrafiltration membrane

Ultrafiltration experiments were carried out at 22°C, pH 7, with a transmembrane differential pressure of 10<sup>5</sup> Pa. For these preliminary tests a 1 % (w/v) peptic hydrolysate was used after clarification. Two hydrophilic membranes were used, a modified polyethersulfone membrane and a regenerated cellulose membrane, both of 10 kDa molecular weight cut off. As described in Table 2, the retention of the peptides of the regenerated cellulose membrane was slightly lower than that of the polyethersulfone membrane but its heme rejection coefficient was only 78 % and its permeate flux was less than 10 dm<sup>3</sup> h<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> after 30 minutes (Fig. 2). On the other hand the hydrophilic modified polyethersulfone membrane, exhibited a higher permeate flux (40 dm<sup>3</sup> h<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>), a lower peptide rejection coefficient (40%), and a very high heme retention (99%), so this membrane was selected to improve the process.

### Development of the process at the pilot plant scale

80 kg of hemoglobin hemolysate containing 1.8 g kg<sup>-1</sup> heme and 51g kg<sup>-1</sup> protein, ie 5.3 % (w/w) dried material were hydrolysed by pepsin at pH 4 and 40°C during 24 hours. Elimination by clarification of insoluble heme after hydrolysis prevented the fouling of the membrane during the tangential filtration step and avoided heme precipitation through interaction between soluble heme and heme precipitate in the course of the concentration step. Heme-iron enrichissement was performed by using a double step filtration : first, peptic hydrolysate was concentrated twice by ultrafiltration in order to increase heme-iron concentration, then, diafiltration with three volumes of water allowed an enhancement of the [Fe]/[peptides] ratio and a simultaneous salts removal. Finally, the enriched heme-iron hydrolysate was stabilized by spray-drying. Fig. 3 shows the flow diagram of the process to obtain the soluble heme-iron hydrolysate. The degree of hydrolysis of 11 % obtained after 24 hours was slightly lower than the one obtained at laboratory scale (13%). During filtration step on the 10 kDa modified polyethersulfone membrane, the permeate flux was rather constant about 15 dm<sup>3</sup> h<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> (Fig 4) showing that no fouling occurred after 16 hours in spite of the high heme concentration in the retentate side. These results demonstrate that hydrophilic modified polyethersulfone membrane, specifically modified to minimize protein binding to the surface and into the interstitial structure, is particularly well adapted for hemoprotein hydrolysate filtration. These membranes offer low affinity and adsorptive characteristics with chemical and physical stability properties. Experimental recirculation flow rate was about 31 dm<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>. Heme and peptide rejection coefficients were respectively of 99% and 44% and the 0.61% (w/w) [Fe]/[peptides] ratio was twice as high as in hemoglobin (Table 3). Heme-iron enrichissement using a 0.46 m<sup>2</sup> membrane was rather time consuming (16 hours), so that determination of the real maximum of the [Fe]/[peptide] ratio should require a long time. A new filtration experiment was then performed on only 5 kg hemoglobin hydrolysate with the same 0.46 m<sup>2</sup> modified PES membrane and allowed to reach a [Fe]/[peptide] ratio of 0.89% in less than 2 hours. This experiment demonstrate that for industrial transfer, the filtration process could be considerably improved by increasing the membrane surface. Atomization step gave 1.3 kg of powder with 97% (w/w) dried matter. The moderate yields of the spray drying step (respectively 73% and 77% for iron and peptides) could be explained by the pulverulent aspect of the powder. Indeed, the granulometric partition experiments gave 90 % (w/w) of the particules in a [40µm-150µm] interval (data not shown). The global iron yield of the process was 58% (w/w).

## Heme-iron hydrolysate characterization

The red-brown powder was soluble at alkaline, neutral and acidic pH showing that heme-iron enrichment did not affect heme solubilization especially at pH 2. Final heme-iron content of the hydrolysate powder (5.9 g/kg dried material) was about twice as high as in hemoglobin and would allow to decrease significantly the amount of protein necessary to bring soluble heme iron in pharmaceutical preparations. SDS polyacrylamide gel electrophoresis migration showed a main peptidic fraction of molecular weights about 5 kDa (Fig. 5) demonstrating that small peptides were removed by filtration through the membrane. It can be noticed that the molecular weights of the peptides of the retentate were lower than the molecular weight cut-off of the membrane (10 kDa), suggesting that interactions occur between the molecules of the retentate. Amino-acid analyses of the iron enriched hydrolysate and of the initial bovine hemoglobin produced at the slaughterhouse show that this heme enrichment process does not significantly modify the amino-acid composition of the hemoglobin hydrolysate. So the nutritional quality of hemoglobin could be preserved.

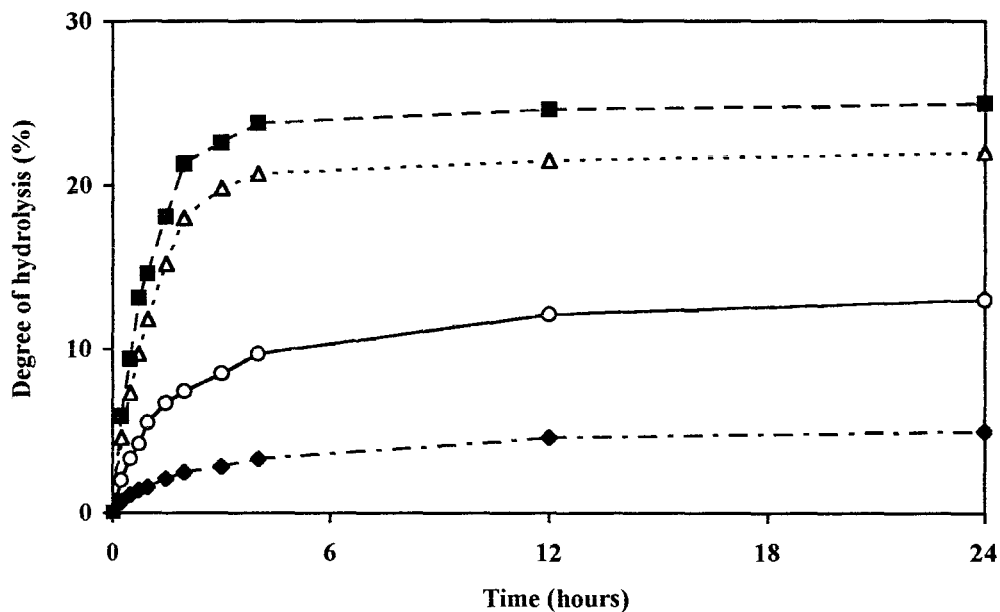
## Study of the harmlessness of the heme-iron peptide hydrolysate in relation to generation of hydroxyl radicals

In order to compare the hydroxyl radical generating ability of the iron of the hydrolysate and of a mineral ferrous salt as iron sulphate, the deoxyribose test was used. Preliminary experiments, carried out without deoxyribose, demonstrated that hydroxyl radicals ( $\text{OH}^\bullet$ ) were not able to degrade the hydrolysate peptidic fraction of the hydrolysate into products which could interact with thiobarbituric acid. The low solubility of iron at alkaline pH disturbed the deoxyribose test (data not shown). So iron was solubilized by EDTA as [Fe-EDTA] complex in order to use the deoxyribose method at pH 8. The detection of hydroxyl radicals generated by iron in the presence of hydrogen peroxide at acidic or basic pH was considerably reduced (about 70%) by using heme-iron from hemoglobin hydrolysate instead of free iron (ferrous sulphate) or [Fe-EDTA] complex (Table 5). The slight absorbance observed at 532 nm with hemoglobin hydrolysate could be due to traces of free metal contaminants in the preparation. The highly reactive and biologically damaging hydroxyl radicals can be formed in biological material when Fenton reaction catalysts such as  $\text{Fe}^{2+}$  are available ( $\text{FeSO}_4$ , [Fe-EDTA],...). These results suggest that the use of the heme-iron hydrolysate could significantly reduce the availability of  $\text{OH}^\bullet$  in the digestive tract and particularly in stomach where free iron is highly reactive because of the acidic pH. Such a hydrolysate could decrease iron-overload risk and tissue damages commonly reported with ferrous salts.

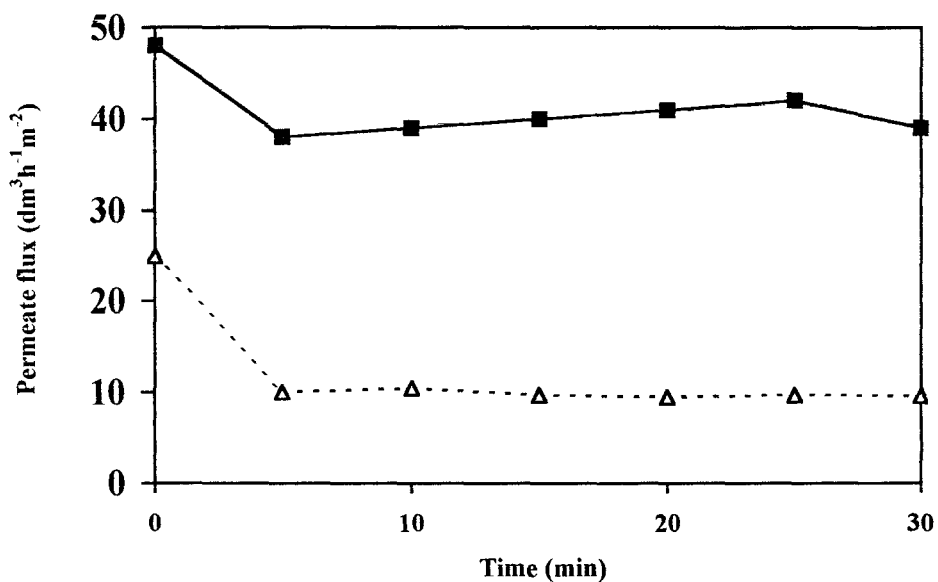
## CONCLUSIONS

We improved a process using hemoglobin peptic digestion in mild conditions associated with a membrane ultrafiltration to prepare a heme-iron containing hydrolysate, soluble in a large range of pH (even at pH 2 where 80% of hemoglobin precipitates) and with an iron content (0.89 g / 100 g dried material) more than 2.5 times as high as in hemoglobin. Such a hydrolysate could be used more widely in pharmaceutical preparations and would allow to reduce the amount of product necessary for the treatment or prevention of iron deficiency. This preparation could enable a good intestinal iron absorption and a low biological radical toxicity. Further characterization of the heme carrier peptide fraction are in progress in our laboratory in order to understand the heme-peptide associations better.

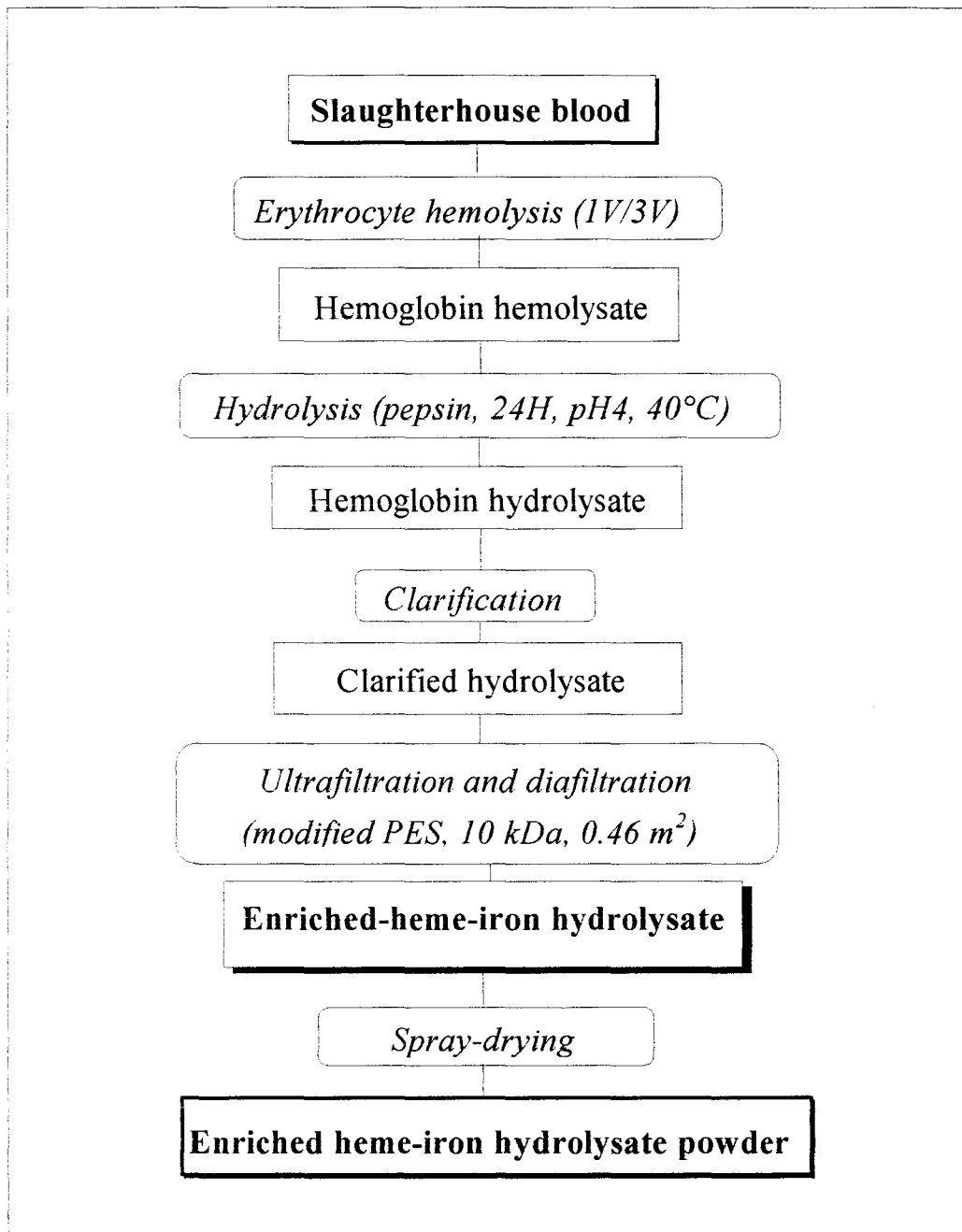




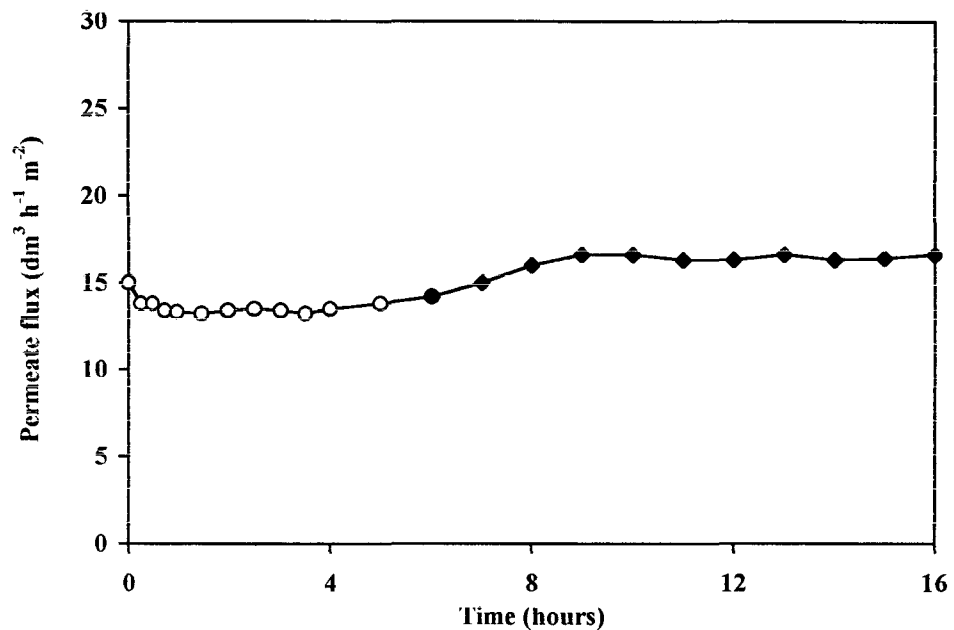
**Fig.1.** Degree of hydrolysis as a function of time, during bovine hemoglobin (1% w/v) hydrolysis under different hydrolysis conditions. (■) Alcalase, pH 8.5, 50°C, E/S 2% (w/w). (Δ) Pepsine, pH 2, 40°C, E/S 1.4% (w/w). (○) Pepsin, pH 4, 40°C, E/S 1.4% (w/w). (◆) Papain, pH 7, 50°C, E/S 1.5% (w/w).



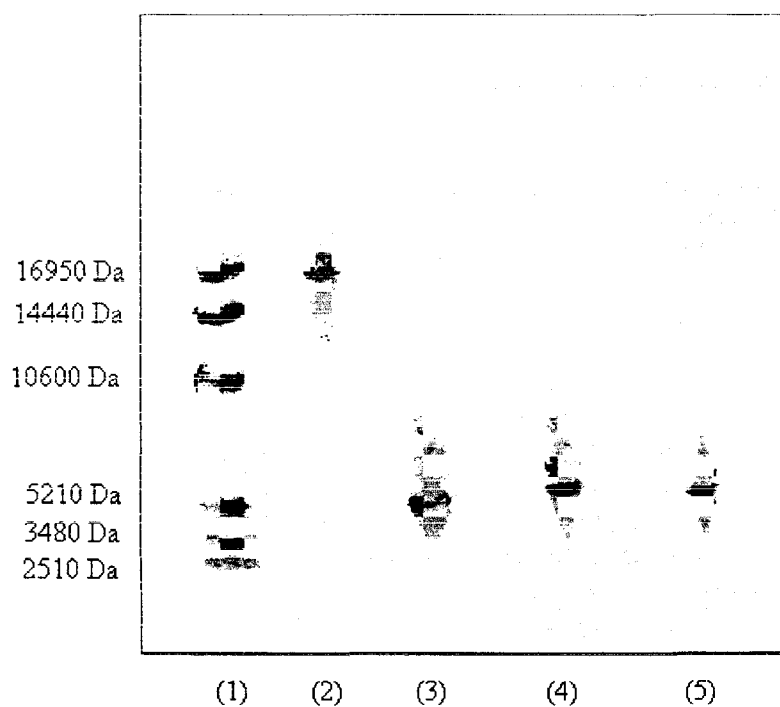
**Fig.2.** Permeate flux as a function of time during ultrafiltration of 1% (w/v) hemoglobin hydrolysate using two hydrophilic ultrafiltration membranes at pH 7, 22°C and 10<sup>5</sup> Pa. (■) Modified polyethersulfone. (Δ) Regenerated cellulose.



**Fig.3.** Flow diagram of the pilot plant scale process to produce enriched heme-iron peptidic hydrolysate.



**Fig.4.** Development of the permeate flux during filtration of 5% (w/v) hemoglobin hydrolysate at pilot-plant-scale using the 10 kDa, 0.46 m<sup>2</sup>, modified polyethersulfone membrane at pH 8, 22°C and 10<sup>5</sup> Pa. (○) Ultrafiltration step. (♦) Diafiltration step.



**Fig.5.** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis : (1) reduced molecular mass markers, (2) bovine hemoglobin, (3) hemoglobin hydrolysate, (4) enriched heme-iron hydrolysate, (5) permeate.

**TABLE 1**  
Soluble heme content of hemoglobin hydrolysates in relation to hydrolysis conditions

Enzyme	Hydrolysis conditions		Degree of hydrolysis after 24 h	Fraction of soluble heme (% w/w)	
	pH	Temperature		pH2	pH8
Alcalase	8,5	50°C	25%	8%	96%
Pepsin	2	40°C	22%	7%	95%
Pepsin	4	40°C	13%	78%	97%
Papain	7	50°C	4%	69%	83%
Native bovine hemoglobin			-	19%	96%

**TABLE 2**  
Retention of heme and peptides with two hydrophilic membranes

Membrane (module)	Nature	Surface area	Molecular weight cut-off	Rejection coefficient	
				Heme	Peptide
Modified Polyethersulfone (flat plate)	hydrophilic	0.46 m <sup>2</sup>	10 kDa	99%	40%
Regenerated cellulose (spiral wound)	hydrophilic	0.30 m <sup>2</sup>	10 kDa	79%	44%

Laboratory ultrafiltration experiments were performed on a 1% (w/v) at 22°C, pH 7, with a transmembrane differential pressure of 10<sup>5</sup> Pa

**TABLE 3**

Composition of the product and iron yields at the successive stages of the process

	<b>Heme</b>	<b>Peptide</b>	<b>Iron</b>	<b>Fe / Peptide ratio</b>	<b>Iron yields</b>
	<b>expressed as percentage of dried material (w/w)</b>			<b>% (w/w)</b>	
Hemolysate	3.5	96	0.30	0.31	
<i>Hydrolysis</i>					100%
Hydrolysate	3.4	96	0.29	0.30	
<i>Clarification</i>					75%
Clarified hydrolysate	2.9	97	0.26	0.27	
<i>Ultrafiltration</i>					99%
Retentate	5.9 (8.7*)	95 (92*)	0.60 (0.82*)	0.61 (0.89*)	
<i>Spray-drying</i>					77%
Dried powder	5.8	96	0.61	0.59	
				<b>Global yield</b>	<b>58%</b>

\* Ultrafiltration optimized with 5 kg hydrolysate

**TABLE 4**

Amino-acid composition of bovine hemoglobin and heme-iron hydrolysate

	<b>Amino-acid compositions</b>																	
	<b>Asp</b>	<b>Thr</b>	<b>Ser</b>	<b>Gu</b>	<b>Pro</b>	<b>Gly</b>	<b>Ala</b>	<b>Val</b>	<b>Met</b>	<b>Ile</b>	<b>Leu</b>	<b>Tyr</b>	<b>Phe</b>	<b>His</b>	<b>Lys</b>	<b>Arg</b>	<b>Cys</b>	<b>Trp</b>
<b>initial bovine hemoglobin</b>	5.6	4.9	6.2	9.7	4.4	8.2	12.0	9.1	1.3	0.0	11.5	1.6	6.2	6.5	7.3	3.4	1.4	nd
<b>Heme-iron hydrolysate</b>	6.6	4.8	4.9	10.1	4.9	9.5	9.8	10.8	1.4	0.0	11.4	1.4	6.6	5.0	7.8	3.0	1.4	nd

Amino-acid compositions are expressed as % Mol  
nd : not determined

**TABLE 5**  
Comparative study of hydroxyl radical generation ability  
of ferrous sulfate and heme-iron hydrolysate

Deoxyribose test with :	A 532nm	
	pH 2	pH 8
Blank	0.083	0.091
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.195	0.212
FeSO <sub>4</sub>	0.128	0.111*
FeSO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.253	1.174*
Enriched heme-iron peptidic hydrolysate	0.106	0.121
Enriched heme-iron peptidic hydrolysate + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.325	0.361

Final concentrations were : deoxyribose 2.5 mM ; Fe 0.25 mM ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.5 mM. The results are a means of 3 separate assays which differed by less than 5%.

\*At alkaline pH, insoluble FeSO<sub>4</sub> was replaced by a soluble [Fe-EDTA] complex at the same concentration, which allows the deoxyribose test at this pH.

## REFERENCES

1. De Mayer, E. & Adiels-Tegman, M., La prévalence de l'anémie dans le monde. *Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales*. **38** (1985) 302-316.
2. Siengenber, D., Baynes, R.D., Bothwell, T.H., Macfarlane, B.J., Lamparelli, R.D., Car, N.G., Macphail, P., Schmidt, U., Tal, A. & Mayet, F., Ascorbic acids prevents the dose-dependant inhibitory effect of polyphenols and phytates on non-heme-iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* **53** (1991) 537-545.
3. Harland, B.F., Dietary fiber and mineral bioavailability. *Nutr. Res. Rev.* **2** (1989) 133-141.
4. Champagne, E.T., Effects of pH on mineral-phytate, protein-mineral-phytate and mineral-fiber interactions. Possible consequences of atrophic gastritis on mineral bioavailability. *J. Am. Coll. Nutr.* **6** (1988) 499-508.
5. Torre, M., Rodriguez, A.R. & Saura-Calixto, F., Effect of dietary fiber and phytic acid on mineral bioavailability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1** (1991) 1-22.
6. Turnbull, A., Cleton, F. & Finch, C.A., Iron absorption. IV : The absorption of hemoglobin iron. *J. Clin. Invest.* **41** (1962) 1897-1907.
7. Callender, S.T., Mallett, B.J. & Smith, M.D., Absorption of haemoglobin iron. *Brit. J. Haemat.* **3** (1957) 186-192.
8. Conrad, M.E., Benjamin, B.I., Williams, H.L. & Foy, A.L., Human absorption of hemoglobin iron. *Gastroenterology*. **53** (1967) 5-10.
9. Carpenter, C.E. & Mahoney, A.W., Contribution of heme and non heme iron to human nutrition. *Crit. Rev. in food Sci. & Nutr.* **31, 4** (1992) 333-366.
10. Frykman, E., Bystrom, M., Jansson, U., Edberg, A. & Hansen, T., Side effects of iron supplements in blood donors; Superior tolerance of heme iron. *J. Lab. Clin. Med.* **123, 4** (1994) 561-564.
11. Lindroos, World patent 8 102 834 (1981).
12. Valtion Teknillinen Tutkimuskeskus, World patent 8 303 198 (1983).
13. Conrad, M.E., Cortell, S., Williams, H.F. & Foy, A.L., Polymerization and intraluminal factors in the absorption of hemoglobin iron. *J. Lab. Clin. Invest.* **68** (1966) 659-668.
14. Walter, T., Hertrampf, E., Pizzaro, F., Olivares, M., Llaguno, S., Letelier, A, Vega, V. & Stekel, A., Effect of bovine-hemoglobin-fortified cookies on iron status of schoolchildren : a nationwide program in Chile. *Am. J. Clin. Nutr.* **57** (1993) 190-1994.
15. A.B. Pripps Briggerier, European Patent 0 061 556 (1982).
16. Mitsubishi Chemical Industry Co, Japanese Patent 59, 140, 835 (1983).
17. Crosby, W.H., Munn, J.I. & Furth, W., Standardizing a method for clinical hemoglobinometry. *US Armed forces Med. J.* **5** (1954) 693-703.
18. Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Biological evaluation of protein quality. In *Official Methods of Analysis of the Association of official Analytical Chemists*, ed. W. Hornitz, 12th, Washington DC, 1975, pp. 857-861.
19. Paul, K.G., Theorell, H. & Akeson, A., The molar light absorption of pyridine ferroprotoporphyrin (pyridine haemochromogen). *Acta Chem. Scand.* **7** (1953) 1284-1287.
20. Anderson, B.L., Berry, R.W. and Telser, A., A sodium-dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis system that separates peptides and proteins in the molecular range of 2 500 to 90 000, *Anal. Biochem* **132** (1983) 365-375.
21. Adler-Nissen, J., Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysate by trinitro benzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.* **27, 6** (1979) 1256-1262.

22. Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A. and Tarvin, T.L., Rapid analysis of amino acids using precolumn derivatization, *J. Chromatogr.* **336** (1984) 93-101
23. Waring, W.S. & Werkman, C.H., Growth of bacteria in an Iron-free-medium. *Arch. Biochem.* **1** (1942) 303-310.
24. Regnier, J., Décoloration enzymatique du cruor des abattoirs. Procédé et applications du produit. *R.T.V.A. Novembre* (1983) 29-35.
25. Miller, D.D. & Berner, L.A., Is solubility in vitro a reliable predictor of iron bioavailability? *Biol. Trace Element Res.* **19** (1989) 11-24.
26. Reinzenstein, P., Hemoglobin fortification of food and prevention of iron deficiency with heme iron. *Acta Med Scand. Suppl.* **629** (1980) 7-46.



---

**A2 : INFLUENCE OF MOLECULAR INTERACTIONS ON  
ULTRAFILTRATION OF A BOVINE HEMOGLOBIN HYDROLYSATE  
WITH AN ORGANIC MEMBRANE**

(Journal of membrane science)

---

F. Lebrun, A. Bazus, P. Dhulster and D. Guillochon\*

Laboratoire de Technologie des Substances Naturelles, IUT"A" Lille I,

BP 179, 59653 Villeneuve d'Ascq Cedex. FRANCE



ELSEVIER

Journal of Membrane Science 146 (1998) 113–124

Journal of  
MEMBRANE  
SCIENCE

## Influence of molecular interactions on ultrafiltration of a bovine hemoglobin hydrolysate with an organic membrane

F. Lebrun, A. Bazus, P. Dhulster, D. Guillochon\*

*Laboratoire de Technologie des Substances Naturelles, IUT "A" Lille 1, BP 179, 59653 Villeneuve d'Ascq Cedex, France*

Received 24 December 1997; received in revised form 11 March 1998; accepted 12 March 1998

### Abstract

Inter-molecular interactions involved in the hydrolysate were studied in order to explain heme and peptide high retentions observed during the ultrafiltration of a bovine hemoglobin peptidic hydrolysate with a 10 kDa modified polyethersulfone membrane.

Physico-chemical properties of the peptidic fractions of the retentate and of the permeate were characterized by UV/vis spectroscopy, SDS-PAGE electrophoresis, size-exclusion chromatography, reversed phase HPLC, hydrophobic interaction chromatography on hemin agarose, precipitation with sodium chloride and amino acid compositions. Two populations of peptides were revealed in the hydrolysate: one forming high-molecular weight hydrophobic associations retained by the membrane, and another more hydrophilic, giving no associations and freely passing through the membrane. Contrary to the peptides of the permeate, peptides retained by the membrane had a high affinity and a large binding capacity for the heme. Heme as polymers is mainly linked by hydrophobic interactions with peptide associations to form large heme-peptide aggregates. These results suggest that high rejections of heme and peptide, often reported in the literature, during ultrafiltration of hemoglobin hydrolysates, could be largely explained by these associations. © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Membrane ultrafiltration; Hemoglobin; Hydrolysate; Hydrophobic interactions

### 1. Introduction

Tangential filtration of protein enzymatic hydrolysates has been in progress for many years to obtain peptidic fractions with improved nutritional and functional properties [1–5]. Ultrafiltration was used to produce, from slaughterhouse, heme-iron enriched hemoglobin hydrolysates to prevent anemia and decolorized globin hydrolysates for food industries [6,7].

Ultrafiltration has been previously used in our laboratory to prepare amphiphilic peptides from a peptidic hemoglobin hydrolysate produced at pilot plant scale in a membrane reactor [8–11]. Ultrafiltration of hemoglobin hydrolysates is more complex than ultrafiltration of other protein hydrolysates derived from classical sources such as caseins, whey proteins, soya proteins, etc. because the presence of the heme molecule introduces new possibilities of interactions between solutes or membranes. The comprehension of these phenomena is important in the framework of the valorization of hemoglobin and myoglobin deriv-

\*Corresponding author. Fax: +33 3 20 43 44 72; e-mail: ltsn@univ-lille1.fr

ing from slaughterhouses and fish industries. Many authors reported high heme and peptide retentions in spite of small sizes of these molecules whatever were the hydrolysis conditions, nature and molecular weight cut-off of the membranes [6,9]. In most of the cases, these high retentions were explained by hydrophobic heme-membrane adsorptions. However, other phenomena could be involved during ultrafiltrations such as interactions between molecules of the hydrolysates. Few studies on these interactions, in relation to the selectivity of the membranes towards peptides and heme, were realized.

In this paper we describe a method to prepare by ultrafiltration, a peptidic hydrolysate enriched in soluble heme-iron from bovine hemoglobin. Such preparations are of great interest for the prevention and the treatment of iron-deficiency anemia. A hydrophilic modified polyethersulfone membrane exhibiting high heme retention but little fouling was selected. The aim of this article is to report studies on the selectivity of this membrane towards peptides and heme during ultrafiltration of a soluble hemoglobin hydrolysate. The interactions peptide-peptide, heme-heme and peptide-heme were characterized and their roles on the selectivity of the ultrafiltration process were clarified. It was shown that the deciding factors in the peptidic composition of the permeate and of the retentate were not heme or peptide-membrane interactions but mainly peptidic associations occurring in the medium in relation to the physico-chemical properties of the peptides.

## 2. Experimental

### 2.1. Preparation of the peptidic hemoglobin hydrolysate

Centrifuged red cells were provided by Veos n.v. (Zwevezele, Belgium). Bovine hemoglobin was prepared at pilot plant scale from slaughterhouse blood by hemolyzing one volume of erythrocytes with three volumes of 10 mM HCl. Hemoglobin concentration was determined according to the cyanomethemoglobin method [12]. 80 l of hemolysate at 50 g l<sup>-1</sup> were brought to 40°C in a thermostated reactor (Inceltech LH.SGI, Toulouse, France) and pH was adjusted to 4 with 4 M HCl. The enzymic digestion was started by

addition of porcine pepsin (Sigma, St. Louis, MO) at an enzyme/protein ratio of 1.4% (w/w). The pH was maintained at 4 by addition of 4 M HCl using a pH stat (Inceltech LH.SGI). After 24 h, the hemoglobin hydrolysate was clarified by a continuous centrifugation (Saooh 205 separator, Westfalia) with a flow rate of 20 l h<sup>-1</sup>, then pepsin was inactivated by raising the pH to 8 with concentrated NaOH. In these conditions the degree of hydrolysis of hemoglobin determined by the trinitrobenzene sulfonate method [13] was 11%.

### 2.2. Dosage methods

The degree of hydrolysis (DH) was defined as the ratio of the number of peptide bonds cleaved to the total number of peptide bonds. Amino groups released during hydrolysis were assayed by the trinitrobenzene sulfonate method (TNBS) [13]. Amino groups released were corrected by subtracting amino groups present in the hemolysate.

Peptides were determined according to the method of Kjeldhal [18]. peptide content was expressed as  $N \times 6.25$  where  $N$  is the nitrogen content expressed in grams.

Heme concentrations were determined by pyridine-hemochromogen method [14] with reference to a calibration curve obtained with free hemin solubilized in 0.1 M NaOH. Absorbances were measured at 526 nm.

### 2.3. Decolorization of peptidic hydrolysates

Decolorization of the peptidic hydrolysate of the retentate and of the whole hydrolysate was carried out by the acetone method of Rossi Fanelli slightly modified [15]. Hemoglobin hydrolysates were treated at 20°C with acetone containing 2–3 ml of 2 N HCl l<sup>-1</sup>. 25 ml of the 3–5% (w/v) peptidic hydrolysates were slowly added with vigorous stirring to about 250 ml of the acetone solution. Heme was solubilized in acetone and the precipitated peptidic fraction was collected by centrifugation and freeze-dried as a peptidic powder.

### 2.4. Ultrafiltration experiments

Tangential filtration at pilot plant scale was carried out with a Pelicon ultrafiltration system (Millipore,

Bedford, MA) equipped with a 10 kDa hydrophilic modified polyethersulfone membrane of 0.46 m<sup>2</sup> in the form of a Centrasette cassette (Pall-Filtron, Northborough, MA). 70 l of clarified hemoglobin hydrolysate were reduced to 35 l at room temperature by ultrafiltration with a transmembrane differential pressure of 10<sup>5</sup> Pa. The retentate was then diafiltered with three volumes of water and permeates were collected. Amounts of peptides and heme were determined in the initial hydrolysate ( $Q_0$ ) and after ultrafiltration and diafiltration in the retentate ( $Q_R$ ). The rejection coefficient was calculated as  $Q_R/Q_0$ . Retentate and permeate were freeze-dried as a peptidic powder before being solubilized for further experiments.

Ultrafiltration of the decolorized peptidic hydrolysate of the retentate was performed with a Filtron ultrafiltration system equipped with a 10 kDa hydrophilic modified polyethersulfone membrane of 0.07 m<sup>2</sup> in the form of a Miniset cassette (Pall-Filtron). 200 ml of 4.7% (w/v) decolorized retentate were reduced to 60 ml at room temperature with a transmembrane differential pressure of 10<sup>5</sup> Pa and the rejection coefficient was determined as previously by determination of peptide amounts in the retentate.

Ultrafiltration of 1% (w/v) whole hemoglobin hydrolysate and of 0.04% (w/v) hemin (Sigma) in water at pH 9.5 was performed with the same system and in the same conditions. For the ultrafiltrations in the presence of potassium cyanide, 1 g was added for 200 ml solution. Heme concentration in the retentate was determined by the pyridine-hemochromogen method [14] and its rejection coefficient was calculated as above.

### 2.5. Electrophoresis

Samples were subjected to urea–SDS polyacrylamide gel electrophoresis according to the method of Anderson et al. [16] slightly modified using a polyacrylamide gel (16.5% T, 6% C) containing 6 M urea in a 1 M Tris–0.2% SDS buffer; pH was adjusted at 7.8 with concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The peptidic fraction dissolved in 0.14 M Tris acetic buffer (pH 7.8) containing 0.5% SDS and 20% sucrose were heated at 100°C for 3 min and 10 µg peptides were applied. Reduced molecular mass standards (Sigma) were used as markers. Electrophoresis was performed at 20 W constant power until the dye front reached within 1 cm

of the bottom of the plate. The gel slabs were stained with Coomassie brilliant blue G and picric acid [17].

### 2.6. Size exclusion chromatography (SEC)

SEC was performed with a Pharmacia system including a pump P<sub>1</sub> and an Uvicord S II detector (Pharmacia-LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden). Peptidic fractions of the retentate (decolorized by the acetone method) and of the permeate were chromatographed on Sephadex G50 column (34×2.5 cm i.d.) (Pharmacia). 50 mg of freeze-dried sample were dissolved in 100 ml elution buffer and 1 ml (500 µg) was applied on the gel. Elution was performed with 40 mM borate buffer pH 9 at a flow rate of 15 ml h<sup>-1</sup>. Bovine serum albumin (Sigma) was used as a molecular weight marker with an elution volume of 49 ml. Peptides were monitored at 226 nm.

### 2.7. Reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

RP-HPLC analyses were carried out using a LKB system including 2150 HPLC pumps, a 2152 LC controller and a 2510 Uvicord detector (Pharmacia-LKB). The analyses of the peptidic fractions of the hydrolysate, of the retentate (after decolorization) and of the permeate were performed on a C<sub>18</sub> column (250×4.6 mm i.d.) (Vydac, Hesperia, CA). Peptides were eluted at 1 ml min<sup>-1</sup> with a gradient of 0.1% (w/v) trifluoroacetic acid as eluent A and acetonitrile with 0.05% trifluoroacetic acid as eluent B. A linear gradient from 0% to 60% was carried out in 60 min. 200 µg of freeze-dried sample dissolved in 100 µl eluent A were injected. Peptides were monitored at 226 nm.

### 2.8. Hydrophobic interaction chromatography (HIC)

HIC was carried out with a Pharmacia-LKB system including a pump P<sub>1</sub> and an Uvicord S II. A column (50×5.6 mm i.d.) was packed with hemin Sepharose (Sigma). Detection was carried out at 226 nm and the gradient employed was: 50 ml of 3 M sodium chloride in 0.04 M borate pH 8.5; 100 ml linear gradient from 3 to 0 M sodium chloride in the same buffer; 50 ml of 6 M urea in the phosphate buffer. 6 mg of decolorized peptidic fractions were dissolved in 250 µl of 3 M

NaCl/0.04 M borate buffer pH 8.5 before elution at a flow rate of 10 ml h<sup>-1</sup>.

### 2.9. Precipitation of peptides

Powdered peptidic fractions (decolorized or not) were solubilized in 4 ml of water at a concentration of 5% (w/v). The pH of the solution was adjusted with NaOH or HCl 0.5 M. Precipitations were carried out at 25°C. The effect of ionic strength was studied at pH 3 and at pH 8 with increasing sodium chloride concentrations up to 8 M. Solid sodium chloride was added slowly and with continuous stirring to reach a certain concentration. After all the salt was dissolved, the solutions were shaken and then centrifuged at 5000 g for 20 min. The precipitate was dissolved in 4 ml of water and the volume of the supernatant was readjusted to 4 ml with water. Aliquots of each sample were assayed for peptide content expressed as  $N \times 6.25$ ; and percentages of precipitation were calculated [18].

### 2.10. Amino acid analysis

Amino acid compositions of the peptidic fractions were determined using a "Picotag work station" (Waters, Milford, MA). Peptide hydrolysis was achieved with constant-boiling HCl containing 1% phenol for 24 h at 100°C. Precolumn derivatizations of amino acids with phenyl isothiocyanate, and HPLC separation of derivatized amino acids on a Waters RP-Picotag column (150×3.9 mm i.d.) were performed according to the method of Bidlingmeyer et al. [19]. The detection wavelength was 254 nm and the flow rate 1.0 ml min<sup>-1</sup>.

### 2.11. Solubilization of heme by peptidic fractions

Powdered peptidic fractions (64 µg) were dissolved in 2 ml of a mixture containing 75% (v/v) acetone and 25% (v/v) 20 mM pH 2 KCl/HCl buffer. Increasing amounts of hemin (Sigma) were added in this water organic solvent up to 200 µg. Acetone was removed by vacuum evaporation at room temperature. The insoluble heme was discarded by centrifugation at 5000 g. The supernatant was adjusted to 4 ml with acetone and its absorbance was measured at 385 nm. Heme concentrations were determined by reference to

a calibration curve obtained with free hemin solubilized in the same water organic solvent.

### 2.12. Spectrophotometric analyses

Spectra of ferrihemoglobin (Sigma), hemin (Sigma) and hemoglobin peptidic hydrolysate in 0.05 M borate buffer pH 9.5 were recorded between 300 and 650 nm with a Lambda 5 spectrophotometer (Perkin Elmer, Norwalk, CT) at concentrations such as the absorbances were comparable with each other. When the effect of potassium cyanide was studied, a small crystal was directly added in the sample cell.

## 3. Results

### 3.1. Ultrafiltration of the hemoglobin peptidic hydrolysate

In order to increase both the heme-iron concentration and to obtain a peptidic hydrolysate enriched in heme by increasing the heme/peptide ratio, ultrafiltration of the clarified peptidic hydrolysate was carried out at pH 8 in two steps through a 10 kDa modified polyethersulfone membrane: First, hemoglobin hydrolysate was concentrated twice, then a diafiltration with three volumes of water was performed. The filtrate fluxes attained steady-state values of about 13 and 17 l h<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>, respectively, for concentration and diafiltration phases showing that no fouling occurred even after 16 h (Fig. 1) in spite of a heme retention of 100% and a peptide retention of 40% at the end of the filtration experiment (Table 1). Moreover, the washing of the membrane easily allowed to recover the initial water flux (75 l h<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>) and no coloration was retained by the membrane confirming that no external or internal fouling was implied. This process is efficient to prepare a soluble-heme enriched hemoglobin hydrolysate which allows to obtain a heme/peptide ratio of 7% (w/w), or twice as high as in hemoglobin, with the absence of fouling phenomena. The molecular weights of the peptides of the retentate and of the permeate, determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis migration, would be in the vicinity of 5 kDa (Fig. 2). These results show that rejection coefficients of heme and peptides cannot be simply explained either by the 10 kDa molecular cut-

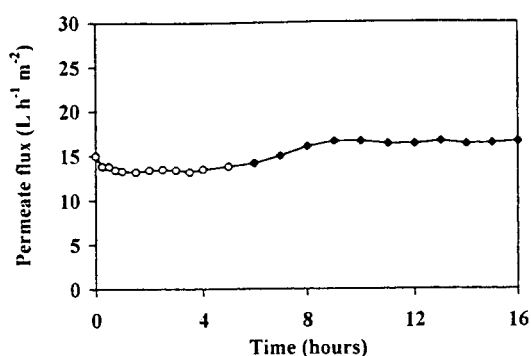


Fig. 1. Development of the permeate flux during the filtration of the 5% (w/v) peptic hemoglobin hydrolysate with 0.46 m<sup>2</sup> modified polyethersulfone membrane at a transmembrane pressure of 10<sup>5</sup> Pa. Molecular weight cut-off: 10 kDa concentration by ultrafiltration (○) from 70 to 35 l, then diafiltration with three volumes of water (◆).

off of the membrane or by a fouling occurring during ultrafiltration. So a study of the molecular interactions which would involve heme and peptides in the course of ultrafiltration is necessary to understand the cause of the retentions of these molecules. In order to estimate the part of the peptides in molecular interactions, we performed a second ultrafiltration of a 4.7% (w/v) decolorized peptidic fraction of the retentate on a 10 kDa modified polyethersulfone membrane of 0.07 m<sup>2</sup> (heme was removed by the acetone method). In spite of the absence of the heme, the rejection coefficient of this peptidic fraction was about 85% (Table 1). This high retention could indicate the formation of peptidic aggregates in the hemoglobin hydrolysate. So we undertook the characterization of the peptides of the retentate and of the permeate.

### 3.2. Characterization of the peptidic fractions

To confirm the tendency of the peptides of the retentate to associate to each other to form aggregates, the effects of pH and ionic strength on the solubility of the peptides were studied.

A strong insolubilization of the peptidic decolorized fraction of the retentate (without heme) was observed in the region close to pH 6 whereas peptides of the permeate did not precipitate whatever the pH (Fig. 3(a)). Salting out precipitations of the whole retentate, of the decolorized peptidic fraction of the retentate (without heme) and of the permeate were studied at pH 3 and pH 8 with NaCl concentrations up to 8 m (Fig. 3(b)). Peptides of the permeate remained soluble whatever the pH and the ionic strength. Salts reduce significantly the solubility of the peptidic fraction of the retentate: at acidic pH, precipitation was achieved from a NaCl concentration of 1 m, whereas at basic pH, precipitation was observed from 8 m. In the presence of heme the thresholds of precipitation of the peptides of the retentate (whole retentate) shifted towards low salt concentrations showing that heme makes peptide precipitation easier.

These results probably show that a part of the peptides of the hemoglobin hydrolysate are as soluble peptide aggregates which give insoluble aggregates at high ionic strength. To assess this hypothesis we performed a size-exclusion chromatography of the peptidic fraction of the retentate at pH 9 with a Sephadex G50 column (Fig. 4(a)). A large fraction was excluded from the gel exhibiting the presence of aggregates with molecular weight superior to 30 kDa. These aggregates were resistant to a 0.3% SDS (w/v) treatment (data not shown), but were dissociated

Table 1

Rejection of heme and peptides during ultrafiltration on 10 kDa modified polyethersulfone membranes (the transmembrane pressure was 10<sup>5</sup> Pa)

	Rejection coefficients		Peptides
	Heme		
	Without cyanide	With cyanide	
Peptic hydrolysate (5.1% protein, pH 8, 0.46 m <sup>2</sup> )	100%		40%
Decolorized retentate (4.7% protein, pH 8, 0.07 m <sup>2</sup> )			85%
Peptic hydrolysate (1% protein, pH 9.5, 0.07 m <sup>2</sup> )	100%	85%	
Hemin solution (0.04% hemin, pH 9.5, 0.07 m <sup>2</sup> )	100%	40%	

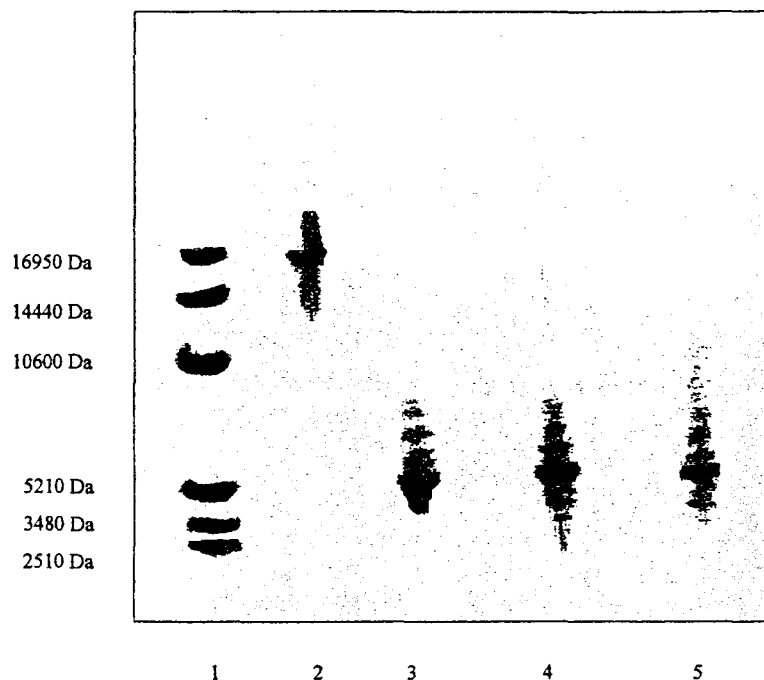


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: (1) reduced molecular mass markers; (2) bovine hemoglobin; (3) hemoglobin hydrolysate; (4) peptidic hydrolysate of the retentate; (5) permeate.

by 5 M guanidine chloride (Fig. 4(b)). In contrast, peptides of the permeate normally entered the gel (Fig. 4(c)) showing the absence of large aggregates. The dissociation of the peptidic aggregates by guanidine chloride suggests the existence of strong hydrophobic interactions between peptides of the retentate.

To confirm these hydrophobic interactions a reversed-phase chromatography of the peptides of the whole peptidic hydrolysate, of the retentate (after decolorization) and of the permeate was carried out (Fig. 5). It can be noticed that a peptidic population of

the whole hemoglobin hydrolysate was found again in the retentate and was eluted at high acetonitrile concentration with a weak resolution. This result shows, contrary to the peptides of the permeate which pass freely through the membrane, that strong hydrophobic interactions are probably involved between the peptides which are retained by the membrane.

In order to reinforce this hypothesis amino-acid compositions of the initial hemoglobin peptidic hydrolysate, of the retentate and of the permeate were determined (Table 2). The average hydrophobicities  $H\Phi_{ave}$  of the peptidic fractions were calculated using

Table 2

Amino-acid compositions and average hydrophobicity of peptidic fractions of the peptic hemoglobin hydrolysate, of the retentate and of the permeate

	Amino-acid compositions																	$H\Phi_{ave}$ (cal mol <sup>-1</sup> )	
	Asp <sup>a</sup>	Thr	Ser	Glu <sup>b</sup>	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Cys		Trp
Whole hydrolysate	6.3	3.9	5.6	10.1	3.8	10.4	11.7	9.5	1.3	0	10.5	1.8	4.3	6.4	8.7	3.1	2.6	nd	864
Retentate	6.6	4.8	4.9	10.1	4.9	9.5	9.8	10.8	1.4	0	11.4	1.4	6.6	5.0	7.8	3.1	1.4	nd	939
Permeate	6.7	4.9	7.8	10.1	5.3	10.7	14.0	8.7	1.5	0	8.7	2.0	3.7	6.5	6.4	2.1	0.8	nd	801

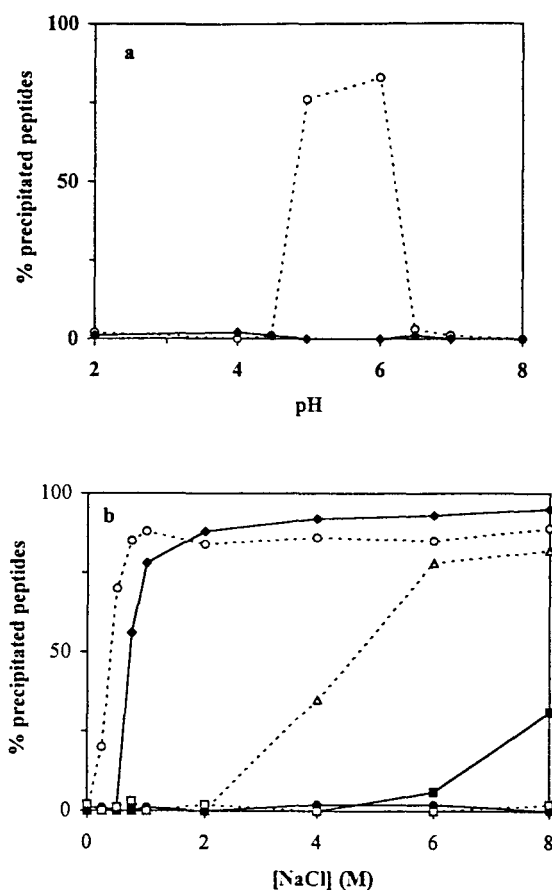


Fig. 3. Effect of pH and ionic strength on the solubility of the peptides of the retentate and of the permeate. (a) Effect of pH on the precipitation of the peptides of the retentate after decolorization (○) and of the permeate (◆). (b) Effect of NaCl at pH 3 on the precipitation of the peptides of the retentate, before (○) and after decolorization (◆), and of the permeate (●). Effect at pH 8 with retentate (Δ), decolorized retentate (■), and permeate (□).

the hydrophobicity scale of Bigelow [20]. It can be noticed, that after ultrafiltration, the retentate was enriched with hydrophobic amino-acids ( $H\Phi_{ave} = 939 \text{ cal mol}^{-1}$ ) contrary to the permeate ( $H\Phi_{ave} = 801 \text{ cal mol}^{-1}$ ) which contained more hydrophilic amino-acids.

### 3.3. Interaction of peptidic fractions with heme

We showed with the experiments on peptide solubility that in the presence of heme the salting out of the

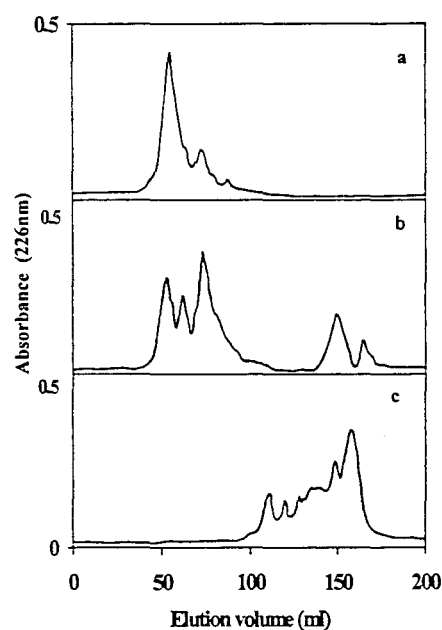


Fig. 4. Size exclusion chromatography of the decolorized peptidic hydrolysate on Sephadex G50 column: (a) Peptides of the retentate eluted by 40 mM borate buffer at pH 9. (b) Peptides of the retentate eluted by 5 M guanidinium chloride in 40 mM borate buffer at pH 9. (c) Peptides of the filtrate eluted by 40 mM borate buffer at pH 9. Column:  $2.5 \times 34 \text{ cm}$ . Flow-rate:  $15 \text{ ml h}^{-1}$ .

peptides of the retentate was more efficient. So we searched for interactions between heme and peptides. The interactions developed between heme and peptides were examined by hydrophobic interaction chromatography on hemin agarose. Elution of the decolorized peptidic fraction of the retentate and of the permeate was performed by a NaCl decreasing gradient in 0.04 M borate buffer at pH 8.5, then by 6 M urea in the same buffer (Fig. 6). In the presence of 3 M NaCl, a moderate “salting out” reagent which enhances proteins and peptides binding to hydrophobic matrix [21], peptides of the permeate were excluded from the gel suggesting that they could not interact with heme. On the contrary, in the same conditions, peptides of the retentate linked strongly to heme since the main peptidic fraction was only eluted by a 6 M urea concentration. Generally this denaturant agent interacts with the hydrophobic region of peptidic chains and could make heme-peptides dissociations easier.



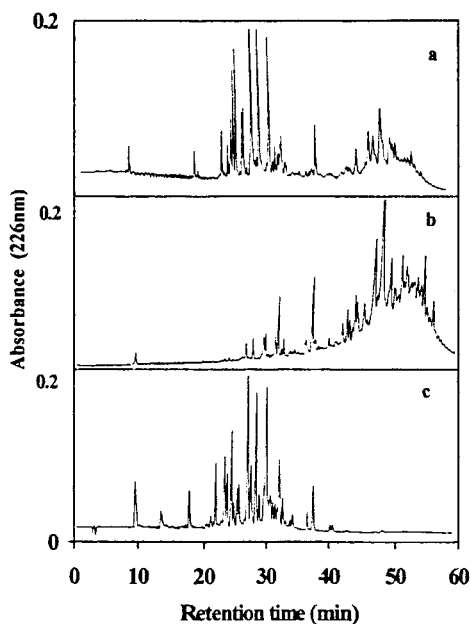


Fig. 5. RP-HPLC analyses of peptidic fractions: (a) of the whole hydrolysate, (b) of the retentate, and (c) of the filtrate on a C18 Vydac column (0.46×25 cm). The whole hydrolysate and peptidic hydrolysate of the retentate were decolorized. Solvent A: H<sub>2</sub>O, TFA 0.1% (v/v). Solvent B: Acetonitrile, TFA 0.05%. Elution: 0–60% B in 60 min. Flow-rate: 1 ml min<sup>-1</sup>. Detection: 226 nm. Samples: 200 µg in 100 µl solvent A.

In order to prove directly the ability of the peptidic population of the retentate to link to the heme; the decolorized peptidic fractions of the retentate and of

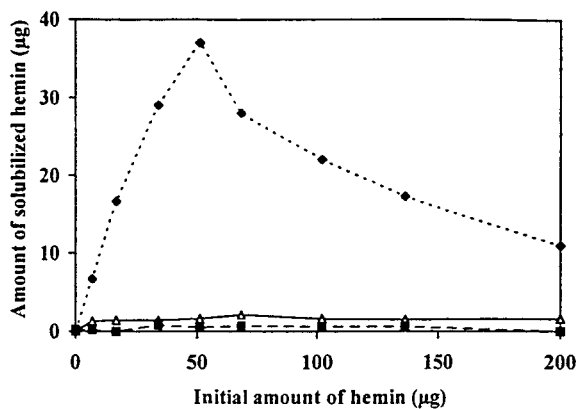


Fig. 7. Solubilization of hemin at acidic pH by the decolorized peptidic fractions (64 µg) of the retentate and peptides of the permeate. (◆) hemin—the peptidic fraction of the retentate, (△) hemin+the peptidic fraction of the permeate, and (■) hemin without peptidic fraction.

the peptides of the permeate were tried to be associated to form soluble heme–peptide adducts in aqueous solution at pH 2, where heme alone is insoluble. Hemin and the peptidic fraction were dissolved in a mixture of acetone and 20 mM HCl–KCl buffer at pH 2, then acetone was removed by vacuum evaporation. Hemin solubilization was determined for a constant amount of peptides (64 µg) and by increasing concentrations of hemin in the initial acetone–solvent buffer (Fig. 7). Peptides of the permeate do not solubilize hemin, but peptides of the retentate exhibit a

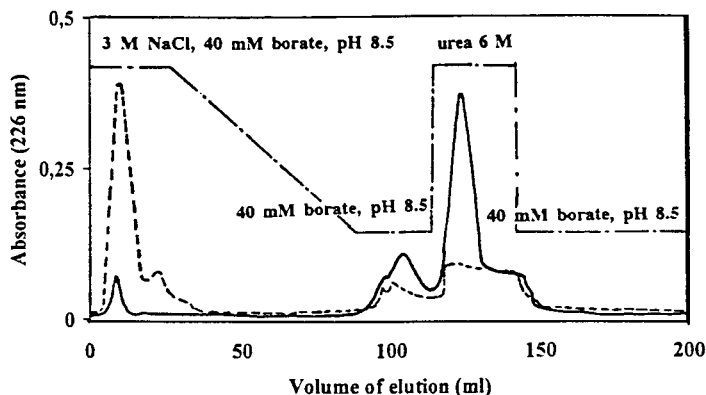


Fig. 6. Hydrophobic interaction chromatography of the decolorized peptidic fraction of the retentate (—) and of peptides of the permeate (---) on hemin-agarose. Elution by a linear gradient of NaCl in 40 mM borate buffer pH 8.5 from 3 M to 0 M, then by increasing urea to 6 M. Column: 0.56×5 cm. Injection of 6 mg of peptides in 250 µl. Flow-rate: 10 ml h<sup>-1</sup>.

strong solubilization capacity with an optimum hemin/peptide ratio of about 60% (w/w). For native hemoglobin, this ratio is about 4%. However, for initial amounts of hemin superior to 50  $\mu\text{g}$  the capacity of peptides to solubilize hemin decreases significantly. These results clearly show that the peptides of the hemoglobin hydrolysate which were retained by the membrane have a very high ability to bind to heme and solubilize it even at acidic pH.

#### 3.4. Effect of heme polymerization on heme retention

Several authors have already reported the polymerization of heme in aqueous solutions [22]. To examine the importance of this phenomenon in the explanation

of heme retentions, the effect of cyanide ion, a strong ligand of ferri-heme able to break these interactions, was tested on the ultrafiltration of the hemoglobin peptidic hydrolysate and on the pure hemin.

Ultrafiltrations were realized at pH 9.5 with 1% (w/v) hemoglobin hydrolysate or 0.04% (w/v) pure hemin (the same heme concentration as in the hydrolysate) on the 0.07  $\text{m}^2$  modified polyethersulfone membrane with, or without, an excess of KCN (Table 1). At this pH and this concentration, hemin was completely soluble but was totally retained by the membrane; addition of cyanide ions had a striking effect on heme passage since its rejection coefficient decreased to 40%. In the same ultrafiltration conditions, for the hemoglobin hydrolysate, heme retention was also

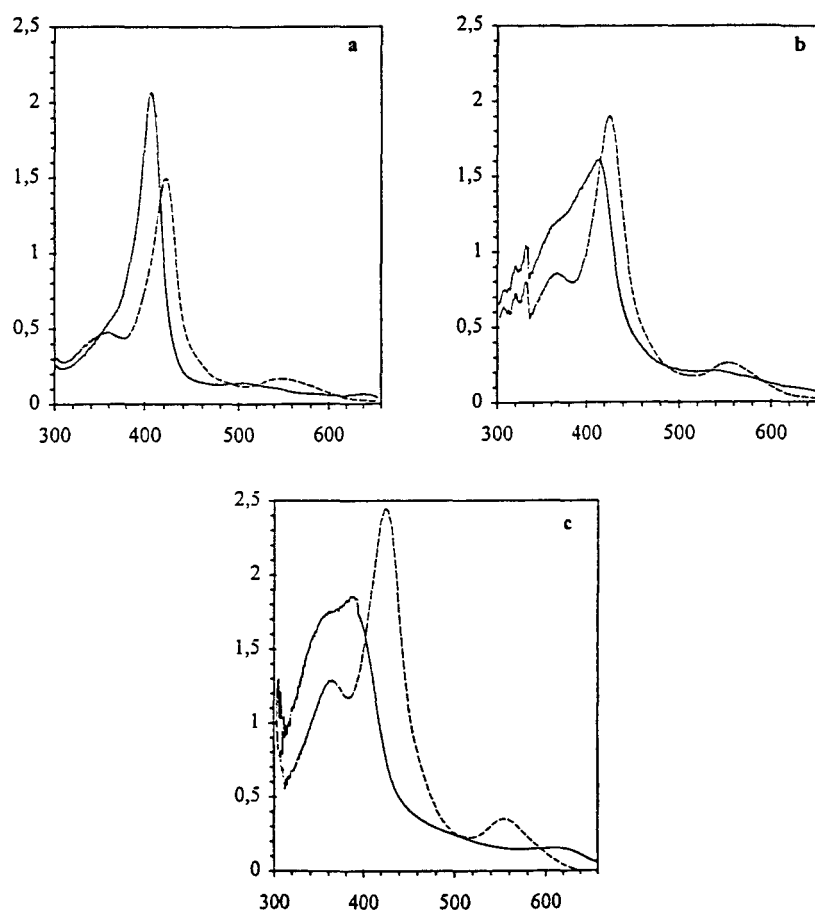


Fig. 8. UV/vis spectra of (a) hemoglobin, (b) hemoglobin peptic hydrolysate (c) and hemin at pH 9.5 in the absence (—) or in the presence of cyanide (- - -).

100% but the cyanide ions had only a moderate effect on heme passage since its rejection remained at 85%.

In order to prove the existence of heme–heme associations a study of the UV/vis spectra of the heme was realized. The UV/vis spectrum of hemin solution at pH 9.5 exhibited a prominent broad band centered near 370 nm (Fig. 8). This band was attributed to intermolecular heme–heme associations because porphyrins are known to polymerize in aqueous solutions [23]. By addition of cyanide ions, the iron (III) was converted to the low spin form as in native cyanoferric hemoglobin, the Soret band shifted to 422 nm and narrowed, showing the dissociation of heme polymers as monomers. In the case of hemoglobin hydrolysate the spectrum also showed a broad Soret band near 370 nm as in hemin solution, suggesting heme–heme associations, and a maximum at 408 nm indicative of heme monomers in the high spin state as in native ferric hemoglobin. Addition of exogenous cyanide, as for hemin solutions, narrowed and shifted the Soret band to 421 nm showing the dissociation of heme aggregates.

#### 4. Discussion

The very weak decline in flux observed during ultrafiltration of hemoglobin peptidic hydrolysate through modified polyethersulfone membranes shows that no significant fouling was involved in spite of an important retention of peptides and complete retention of heme. These retentions cannot be explained by the molecular sizes of heme and peptides in relation to the pore sizes of the polyethersulfone membranes because molecular weights of the peptides of the retentate and of the permeate were lower than 5 kDa. So it is likely that aggregation phenomena involving heme and peptides, allow to explain the retention observed for these molecules during ultrafiltration.

The existence of peptide aggregates in the hemoglobin hydrolysate, which were retained by the membrane, is evidenced by gel permeation chromatography which showed that the peptidic population of the retentate, even after removal of the heme was excluded from Sephadex G50 gel contrary to the peptides of the permeate which do not form aggregates. Moreover, a second ultrafiltration of this peptidic fraction after decolorization of the retentate did not

make peptide passage through the PES membrane easier since a rejection coefficient of about 85% was observed. These experiments show that the peptidic aggregates were not dissociated after heme elimination and that their origin are specific of the peptides. Moreover these interactions are strong since 5 M guanidine chloride was necessary to obtain their disruption. The hydrophobic origin of the interactions between peptides can be suspected by the propensity of the aggregates of the retentate to precipitate at high ionic strength and at pH 6, contrary to the peptides of the permeate. Effect of salts, as promoter of hydrophobic interactions leading to peptide precipitations, have already been reported for casein hydrolysates [24]. The hydrophobicity of the peptidic population of the retentate was confirmed by  $C_{18}$  reversed phase chromatography since these peptides were eluted at high solvent concentrations whereas peptides of the permeate seem more hydrophilic. Moreover amino acid compositions of the peptides of the retentate and of the permeate strengthen this conclusion as shown by their respective average hydrophobicities  $H\Phi_{ave}$  of 939 and 801 cal mol<sup>-1</sup>. To sum up, these results clearly indicate that in the hemoglobin peptidic hydrolysate, a population of hydrophobic peptides develops strong associations and aggregates irrespective of the presence of the heme, whereas another population of peptides in the same range of molecular weights but more hydrophilic remains individualized and freely passes through the membrane. These peptide–peptide interactions allow to explain the retention of peptides observed in the course of filtration of hemoglobin hydrolysate.

The complete retention of the heme could be explained if it was in the form of polymers too large to pass through the membrane as shown by complete retention of hemin in aqueous solution and dramatic decrease of its retention in the presence of cyanide ions. The effect of this ligand is far less important on hemoglobin hydrolysate for which heme retention remains very high (85%); however UV/vis spectra show that heme in hemoglobin hydrolysate is in the form of a mixture of monomers and polymers and that cyanide disrupts the heme–heme associations. So the high rejection coefficient of heme in the presence of cyanide during the filtration of hemoglobin hydrolysate could be explained by the formation of heme–peptides associations. These associations were

revealed, contrary to the peptides of the permeate, by the ability of the peptidic fraction of the retentate to solubilize heme at acidic pH and by the facilitating effect of heme on peptide precipitation at high ionic strength. The inability of peptides to solubilize high concentrations of heme could be explained by the formation of very high molecular weight heme polymers. Hydrophobic origin of these associations was evidenced by hydrophobic interaction chromatography on hemin agarose which exhibited the high affinity of retentate peptidic fraction for heme.

All these results show that hemoglobin peptidic hydrolysate is constituted of hydrophobic peptides largely associated in aggregate form which do not cross through the membrane and more hydrophilic peptides which do not give associations and freely pass through the membrane. Monomers and polymers of heme are linked to the hydrophobic peptidic aggregates, which allow to understand its complete retention. The effect of cyanide show that only a little amount of ferriheme is linked by coordination with functional groups of peptides, 15% of which can pass through the membrane in the presence of cyanide. However, we cannot exclude that more ligancies are involved between heme and peptides but that a hydrophobic environment inside peptide aggregates could hinder the ligand to accede to the iron. We have previously shown that peptides isolated from hemoglobin peptidic hydrolysate solubilize protoporphyrin IX at acidic pH, therefore in the absence of iron [25]. So it is very likely that most of heme-peptide associations in the hydrolysate can be attributed to hydrophobic interactions. The question of the cause of the formation of heme polymers and peptide associations which are organized in high molecular weight aggregates can be raised. Are these aggregates appearing during peptidic hydrolysis or during ultrafiltration? Chromatographic analyses (reverse phase, gel filtration and hydrophobic interaction), salting out studies and UV/vis spectra show that heme and peptide associations are present in the hemoglobin hydrolysate before ultrafiltration. However, we cannot exclude the possibility that further aggregations of heme and peptides are formed in the course of concentration step. Investigations are in progress to understand the mechanism of the heme-peptide aggregations during peptidic hydrolysis of bovine hemoglobin better.

## 5. Conclusions

The experimental data reported in this study clearly demonstrate that a 10 kDa molecular weight cut-off modified polyethersulfone membrane allows to concentrate and diafilter a hemoglobin peptidic hydrolysate without fouling phenomena and with a dramatic heme retention. This ultrafiltration process provides a soluble-heme enriched peptidic fraction useful in the context of the treatment of nutritional anemia. It allows to separate two populations of peptides: One containing amphiphatic peptides, useful in the solubilization of water-insoluble molecules as nutrient drugs; and another, mainly constituted of hydrophilic peptides. This study clearly shows that high retentions of heme, reported by several authors in the course of hemoglobin hydrolysate ultrafiltration, could be largely explained, without the requirement of heme and peptide-membrane interactions or fouling phenomena. The hydrophobic properties of the heme and of a part of the peptides give rise to associations which form large aggregates unable to cross the membranes. So further investigations on heme and peptide associations in the course of enzymatic hydrolysis of hemoglobin and ultrafiltration of its hydrolysates would be of great interest to understand the selectivities of membrane processes better. This topic is very important in the context of the valorization of bovine hemoglobin or other hemoproteins such as tuna myoglobin in fish industries.

Moreover this study goes beyond the case of hemoglobin since it shows that peptide retentions observed during ultrafiltration of peptidic hydrolysates, even without heme, are widely dependent on peptide aggregation. So these results could be taken into account for the selectivity of the ultrafiltration processes of other protein hydrolysates.

## References

- [1] S. Bouhallab, D. Mollé, J. Léonil, Tryptic hydrolysis of beta-casein in a membrane reactor: Preparation of bioactive peptide. *Biotechnol. Lett.* 14 (1992) 805–810.
- [2] A. Mannheim, M. Cheryan, Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor. *J. Food Sci.* 55 (1990) 381–385.
- [3] O.B. Henriques, R.B. De Deus, R.A.S. Santos. Bradykinin-potentiating peptides isolates from alpha-casein tryptic hydrolysates. *Biochem. Pharmacol.* 36 (1987) 182–184.

- [4] M. Cheryan, M.A. Mehaia, Membrane bioreactors, in: C.W. Mc Gregor (Ed.), Membrane Separations in Biotechnology, Marcel Dekker, New York, 1986, pp. 255–301.
- [5] A. Perea, U. Ugalde, Continuous hydrolysis of whey proteins in a membrane recycle reactor, *Enzyme Microb. Technol.* 18 (1996) 29–34.
- [6] A.B.P. Bryggerier, Hemiron-enriched amino acid preparation and a process for preparation of hemiron-enriched amino acid preparations from hemoproteins, Eur. Patent 0061556 (1982).
- [7] Mitsubishi Chemical Industry, Chocolate containing haemiron for treating anaemia, Japanese Patent 59 140 835 (1983).
- [8] J.M. Piot, D. Guillochon, D. Thomas, Preparation of decolorized peptides from slaughter house blood, *Mircen. J.* 2 (1986) 359–364.
- [9] J.M. Piot, D. Guillochon, D. Leconte, D. Thomas, Application of ultrafiltration to the preparation of defined hydrolysates of bovine hemoglobin, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 42 (1988) 147–156.
- [10] D. Dive, J.M. Piot, F. Sannier, D. Guillochon, P. Charet, S. Lutrat, Use of hemoglobin enzymic hydrolysates prepared on pilot plant scale, as a nitrogen source for the cultivation of three species of Tetrahymena, *Enzyme Microb. Technol.* 11 (1989) 165–169.
- [11] F. Sannier, J.M. Piot, P. Dhulster, D. Guillochon, Stability of a mineral membrane ultrafiltration reactor for a peptidic hydrolysis of hemoglobin, *Biotechnol. Technique* 7 (1994) 25–30.
- [12] W.H. Crosby, J.I. Munn, W. Furth, Standardizing a method for clinical hemoglobinometry, *US Armed forces Med. J.* 5 (1954) 693–703.
- [13] J. Adler-Nissen, Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysate by trinitro benzenesulfonic acid, *J. Agric. Food Chem.* 27(6) (1979) 1256–1262.
- [14] E. Antonini, M. Brunori, Preparation and some general properties of hemoglobin and myoglobin, in: A. Neuberger, E.L. Tatum (Eds.), Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands, North-Holland, Amsterdam, 1971, pp. 1–12.
- [15] E. Antonini, M. Brunori, Solution properties of myoglobin and hemoglobin, in: A. Neuberger, E.L. Tatum (Eds.), Hemoglobin and Myoglobin in their Reaction with Ligands, North-Holland, Amsterdam, 1971, pp. 98–134.
- [16] B.L. Anderson, R.W. Berry, A. Telser, A sodium-dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis system that separates peptides and proteins in the molecular range of 2500 to 90000, *Anal. Biochem.* 132 (1983) 365–375.
- [17] J.L. Stephano, M. Gould, L. Rojas-Galicia, Advantages of picrate fixation for staining polypeptides in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.* 152 (1986) 308–312.
- [18] Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Biological evaluation of protein quality, in: W. Hornitz (Ed.), Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 12th ed., Washington, DC, 1975, pp. 857–861.
- [19] B.A. Bidlingmeyer, S.A. Cohen, T.L. Tarvin, Rapid analysis of amino acids using precolumn derivatization, *J. Chromatogr.* 336 (1984) 93–104.
- [20] C.C. Bigelow, On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure, *J. Theoret. Biol.* 16 (1967) 187–211.
- [21] T. Arakawa, L.O. Narhi, Solvent modulation in hydrophobic interaction chromatography, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 13 (1991) 151–163.
- [22] H. Nishide, K. Mihayashi, E. Tsuchida, Dissociation of aggregated ferroheme complexes and protoporphyrin IX by water-soluble polymers, *Biochim. Biophys. Acta* 498 (1977) 208–214.
- [23] R. Margalit, M. Rotenberg, Thermodynamics of porphyrin dimerization in aqueous solutions, *Biochem. J.* 219 (1984) 445–450.
- [24] J. Léonil, D. Mollé, S. Bouhallab, G. Henry, Precipitation of hydrophobic peptides from tryptic casein hydrolysate by salt and pH, *Enzyme Microb. Technol.* 16 (1994) 591–595.
- [25] N. Cempel, J.M. Aubry, J.M. Piot, D. Guillochon, Isolation from bovine hemoglobin of a peptide that might be used as a potential hydrophobic photosensitizer carrier, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 21 (1995) 287–294.

---

**A3 : SOLUBILITY OF HEME IN HEME-IRON ENRICHED  
BOVINE HEMOGLOBIN HYDROLYSATES**  
(Journal of Agricultural and Food Chemistry)

---

Frédéric LEBRUN, Anne BAZUS, Pascal DHULSTER and Didier GUILLOCHON\*  
Laboratoire de Technologie des Substances Naturelles, IUT"A" Lille I,  
BP 179, 59653 Villeneuve d'Ascq Cedex. FRANCE

## Solubility of Heme in Heme-Iron Enriched Bovine Hemoglobin Hydrolysates

Frédéric Lebrun, Anne Bazus, Pascal Dhulster, and Didier Guillochon\*

Laboratoire de Technologie des Substances Naturelles, IUT "A" Lille I,  
B.P. 179, 59653 Villeneuve d'Ascq, Cedex, France

A heme-iron enriched peptidic hydrolysate was prepared from bovine hemoglobin, at pilot plant scale, by peptic hydrolysis followed by ultrafiltration. Such preparations are attractive for iron deficiency therapy and have been reported in the literature in the context of utilization of blood in the food industry. The peptidic fraction of this hydrolysate was able to solubilize heme in higher proportion than hemoglobin even at acidic pH where heme is totally insoluble. One peptide, having a similar ability to solubilize heme in the same range of pH, was isolated from this fraction and taken as a model to investigate the mechanisms involved in heme solubilization. Heme seemed to be mainly solubilized through hydrophobic interactions with the peptide, whereas ligand or electrostatic interaction could not be demonstrated. The stoichiometry of heme-peptide adducts depends on pH with a 2:2 association at pH 2 between heme as a dimer and two peptides and with a 2:1 association at pH 7.5 between one dimer and one single peptide. However, the existence of higher molecular weight aggregates cannot be excluded in the whole hemoglobin hydrolysate. Despite the good solubility of heme and the high heme/protein ratio, such heme enriched peptidic hydrolysates could have a weak bioavailability since heme polymerization is known to decrease heme-iron intestinal absorption. Further studies will be necessary to reduce heme polymerization during enzymatic hydrolysis of bovine hemoglobin.

**Keywords:** *Globin hydrolysate; heme-iron; hydrophobic interaction; iron deficiency*

### INTRODUCTION

Iron deficiency is known to be one of the most common nutritional disease, and several millions of people are classified as iron deficient. The highest prevalence is in developing countries where the most frequent causes are poor iron bioavailability from the predominantly cereal diets and blood loss due to parasitic infestations. In the industrialized countries, iron anemia occurs among people having large iron requirements due to growth as infants, fetal demands as pregnant women, or iron loss as menstruating women and adolescent girls (Carpenter and Mahoney, 1992). Ferrous sulfate is widely used to prevent and treat anemia. However, common side effects of this therapy include nausea, epigastric discomfort, abdominal cramps, constipation, and diarrhea. For these reasons, new iron-based preparations are needed that are both well absorbed and tolerated.

Another source of iron is heme-iron, which is found in the diet as myoglobin or hemoglobin. Hemoglobin iron is assimilated better than iron salts (Turnbull et al., 1962; Callender et al., 1957), and many studies have shown that absorption of heme-iron is not dependent upon dietary composition (Conrad et al., 1967) and produces little side effects (Frykman et al., 1994). Peptides produced by proteolytic digestion of hemoglobin or other dietary proteins would maintain heme in a soluble form so that it would remain available for absorption (Uzel and Conrad, 1998).

In animal blood, hemoglobin accounts for more than

half of the blood proteins and 90% of the cell fraction proteins. Most of the slaughterhouse hemoglobin remains an agricultural waste product and could be, in the future, an inexpensive source of heme-iron for developed and developing countries. Numerous researchers have attempted to prepare hemoglobin heme-iron. Whole hemoglobin was successfully used in cookies or as pills to alleviate childhood iron deficiency (Walter et al., 1994; Mitsubishi, 1987). The low proportion of iron in hemoglobin limits its use in treatment of iron deficiency. Many patents pertain to the development of processes to produce pure heme from hemoglobin based on treatments with acids (Autio et al., 1983), organic solvents (Luijckx, 1983; Lindroos, 1981), or proteases (Mitsubishi Chemical Industry Co., 1983). Insoluble heme preparations were obtained and often added to chocolate for treating anemia. However, the bioavailability of such products seems to be largely affected by the high polymerization of the heme in the gastrointestinal tract (Carpenter and Mahoney, 1992; Reinzenstein, 1990), and their insolubility in water limits their applications.

Another approach to overcome these problems is to prepare heme-iron peptidic hydrolysates from hemoglobin by enzymatic hydrolysis followed by ultrafiltration to accumulate heme-iron enriched fractions (Erikson, 1981; Lebrun et al., 1998). These heme-enriched hydrolysates have a higher iron content than hemoglobin, and their iron complexed with peptides. Limited data, however, are available regarding the water solubility of these heme-peptide complexes. There is the question

\* To whom correspondence should be addressed [fax (33) 3 20 43 44 72; e-mail LTSN@univ-lille1.fr].

of whether the origin of the heme-peptide interactions can be manipulated to improve their nutritional applications.

This paper describes the preparation of a soluble peptic hydrolysate enriched in heme-iron from bovine hemoglobin. The hydrolysates were studied, regarding the mechanisms involved in the heme solubilization and the nature of the interactions between heme and peptides. A peptide was isolated by HPLC and identified by amino acid analysis and mass spectrometry, and heme-peptide interactions were characterized at acidic and slightly basic pH. The heme was mainly linked with peptides through hydrophobic interactions. This study has some interest in the context of the utilization of bovine hemoglobin, an agricultural byproduct, for the prevention of anemia.

## MATERIALS AND METHODS

First, the method to prepare the heme-iron enriched bovine hemoglobin hydrolysate at the pilot plant scale is described. A decolorization method of the hemoglobin hydrolysate was performed to compare solubility of heme in the hydrolysate with that of the peptidic fraction. Reversed-phase HPLC, mass spectrometry, and amino acid analysis were used to isolate, identify, and characterize a peptide of this fraction. A method to evaluate the ability of the peptide to solubilize hemin is described. Interaction of the peptide and hemin were studied by UV-vis difference spectrometry and fluorescence spectrometry. A model based on a simple equilibrium between the peptide and hemin as a monomer or as a dimer was used to estimate dissociation constants of the complexes.

**Preparation of the Heme-Iron Enriched Hemoglobin Hydrolysate.** Centrifuged bovine red cells were provided by Veos n.v. (Zwevezele, Belgium). Hemoglobin hydrolysate was prepared at pilot plant scale as previously reported (Lebrun et al., 1998). Hemoglobin solution was prepared by hemolysing 1 vol of erythrocytes with 3 vol of 10 mM HCl. Hemoglobin concentration was determined according to the cyanmethemoglobin method (Crosby et al., 1954). Eighty liters of hemolysate at 50 g/L was brought to 40 °C in a thermostated reactor (Inceltech LH.SGI, Toulouse, France), and pH was adjusted to 4 with 4 M HCl. The enzymic digestion was started by the addition of porcine pepsin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) at an enzyme/protein ratio of 1.4% (w/w). The pH was maintained at 4 by the addition of 4 M HCl using a pH stat (Inceltech LH.SGI). After 24 h, the hemoglobin hydrolysate was clarified by centrifugation, and pepsin was inactivated by raising the pH to 8 with concentrated NaOH. The degree of hydrolysis determined by the trinitrobenzene sulfonate method (Addler-Nielsen, 1979) was 11%. Seventy liters of clarified hemoglobin hydrolysate was reduced to 35 L by ultrafiltration with a transmembrane differential pressure of  $10^5$  Pa. The retentate was then diafiltered with 3 vol of water. The heme/peptide ratio in the heme-iron enriched retentate was up to 7% (w/w), i.e., more than twice as high as in hemoglobin. Molecular masses of the peptides determined by urea-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis according to the method of Anderson et al. (1983) were about 4–5 kDa. The enriched heme-iron hydrolysate was collected and spray-dried.

**Decolorization of the Peptidic Hemoglobin Hydrolysate.** The resolubilized heme-iron enriched hydrolysate powder was decolorized with acetone at acidic pH (Antonini and Brunori, 1971). The hemoglobin hydrolysate was treated at 20 °C with acetone containing 2–3 mL of 2 N HCl/L. Twenty milliliters of the 3–5% (w/v) heme-iron peptidic hydrolysate was gradually added with vigorous stirring to about 250 mL of the acetone solution. Heme was solubilized in acetone, and the precipitated peptidic fraction was collected by centrifugation and freeze-dried as a peptidic powder.

**Study of the Solubility of Heme and Peptide.** The enriched heme-iron hydrolysate (peptide, 50 mg/mL; heme, 0.35 mg/mL), the decolorized peptidic fraction (50 mg/mL), or

pure hemin (0.35 mg/mL) was solubilized in 4 mL of 50 mM NaOH. The pH of the solution was adjusted to the appropriate pH (2–12) with diluted HCl. The solutions were shaken and centrifuged at 5000g for 20 min. The volume of the supernatant was readjusted to 4 mL with water. Aliquots of each sample were assayed for heme content according to the pyridine hemochromogen method (Paul et al., 1953).

**Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography.** Purification of the peptide from the decolorized peptidic hemoglobin hydrolysate was performed by reversed-phase HPLC on a semipreparative C18 column (250 mm × 10 mm.; particle size 5  $\mu$ m) (Vydac, Hesperia, CA). Peptidic samples were dissolved in eluent A (5 mg/mL), filtered through a 0.2  $\mu$ m pore-size filter, and injected into the column. Peptides were eluted at 3.5 mL/min with a gradient of 0.1% (w/v) trifluoroacetic acid in water as eluent A and acetonitrile with 0.1% TFA as eluent B. A linear gradient from 19% to 50% B was carried out in 124 min. Peptides were monitored at 226 nm. The peptidic fraction was collected and freeze-dried.

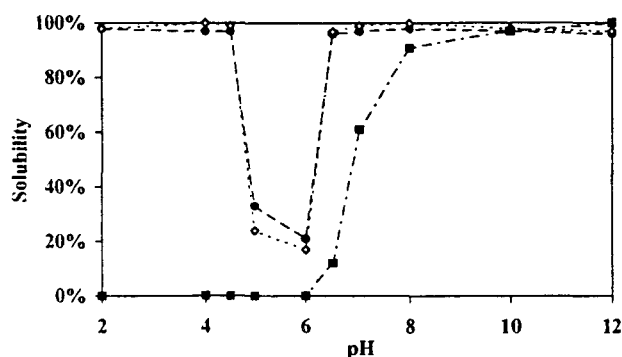
**Mass Spectrometry of the Peptide.** Dried peptidic sample was dissolved at a concentration of 20 pmol/ $\mu$ L in a solution containing 20% (v/v) acetonitrile and 0.1% (v/v) formic acid in water and a 10  $\mu$ L sample was injected into a carrier solvent of the same composition. Ion spray mass spectra were recorded with a single-quadrupole mass spectrometer (Perkin-Elmer, Thornhill, Canada) equipped with an ion spray (nebulizer-assisted electrospray) source (Sciex, Toronto, Canada). The solutions were continuously infused with a medical infusion pump (model 11, Harvard Apparatus, South Natick, MA) at a flow rate of 5  $\mu$ L/min. Polypropylene glycol was used to calibrate the quadrupole. Ion spray mass spectra were acquired at unit resolution by scanning from *m/z* 400 to *m/z* 1800 with a step size of 0.1 Da and a dwell time of 2 ms. The potential of the spray needle was held at 4.5 keV, and the spectra were recorded at an orifice voltage of 60 V. Calculation of the molecular masses of the samples was performed on a Mac Bio Spec computer program.

**Amino Acid Analysis.** Amino acid composition of the peptide was determined using a Picotag Work Station (Waters, Milford, MA). Peptide (5  $\mu$ g) hydrolysis was carried out with constant boiling HCl (containing 1% phenol) for 24 h at 110 °C. Precolumn derivatization of amino acids with phenylisocyanate and HPLC separation of derivatized amino acids on a RP-Picotag column (150 mm × 3.9 mm) (Waters) were performed according to the method described by Bidlingmeyer et al. (1984). Absorbance was measured at 254 nm using a Waters model 455 detector.

**Solubilization of Hemin by the Peptide at Acidic pH.** The peptide was dissolved in 2 mL of a mixture containing 75% (v/v) acetone and 25% (v/v) 50 mM HCl-KCl pH 2 buffer. Two milliliters of this mixture containing hemin (Sigma, St. Louis, MO) was added to the 2 mL peptide solution. Final concentration of the peptide was 4  $\mu$ M. Final concentrations of hemin were varied from 0  $\mu$ M up to 12  $\mu$ M. Acetone was removed by vacuum evaporation. The insoluble residues were discarded by centrifugation (5000g for 15 min). To determine the amounts of soluble heme-peptide complex; the volume of the resultant solution was adjusted to 4 mL with acetone, and its absorbance was measured at 385 nm. A calibration curve was determined with free hemin in the same acetone-buffer mixture.

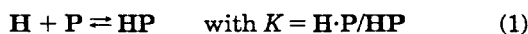
**UV-Visible Difference Spectrometry.** Hemin was dissolved in 0.1 M sodium hydroxide at a concentration of 2 mM. The hemin solution was further diluted to 9.8  $\mu$ M with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. Difference spectra were recorded on a lambda 5 spectrophotometer (Perkin-Elmer). Five microliter increments of a peptide solution (1.95 mM in the Tris-HCl buffer) were added to the 3 mL sample cell (final peptide concentrations were varied from 3.2 to 44.8  $\mu$ M), while equivalent volumes of buffer were added to the reference cell. After each addition, the difference spectrum was recorded. Absolute spectra were recorded at the beginning and at the end of each experiment.





**Figure 1.** Solubility of heme and peptides as a function of pH. (◇) Heme of the enriched heme-iron hydrolysate; (■) pure hemin; (●) peptidic fraction of the hydrolysate after removing heme. Solubility is expressed in percentage of heme or peptides solubilized at a given pH in comparison with the initial amount solubilized in 50 mM NaOH.

**Evaluation of the Dissociation Constants of Hemin–Peptide Complexes.** A simple equilibrium may be represented by



where **H**, **P**, **HP**, and **K** are respectively the concentrations at the equilibrium of hemin as a dimer (or heminCN as a monomer), peptide, hemin–peptide complex, and its dissociation constant. Considering that **H**<sub>0</sub> and **P**<sub>0</sub> are respectively the total concentration of heme (as a dimer or as a monomer) and peptide in the solution, the dissociation constant can be written from eq 1 as  $K = (\text{H}_0 - \text{HP})(\text{P}_0 - \text{HP}) / \text{HP}$ . Since in our experimental conditions **P**<sub>0</sub> is not much larger than **H**<sub>0</sub>, the Eadie Scatchard representation is not appropriate, and we must calculate the concentration of hemin–peptide **HP** complex as a function of **H**<sub>0</sub> and **P**<sub>0</sub>:

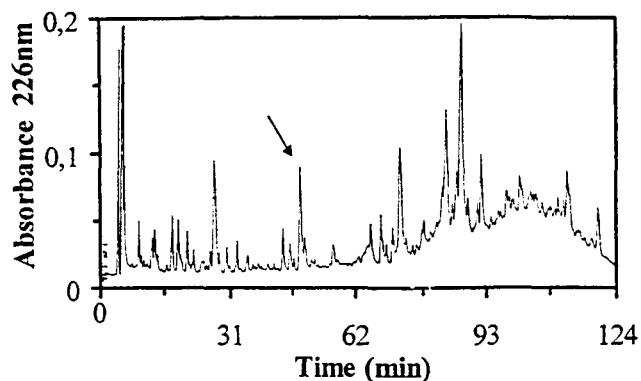
$$\text{HP} = [(K + \text{H}_0 + \text{P}_0) - ((K + \text{H}_0 + \text{P}_0)^2 - 4\text{H}_0\text{P}_0)^{1/2}] / 2 \quad (2)$$

By measuring the changes in absorbance,  $\Delta A$ , at 417 nm of the difference spectra corresponding to variable concentrations of the peptide (from 3.2 to 44.8  $\mu\text{M}$ ) for a constant hemin concentration (9.8  $\mu\text{M}$  as a monomer or 4.9  $\mu\text{M}$  as a dimer),  $\Delta A / \Delta A_{\text{max}}$  can be determined, where  $\Delta A_{\text{max}}$  is the maximal change of absorbance corresponding to complete binding of hemin. Then  $\Delta A / \Delta A_{\text{max}} = \text{HP} / \text{H}_0$  and from eq 2, we can write the following:  $\Delta A = \Delta A_{\text{max}} [(K + \text{H}_0 + \text{P}_0) - ((K + \text{H}_0 + \text{P}_0)^2 - 4\text{H}_0\text{P}_0)^{1/2}] / 2\text{H}_0$ . As it is difficult to estimate  $\Delta A_{\text{max}}$ , a quasi-Newton fitting algorithm with two unknown constants (**K** and  $\Delta A_{\text{max}}$ ) was used to fit our experimental results ( $\Delta A$ , **P**<sub>0</sub>, and **H**<sub>0</sub>).

**Fluorescence Spectrophotometry.** Fluorescence spectra of the tryptophan containing peptide were measured at a constant 5  $\mu\text{M}$  peptide concentration, and hemin concentration was varied from 0 to 5  $\mu\text{M}$ . Excitation was performed at 280 nm. The fluorescence emission spectra of the peptide were monitored between 300 and 400 nm on a LS 50B spectrofluorimeter (Perkin-Elmer).

## RESULTS

**Heme Solubility in the Heme Enriched Hemoglobin Hydrolysate.** Comparison of the solubility of the heme alone as hemin and of the heme as a hemoglobin hydrolysate was achieved between pH 2 and pH 12. As described in Figure 1, pure hemin was only soluble above pH 8, whereas in the same conditions heme in the form of hemoglobin hydrolysate remained soluble in a large range of pH (2–12), except around pH 5.5, which corresponds to the precipitation of the peptides of the decolorized hemoglobin hydrolysate. These precipitations probably correspond to the mean

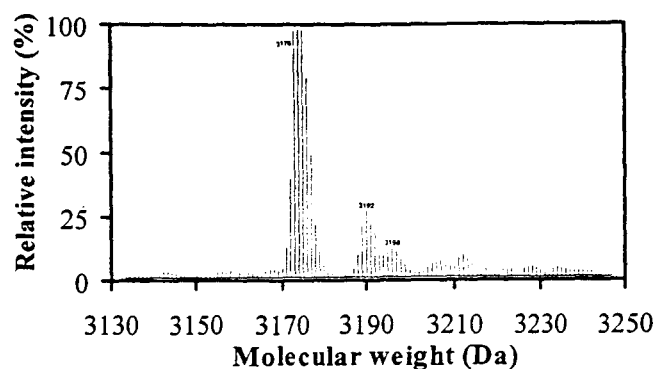


**Figure 2.** Semipreparative RP-HPLC separation of the selected peptide. The decolorized heme-iron hemoglobin hydrolysate was chromatographed on a Vydack (250 mm × 10 mm) C18 column. Solvent A, TFA 0.1% in H<sub>2</sub>O. Solvent B, acetonitrile with 0.1% TFA. Gradient, 19–50% B in 124 min. Flow rate, 3.5 mL/min. The arrow indicates the selected peptide.

isoelectric pH of the peptides. Several authors (Léonil et al., 1994; Erickson, 1981) have already observed these precipitations and explained them by a decrease of the charge of the peptides and the formation of hydrophobic interactions. These results clearly prove that, inside the hemoglobin hydrolysate, heme was solubilized through interactions with the peptidic fraction, especially at acidic pH where hemin alone is completely water-insoluble. To understand better the mechanism of the heme solubilization and the origin of the heme–peptide interactions in this heterogeneous peptidic hydrolysate, a peptide able to solubilize heme in the same pH range as the whole heme enriched hydrolysate was isolated to study its interaction with heme.

**Isolation of a Peptide from the Heme Enriched Hemoglobin Hydrolysate.** In the course of ultrafiltration of the peptic hemoglobin hydrolysate, numerous peptides passed through the membrane. Reversed-phase chromatography showed that this peptidic fraction is more hydrophilic than that of the retentate; moreover, it did not solubilize heme (Lebrun et al., 1998). A semipreparative reversed-phase chromatography of the heme enriched fraction of the retentate was performed on a C18 column (Figure 2). At small retention times, the chromatogram exhibited a good resolution of the peptides. At high retention times, the chromatogram exhibited a poor resolution in the most hydrophobic range, despite a real effort in chromatography optimization. A size exclusion chromatography study showed that an important part of the peptides was excluded from a G50 Sephadex column, proving the formation of peptide–peptide associations that were disrupted only with strong dissociating agents such as 5 M guanidine chloride (Lebrun et al., 1998). Such associations have already been reported by Liu et al. (1996) with high molecular weight peptides of globin hydrolysates prepared from porcine hemoglobin. For the following study and to avoid further peptide–peptide associations that could disturb the study of hemin–peptide interactions, we selected a peptide in the well-resolved hydrophobic fraction, among most the abundant peptides to make its purification at the preparative scale easier. The chosen peptide was eluted at 30.8% acetonitrile, collected, freeze-dried, and analyzed by electrospray ionization mass spectroscopy.

The transferred ion spray mass spectrum of the peptide (Figure 3) showed a large peak at 3176 Da. The



**Figure 3.** Transformed ion spray mass spectrum of the selected peptide. The peptide was dissolved at a concentration of 20 pmol/ $\mu$ L in a solution containing 20% (v/v) acetonitrile and 0.1% (v/v) formic acid in water, 10  $\mu$ L was injected into a carrier solvent of the same composition.

**Table 1. Amino Acid Composition and Deduced Molecular Mass of the Selected Peptide from Pepsic Bovine Hemoglobin Hydrolysate<sup>a</sup>**

amino acid composition of the peptide												
Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Met	Leu	Phe	Lys	Arg	Trp
7	6.7	14	13.7	15.7	15.8	11	2.8	10	4.1	8.5	5.8	nd

<sup>a</sup> Amino acid composition is expressed as g of amino acid/100 g of total amino acids. Deduced molecular weight, 3179 Da.

presence of the smaller peaks were consistent with probable oxidation for the 3192 Da peak and with the formation of sodium salts corresponding to the peak at 3198 Da.

In bovine hemoglobin structure, the mass of the selected peptide (3176 Da  $\pm$  1) may correspond to three amino acid sequences:  $\alpha$  (Thr<sub>67</sub>-Pro<sub>95</sub>),  $\beta$  (Met<sub>1</sub>-Leu<sub>30</sub>), and finally  $\beta$  (Met<sub>74</sub>-Asn<sub>101</sub>). Identification of the peptide was acquired from the amino acid analysis. The molecular mass (3179 Da) deduced from amino acid composition (Table 1) was close to that determined by mass spectroscopy (3176 Da), demonstrating the purity of the isolated peptide and indicating the following sequence, which represents fragment 1–30 of the primary structure of bovine hemoglobin  $\beta$  chain:

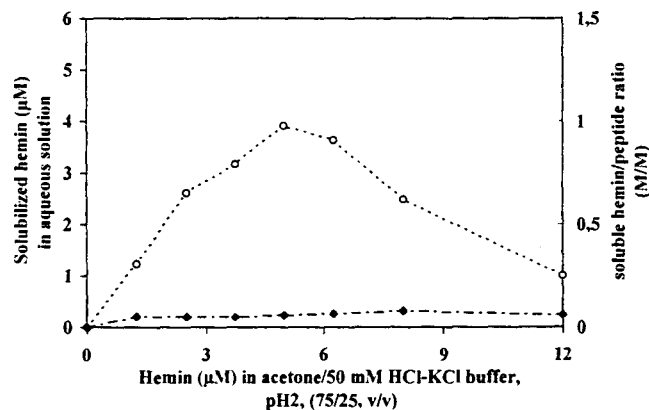
<sup>1</sup>Met-Leu-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys-Ala-Ala-<sup>10</sup>Val-Thr-Ala-Phe-Trp-Gly-Lys-Val-Lys-Val-<sup>20</sup>Asp-Glu-Val-Gly-Gly-Glu-Ala-Leu-Gly-Arg-<sup>30</sup>Leu

In the bovine hemoglobin conformation, this sequence consists of two  $\alpha$ -helical regions, helix I [Thr<sub>3</sub>-His<sub>18</sub>] and helix II [Asp<sub>20</sub>-Leu<sub>30</sub>], which are connected by a hinge amino acid, Val<sub>19</sub>. Schematic ribbon drawing of the peptide is shown in Figure 4. The average hydrophobicity  $H\Phi_{ave}$  of the peptide (905 cal/mol) calculated according to the method of Bigelow (1967) was similar to that calculated for the whole hydrolysate (939 cal/mol).

**Solubilization of Heme by the Pure Peptide.** The ability of the peptide to solubilize heme in aqueous solution was studied with hemin at acidic pH for which free hemin is not soluble. Hemin and peptide were solubilized in a water-acetone solvent (25/75, v/v) at pH2. Acetone was removed by vacuum evaporation, and hemin remaining in solution was determined. Hemin solubilizations were carried out, for a constant peptide concentration (4  $\mu$ M) in the water-acetone solvent, by increasing hemin concentrations up to 12  $\mu$ M. As seen in Figure 5, the concentration of water-soluble hemin increased as a function of the initial concentration of



**Figure 4.** Schematic ribbon drawing of the selected peptide. This figure is drawn by the RAS MOL program from the spatial conformation of bovine hemoglobin  $\beta$  chain.



**Figure 5.** Solubilization of hemin by the peptide at pH 2 as a function of hemin concentration. Hemin concentration was varied from 0 to 12  $\mu$ M, for a constant 4  $\mu$ M peptide concentration in the acetone/HCl buffer mixture (75/25, v/v). (O) Hemin solubilization by the peptide; (◆) blank (hemin without peptide).

hemin in the water-acetone solvent. The maximal solubilization of hemin was obtained for hemin-peptide ratio near 1:1 (mol/mol), whereas free hemin at the same conditions was totally insoluble.

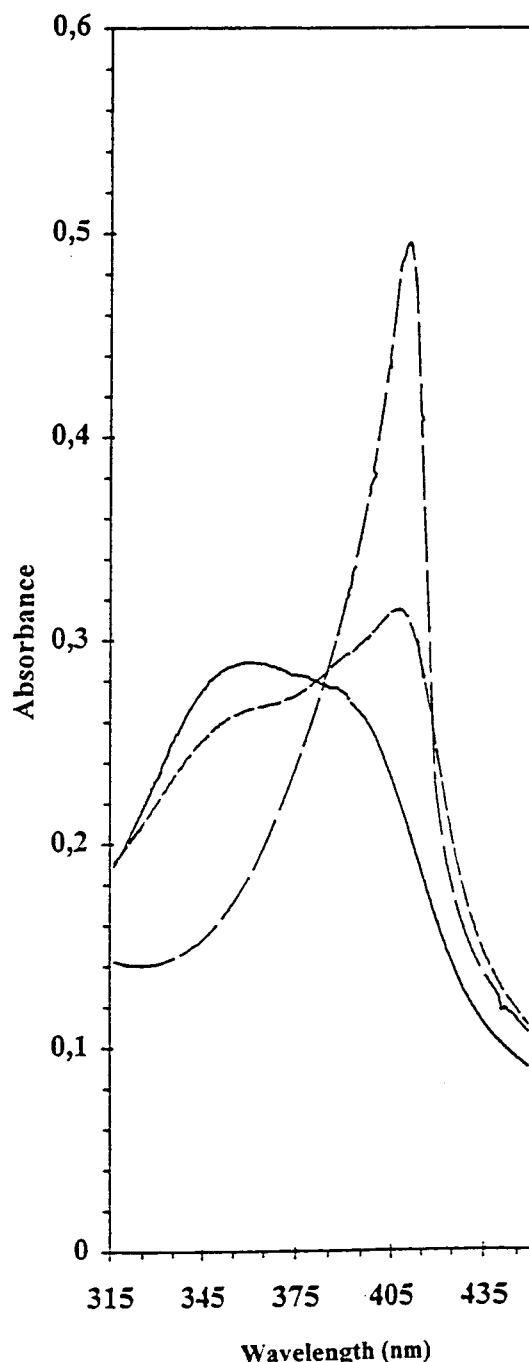
For a hemin concentration higher than 5  $\mu$ M in the water-acetone solvent, the ability of the peptide to solubilize hemin dramatically decreased, and hemin was practically water-insoluble from a 3:1 hemin-peptide ratio. These results clearly show that this pure peptide alone, isolated from the heme enriched peptidic hydrolysate, can solubilize heme very efficiently in aqueous solutions with an apparent stoichiometry of 1:1. At this proportion the heme-peptide ratio expressed as weight is 20%, whereas it is only 7% in the heme enriched peptidic hydrolysate. So, in a first approach, the

interactions of this peptide with heme could be representative of the heme-peptide interactions occurring with the peptides that carry heme in solution in the hydrolysate. We have undertaken to study the mechanism of heme solubilization of this peptide in aqueous solution.

**Study of Heme-Peptide Interactions.** The study of the heme-peptide interactions by UV-visible spectrometry in aqueous solution at acidic pH is not possible because hemin is insoluble, and the formation equilibrium of the heme-peptide complex cannot be studied. So, this study was carried out at pH 7.5 for which heme and peptide are both soluble. The UV-vis spectrum of hemin at pH 7.5 in 50 mM Tris-HCl exhibited a broad Soret band centered at 363 nm (Figure 6). This band was attributed to intermolecular heme-heme associations because porphyrins are known to polymerize in aqueous solutions (Margalit and Rotenberg, 1984). In a mixture of ethylene glycol/50 mM Tris-HCl, pH 7.5 (50% v/v), the Soret band shifted to 417 nm and narrowed, showing the dissociation of heme polymers to monomers. By addition of the peptide to hemin solution at a molar heme-peptide ratio of 1:4 in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, the Soret band shifted from 363 to 417 nm with a shoulder remaining at 363 nm. This shift could be due to heme-peptide interactions. The same spectrum was observed with the whole heme enriched hemoglobin hydrolysate (data not shown).

The peptide contains a tryptophan residue (at the 14th position) that can be used as a fluorescent marker of the heme-peptide interaction. To confirm these interactions, the wavelength of the fluorescence emission maximum of the peptide (5  $\mu\text{M}$ ) in the absence and in the presence of increasing concentrations of hemin (1–5  $\mu\text{M}$ ) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, buffer was measured (Figure 7). The wavelength of the fluorescence emission maximum of the peptide alone was 356.5 nm. In the presence of hemin, a slight blue shift about 5 nm can be observed in the emission maximum at a heme-peptide ratio of 1:1 and a decrease of the emission intensity. This blue shift typically occurs when tryptophan enters a more hydrophobic environment (Cajal et al., 1996). The decrease of the emission intensity can be probably assigned to the reabsorption of the light by hemin added to the medium. Thus, it is difficult to study in detail the heme-peptide interaction by fluorescence spectroscopy.

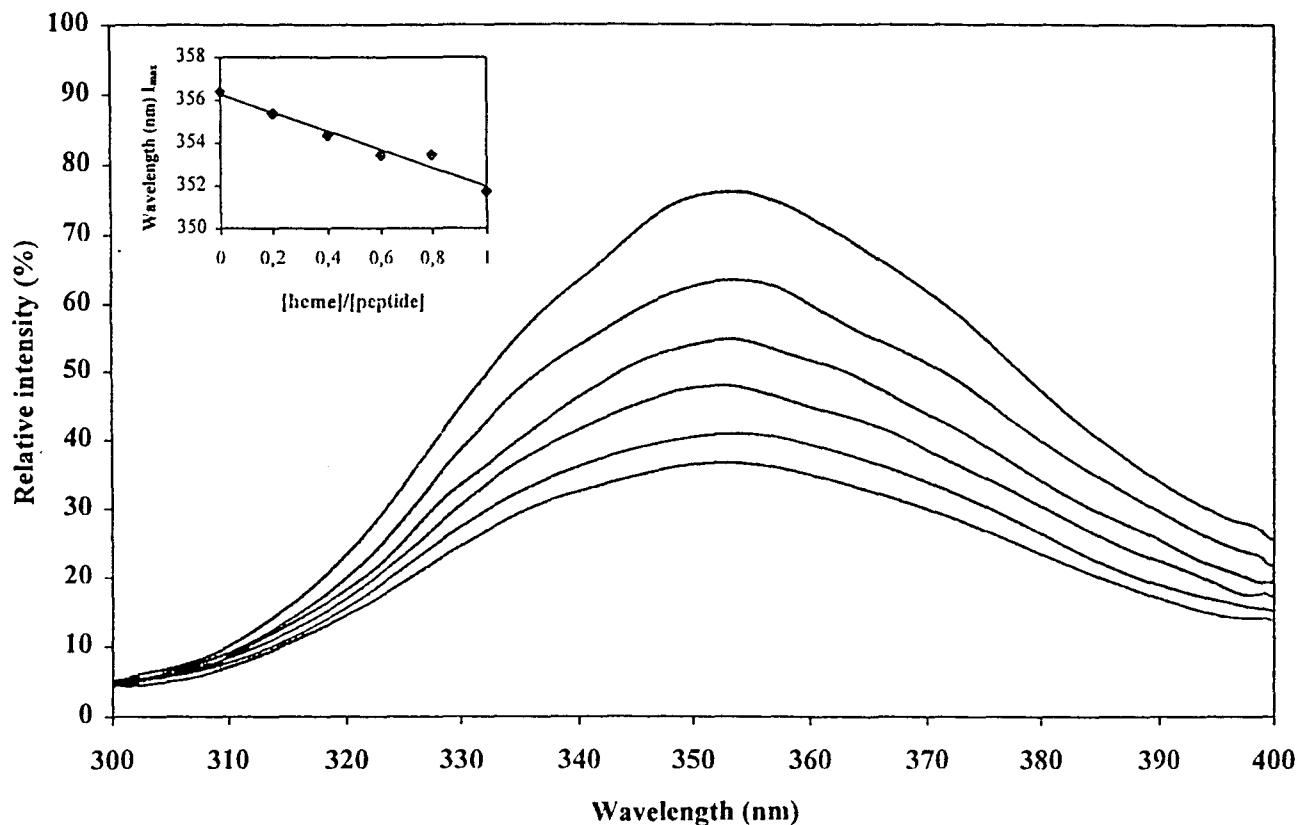
To characterize these interactions better, difference absorption spectrophotometry was used. Difference spectra for heme-peptide associations at pH 7.5 vs heme alone as a function of peptide concentrations are shown in Figure 8. The difference spectra clearly exhibited defined isobestic points with a trough at 363 nm and a peak at 417 nm. This result shows the existence of an association equilibrium between hemin and peptide in aqueous solution at pH 7.5. To test the role of the iron in the heme-peptide interaction, difference spectra were performed by addition of the peptide to heminCN (Figure 9). The difference spectra, as in the case of hemin in absence of ligand, showed defined isobestic points, which proved that an association equilibrium between hemin and peptide was involved even when the iron binding sites were liganded. On the other hand, no significant difference spectrum was observed (Figure 10) when the peptide was added to a hemin solution in a mixture of ethylene glycol and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 (50% v/v).



**Figure 6.** UV-vis spectra of hemin. (—) Hemin in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5; (---) hemin-peptide complex in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5; (- -) hemin in a mixture containing 50% (v/v) 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, and 50% (v/v) ethylene glycol.

## DISCUSSION

Heme solubility as a function of pH is directly related to the solubility of the peptides as shown by the solubility curve of the peptidic fraction after removing of heme (Figure 1) and the very weak solubility of both heme and peptides observed at the isoelectric pH. Moreover, the peptide of 30 amino acids isolated from the hemoglobin hydrolysate exhibited a high ability to solubilize hemin at acidic pH with a heme peptide ratio of 1:1 (mol/mol). Study of the interaction of this peptide with hemin would allow for a better understanding of how heme is solubilized in heme enriched hemoglobin hydrolysate. Further developments of hemoglobin pro-



**Figure 7.** Displacement of the fluorescence emission maximum of the tryptophan containing peptide during heme-peptide association. Conditions: 5  $\mu$ M peptide; 0–5  $\mu$ M hemin in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 22  $^{\circ}$ C; excitation wavelength: 280 nm. Insert: Shift of the emission maximum as a function of the heme/peptide ratio ( $r^2 = 0.996$ ).

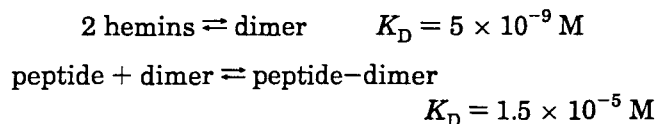
duced by various processes and hydrolysates for prevention or treatment of iron deficiency will depend on an improvement of the understanding of the peptide-heme interactions that are in relation to the bioavailability of heme-iron.

The question of the stoichiometry of the heme-peptide complex can be raised. Ferriheme is known to form aggregates in aqueous solution, even for weak concentrations (Brown and Shillock, 1976; Leclerc et al., 1993). An equilibrium dissociation constant of  $5 \times 10^{-9}$  M was reported for the dimerization of heme at pH 7.7 by Bakes et al. (1986). In our conditions, at pH 7.5 and for a hemin concentration of 9.8  $\mu$ M, with the same dissociation constant, more than 98% of hemin would be in the form of dimers (i.e., about 4.9  $\mu$ M as a dimer). The UV-visible spectrum of hemin at pH 7.5 (Figure 6) confirms the existence of heme-heme associations by exhibiting a broad Soret band centered near 362 nm. In the presence of ethylene glycol, a breaker of hydrophobic interactions, the spectrum was consistent with that of monomeric heme with a tight Soret band and an absorption maximum at 417 nm. In the presence of peptide at a molar peptide-heme ratio of 4:1 (mol/mol), the Soret maximum shifted to 417 nm, but the Soret band remained very broad with a shoulder at 362 nm (Figure 6). This shift could be assigned to a partial dissociation of heme aggregates to monomers due to the peptide; but even for a large excess of peptide, the aspect of the Soret band remained unchanged. So we can assume that the changes observed in the hemin spectrum by addition of peptide could be explained by a peptide-dimer interaction.

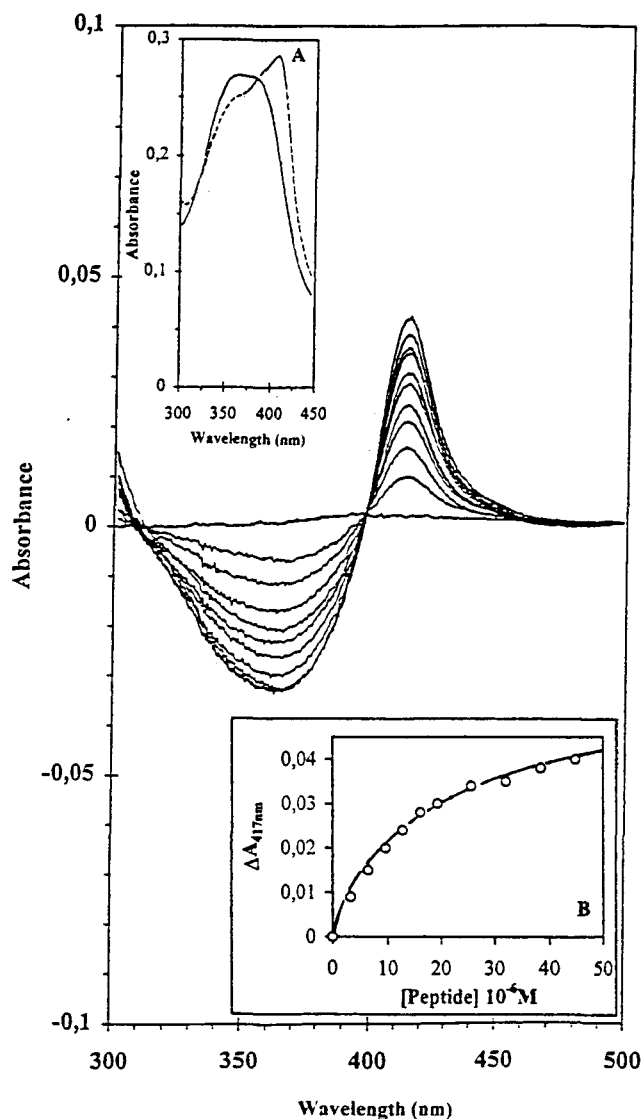
The difference spectra observed in the course of the interaction of the peptide with hemin in aqueous solution

at pH 7.5 could be explained by a simple equilibrium between the peptide and hemin as a dimer. A good fitting of the data ( $r^2 > 0.99$ ) was obtained with this assumption, and a dissociation constant of  $1.5 \times 10^{-5}$  M was estimated (Figure 8, insert B). For the interaction between heminCN, which is in the form of a monomer, and Masporan, a 14 amino acid peptidic toxin, a very close value was reported by Leclerc et al. (1993) with a dissociation constant of  $10^{-5}$  M.

We can summarize the formation of the peptide-hemin complex at pH 7.5 as

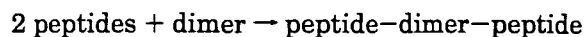
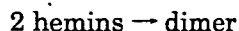


Consequently, in aqueous solution at pH 7.5, the peptide-hemin ratio in the complex would be 1:2 (mol/mol). The formation of hemin-peptide adducts at pH 2 by the acetone method led to complete solubilization of hemin up to only a peptide-hemin ratio of 1:1 (mol/mol) in the water-acetone solvent; for higher ratios, hemin was not completely solubilized, and a part of hemin precipitated with the peptide (data not shown). Moreover, the UV-visible spectrum of peptide-hemin adducts at pH 2 exhibited a broad Soret band (result not shown) showing that hemin was in the form of dimers. Consequently, at acidic pH, to explain these results, we must assume the formation of peptide-heme associations with the 2:2 stoichiometry (mol/mol). The peptide-dimer association (peptide-hemin ratio of 1:2, mol/mol) would not be formed or would not be water soluble in acidic medium

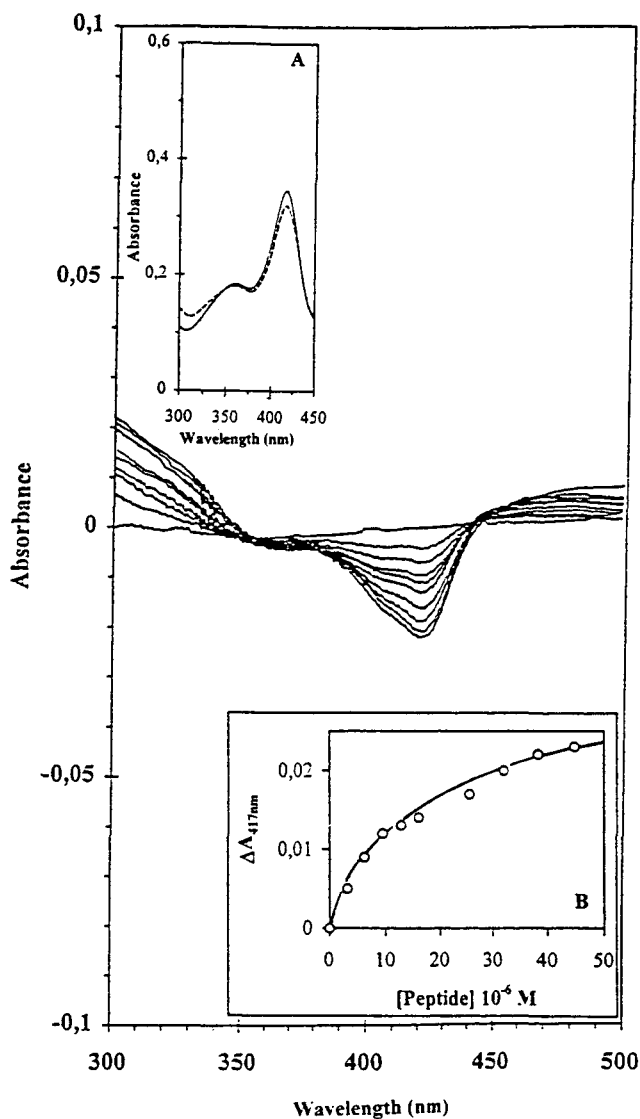


**Figure 8.** Difference spectra resulting from peptide-hemin interactions. Peptide was diluted to a stock concentration of 1.95 mM in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. 5  $\mu$ L increments were added to the 3 mL sample cuvette containing the hemin solution (9.8  $\mu$ M in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5), while equivalent volumes of the same buffer were added to the reference. The final peptide concentration ranged from 3.2 to 44.8  $\mu$ M. Insert (A): Absolute spectra of the hemin solution before addition of peptide (—) and after the last addition of peptide (---). Insert (B): Optical titration of the peptide at 417 nm.

contrary to basic medium:



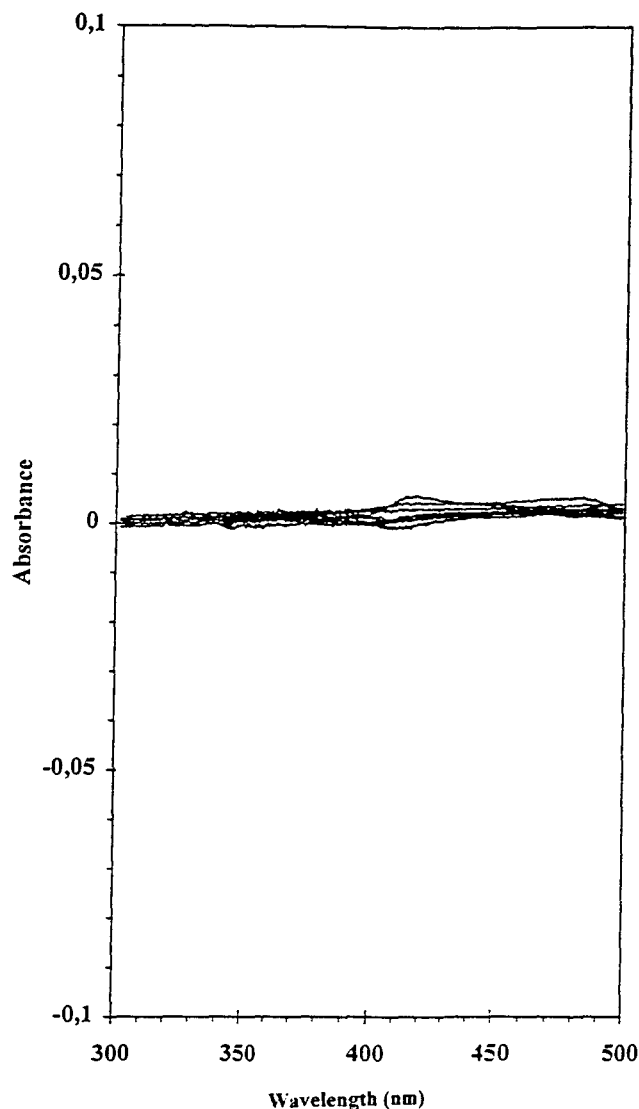
Since it was possible to study the equilibria of peptide-hemin associations in aqueous solution at acidic pH, we cannot affirm that the peptide-heme adducts obtained by the acetone method were representative of the associations existing in the heme enriched hemoglobin hydrolysate, although UV-visible spectra of heme were practically identical. Moreover, at high heme concentrations, heme-heme associations could lead to higher aggregation states than dimers both at acidic and at basic pH. In the same way, peptide-peptide associations could be involved for high peptide concentrations. Venkatesh et al. (1996) have reported a micellization process forming peptide aggregates at a critical micellar concentration of  $9 \times 10^{-5}$  M for a pentapeptide.



**Figure 9.** Difference spectra resulting from peptide-hemin-CN interactions. Conditions were the same as in Figure 8.

As a rule, the nature of the interactions involved in heme-peptide associations inside the heme enriched hemoglobin hydrolysate depends largely on the structure of each peptide. On one hand, ionized amino groups of the peptides could develop electrostatic interactions with the carboxylic groups of the propionic side chains of the heme. On the other hand, amino acids such as histidine, tyrosine, or cysteine could act as ligands toward heme-iron (Benson et al., 1995). Finally, peptides could bind heme through van der Waals and hydrophobic interactions between aromatic or saturated aliphatic groups and the macrocyclic core of heme (Leclerc et al., 1993; Venkatesh et al., 1996).

The peptide we have isolated was able to solubilize heme very efficiently, even at pH 2 where heme is totally insoluble. However, this peptide cannot develop efficient electrostatic interactions since at pH 2 it is positively charged and heme is neutral whereas, at pH 7.5, both heme and peptide are negatively charged. On the other hand, the lack of iron ligand on the side chains (His, Tyr, Cys, ...) makes unlikely ligancies. The study of the equilibrium between the peptide and heminCN (which is in the form of a monomer) by difference spectrometry allows us to confirm that heme-peptide associations did not occur through a direct interaction



**Figure 10.** Difference spectra resulting from the addition of the peptide to hemin in the mixture of 50% Tris-HCl buffer and 50% ethylene glycol (v/v). Conditions were the same as in Figure 8.

with the iron. As a matter of fact, we can estimate with a good fitting that the dissociation constant of the peptide-heminCN complex would be  $1.7 \times 10^{-5}$  M (Figure 9, insert B). This value is practically identical to that of peptide-hemin complex ( $1.5 \times 10^{-5}$  M) in which hemin is in the form of dimer. Moreover, we can exclude the displacement of a strong ligand as cyanide ion by a group from a side chain.

Both structural considerations and experimental results evidence the predominant role of the hydrophobic interactions in the formation of the heme-peptide complexes. The selected peptide with an average hydrophobicity of 905 cal/mol is an amphiphilic molecule allowing both hydrophobic interactions between apolar peptide groups and the tetrapyrrolic macrocycle and interactions between water molecules and polar peptide groups. The position of this helical peptide in the hemoglobin conformation, which contracts interactions both toward the solvent and inside the protein (Figure 4), allows us to understand better its ability to solubilize hydrophobic molecules. The hydrophobic nature of these interactions is clearly demonstrated by the suppression of the heme-peptide interactions at pH 7.5 in the presence of ethylene glycol as shown by the differ-

ence spectra studies (Figure 10). Moreover the shift of the fluorescence emission maximum of the tryptophan toward shorter wavelengths might indicate that this amino acid was involved in the hydrophobic associations.

## CONCLUSION

In this study, we have described the water solubility of heme at acidic and basic pH in an heme enriched hemoglobin hydrolysate prepared by enzymatic hydrolysis and ultrafiltration at pilot plant scale. A pure peptide able to solubilize heme in the same conditions as the whole hemoglobin hydrolysate was isolated and taken as a model to investigate the mechanism of heme solubilization in such heterogeneous peptidic hydrolysates. We have proved that heme is mainly solubilized by hydrophobic interactions with the peptide and that ligand or electrostatic interactions are not necessary. The stoichiometry of heme-peptide adducts depends on pH. At acidic pH for which heme alone is completely insoluble, the association between heme as dimer and two peptides seems likely whereas, at basic pH, heme dimer would be linked to one peptide. However, we cannot exclude the formation of high molecular weight aggregates or micelles, particularly for higher heme and peptide concentrations or in the whole heme enriched hemoglobin hydrolysate. Even if it is difficult to understand the heme-peptide stoichiometry in the whole hemoglobin hydrolysate, the UV-visible spectrophotometric study shows, as for the isolated peptide, that heme is in the form of dimer or higher state of aggregation. So, despite the high heme-iron-protein ratios and heme solubility of the heme enriched hemoglobin hydrolysates reported in the literature, the transport of heme as heme-heme adducts is not in favor of a good bioavailability of these preparations for treatment or prevention of iron deficiency because heme polymerization is known to decrease heme-iron intestinal absorption (Conrad et al., 1966; Reizenstein, 1980). Studies are now being carried out in our laboratory to prevent heme-heme adduct formation in the course of enzymatic hydrolysis of bovine hemoglobin.

## LITERATURE CITED

- Adler-Nissen, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.* **1979**, *27* (6), 1256-1262.
- Anderson, B. L.; Berry, R. W.; Telser, A. A sodium-dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis system that separates peptides and proteins in the molecular range of 2 500 to 90 000. *Anal. Biochem.* **1983**, *132*, 365-375.
- Antonini, E.; Brunori, M. Solution properties of myoglobin and hemoglobin. In *Hemoglobin and myoglobin in their reaction with ligands*; Neuberger, A., Tatum, E. L., Eds.; North-Holland: Amsterdam and London, 1971; pp 98-134.
- Autio, K.; Kiesvaara, M.; Mulki, Y. A method for dividing blood hemoglobin into heme and globin. International Patent 83 03 198, 1983.
- Backes, W. L.; Turner, J. L.; Heimann, T. G.; Canady, W. J. Association of hydrophobic substances with hemin, characterization of the reverse type I binding spectrum and its relationship to cytochrome P-450. *Biochem. Pharmacol.* **1986**, *35* (24), 4443-4448.
- Benson, D. R.; Hart, B. R.; Zut, X.; Doughty, M. B. Design, Synthesis and circular dichroism investigation of a peptide-sandwiched mesoheme. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (33), 8502-8510.

- Bidlingmeyer, B. A.; Cohen, S. A.; Tarvin, T. L. Rapid analysis of amino acids using precolumn derivatization. *J. Chromatogr.* **1984**, *336*, 93-101.
- Bigelow, C. C. On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure. *J. Theor. Biol.* **1967**, *16*, 187-211.
- Brown, S. B.; Shillcock, M. Equilibrium and Kinetic studies of the aggregation of porphyrins in aqueous solution. *Biochem. J.* **1976**, *153*, 279-285.
- Cajal, Y.; Rabanal, F.; Alsina, M. A.; Reig, F. A fluorescence and CD study on the interaction of synthetic lipophilic hepatitis B virus pre S (120-145) peptide analogues with phospholipid vesicles. *Biopolymers* **1996**, *28*, 607-618.
- Callender, S. T.; Mallett, B. J.; Smith, M. D. Absorption of hemoglobin iron. *Brit. J. Haematol.* **1957**, *3*, 186-192.
- Carpenter, C. E.; Mahoney, A. W. Contribution of heme and non heme iron to human nutrition. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1992**, *31* (4), 333-366.
- Cempel, N.; Aubry, J. M.; Piot, J. M.; Guillochon, D. Isolation from bovine hemoglobin of a peptide that might be used as a potential hydrophobic photosensitizer carrier. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1995**, *21*, 287-294.
- Conrad, M. E.; Cortell, S.; Williams, H. L.; Foy, A. L. Polymerization and intraluminal factors in the absorption of hemoglobin iron. *J. Lab. Clin. Invest.* **1966**, *68*, 659-668.
- Conrad, M. E.; Benjamin, B. I.; Williams, H. L.; Foy, A. L. Human absorption of hemoglobin iron. *Gastroenterology* **1967**, *53*, 5-10.
- Crosby, W. H.; Munn, J. I.; Furth, W. Standardizing a method for clinical hemoglobinometry. *U.S. Armed Forces Med. J.* **1954**, *5*, 693-703.
- Erickson, C. Heme-iron enriched amino acid preparation and a process for the preparation of heme-iron enriched amino acid preparations from hemoproteins. European Patent No. 00 61 556, 1981.
- Frykman, E.; Bystrom, M.; Jansson, U.; Edberg, A.; Hansen, T. Side effects of iron supplements in blood donors; Superior tolerance of heme iron. *J. Lab. Clin. Med.* **1994**, *123* (4), 561-564.
- Lebrun, F.; Bazus, A.; Dhulster, P.; Guillochon, D. Influence of molecular interactions on ultrafiltration of a bovine hemoglobin hydrolysate with an organic membrane. *J. Membr. Sci.* **1998**, *146* (1), 113-124.
- Leclerc, E.; Leclerc, L.; Poyart, C.; Marden, C. M. Interaction of heme with amphiphilic peptides: Use of hemin-CN to probe the interaction of calmodulin with its target peptides. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *306* (1), 158-162.
- Léonil, J.; Mollé, D.; Bouhallab, S.; Henry, G. Precipitation of hydrophobic peptides from tryptic casein hydrolysate by salt and pH. *Enzyme Microb. Technol.* **1994**, *16*, 591-595.
- Lindross, P. Heme concentrate and method for the preparation. International patent No. 81 02 834, 1981.
- Liu, X. Q.; Yonekura, M.; Tsutsumi, M.; Sano, Y. Physicochemical properties of aggregates of globin hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44* (10), 2957-2961.
- Luijterink, J. H. Process for the manufacture of globin or blood cell protein and heme from hemoglobin. European Patent No. 0068537, 1983.
- Margalit, R.; Rottenberg, M. Thermodynamics of porphyrin dimerization in aqueous solutions. *Biochem. J.* **1984**, *219*, 445-450.
- Mitsubishi Chemical Industry Co. Preparation of chocolate containing heme-iron used in treating anemia. Japanese Patent No. 59 140 834, 1983.
- Mitsubishi Chemical Industry Co. Pill composition containing heme or hemoglobin with coating or shellac, used as dietary supplement for supplying iron. Japanese Patent No. 62 036 320, 1987.
- Paul, K. G.; Theorell, H.; Akeson, A. The molar light absorption of pyridine ferroprotoporphyrin (pyridine haemochromogen). *Acta Chem. Scand.* **1953**, *7*, 1284-1287.
- Reizenstein, P. Hemoglobin fortification of food and prevention of iron deficiency with heme iron. *Acta Med. Scand. Suppl.* **1980**, *629*, 1-46.
- Siengenber, D.; Baynes, R. D.; Bothwell, T. H.; Macfarlane, B. J.; Lamparelli, R. D.; Car, N. G.; Macphail, P.; Schmidt, U.; Tal, A.; Maryet, F. Ascorbic acids prevents the dose-dependent inhibitory effect of polyphenols and phytates on non-heme-iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* **1991**, *53*, 537-545.
- Turnbull, A.; Cleton, S.; Flinch, C. A. Iron absorption. IV The absorption of hemoglobin iron. *J. Clin. Invest.* **1962**, *41*, 1897-1907.
- Uzel, C.; Conrad, M. E. Absorption of heme iron. *Semin. Hematol.* **1998**, *35* (1), 27-35.
- Venkatesh, B.; Jayakumar, R.; Pandian, R. P.; Manoharan, P. T. Surface active peptide-mediated porphyrin aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *223*, 390-396.
- Walter, T.; Hertrampf, E.; Pizzaro, F.; Olivares, M.; Laguno, S.; Letelier, A.; Vega, V.; Stekel, A. Effect of bovine-hemoglobin-fortified cookies on iron status of school children: a nation wide program in Chile. *Am. J. Clin. Nutr.* **1993**, *57*, 1990-1994.

Received for review May 28, 1998. Revised manuscript received September 29, 1998. Accepted October 2, 1998.

JF9805698

