

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

# THÈSE

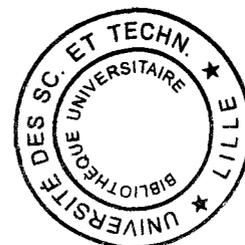
présentée par

**Elisabeth KOSCIARZ**

pour l'obtention du grade de

**Docteur de l'Université de Lille I**

DANS LA SPÉCIALITÉ: GÉNIE ENZYMATIQUE,  
BIO-CONVERSION ET MICROBIOLOGIE



MODIFICATION DE LA SÉLECTIVITÉ DE LA RÉACTION  
PROTÉOLYTIQUE EN PHASE HÉTÉROGÈNE. ORIENTATION  
DE L'HYDROLYSE DE L'HÉMOGLOBINE VERS LA  
PRODUCTION DE PEPTIDES TRANSPORTEURS DE  
PORPHYRINES. CARACTÉRISATION D'UN COMPLEXE  
PEPTIDE-PROTOPORPHYRINE IX.

Soutenue le 4 Juin 1999 devant le Jury composé de :

Stéphane Bouquelet	Président
Jean-Marc Laval	Rapporteur
Philippe Debeire	Rapporteur
Didier Guillochon	Directeur de thèse
Dominique Vercaigne	Examineur



*Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au Laboratoire de Technologie des Substances Naturelles sous la direction du Professeur Didier Guillochon, que je tiens à remercier pour m'avoir accueilli dans son laboratoire ainsi que pour m'avoir guidé et encadré au cours de cette thèse.*

*J'associe à ces remerciements Madame Dominique Vercaigne, Maître de Conférences à l'IUT "A" de Lille I, qui a codirigé ce travail.*

*Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur Jean-Marc Laval Professeur à l'Université de Technologie de Compiègne, ainsi que Monsieur Philippe Debeire chargé de recherche à l'INRA de Reims, pour avoir accepté de rapporter sur cette thèse, et pour leurs critiques constructives.*

*Que Monsieur Stéphane Bouquet, Professeur à l'Université de Lille I, veuille bien trouver ici l'expression de toute ma gratitude pour avoir accepté de juger ce travail et de présider cette thèse.*

*Je suis très reconnaissante au Professeur J.P Huvenne et à Monsieur Cyril Ruckebush (L.A.S.I.R. de Lille I) pour leur aide en spectrométrie IR-TF.*

*J'adresse également tous mes remerciements aux membres du Laboratoire ainsi qu'à ceux qui en sont déjà parti pour leur aide, leur gentillesse et leur bonne humeur.*

*Enfin, je tiens à remercier Brigitte Delrue et Serge Bielawski pour leur soutien et leur aide précieuse. Que mes parents et amis soient convaincus de ma reconnaissance pour leurs encouragements et leurs soutien.*



# Table des matières

<b>Introduction</b>	<b>7</b>
---------------------	----------

<b>Rappels bibliographiques</b>	<b>13</b>
---------------------------------	-----------

1	Modification de la sélectivité de protéases . . . . .	13
1.1	Modification de la sélectivité en milieux purement aqueux . . .	13
1.2	Modification de la sélectivité en milieu hydro-organique . . . .	14
1.3	Modification de la sélectivité en milieu organique . . . . .	15
2	Le transport des porphyrines hydrophobes en milieu aqueux . . . . .	17
3	Les peptides anti-bactériens . . . . .	19
4	Rappels sur la structure des protéines employées . . . . .	24
4.1	L'hémoglobine bovine . . . . .	24
4.2	Les protéases . . . . .	27

<b>I Préparation et caractérisation d'un peptide amphiphile à partir d'un hydrolysat pepsique</b>	<b>29</b>
---	-----------

<b>1 Matériel et méthodes</b>	<b>33</b>	
1	Obtention des hydrolysats . . . . .	35
2	Chromatographie d'échange d'ions . . . . .	35
3	CLHP de phase inverse . . . . .	36
4	Electrodialyse . . . . .	36
5	Préparation des solutions de protoporphyrine IX . . . . .	36
5.1	Solutions de porphyrine en milieux aqueux . . . . .	37
5.2	Solutions de PPIX en milieu organique . . . . .	37
5.3	Solubilité de la PPIX dans différents tampons et milieux organiques . . . . .	38
6	Méthode de formation du complexe . . . . .	38
7	Chromatographie d'exclusion . . . . .	39
8	Préparation des liposomes . . . . .	40
8.1	Mesure de la concentration en lipides des liposomes . . . . .	40
9	Détermination du pourcentage de lyse des liposomes . . . . .	42
10	Analyse des peptides par spectrométrie de masse en désorption laser .	42
10.1	Principe de la désorption laser . . . . .	43

10.2	Conditions opératoires . . . . .	43
11	Méthodes spectroscopiques . . . . .	44
11.1	Spectroscopie de différence en UV-visible . . . . .	44
11.2	Spectroscopie de fluorescence . . . . .	44
11.3	Spectroscopie Infra-Rouge à transformée de Fourier . . . . .	44
<b>2</b>	<b>Préparation et caractérisation du peptide 1-23<math>\alpha</math></b>	<b>47</b>
1	Isolement et préparation du peptide 1-23 $\alpha$ . . . . .	49
2	Caractérisation du peptide 1-23 $\alpha$ en solution . . . . .	52
2.1	Etat d'agrégation du peptide . . . . .	52
2.2	Structure en solution . . . . .	54
3	Interactions du peptide 1-23 $\alpha$ avec des liposomes . . . . .	56
4	Obtention et caractérisation de solutions de protoporphyrine . . . . .	58
4.1	Solubilisation de la PPIX en milieu aqueux . . . . .	59
4.2	Solubilisation de la PPIX en milieu hydro-organique . . . . .	62
5	Formation et caractérisation du complexe peptide 1-23 $\alpha$ -porphyrine . . . . .	66
5.1	Détermination de la capacité de fixation de la PPIX par le peptide 1-23 $\alpha$ . . . . .	66
5.2	Etat de la porphyrine dans le complexe . . . . .	68
5.3	Etudes des interactions dans le complexe . . . . .	70
6	Etude des interactions de la PPIX avec des liposomes . . . . .	75
6.1	Mise en évidence des interactions de la porphyrine avec les liposomes . . . . .	76
6.2	Calcul de la constante d'association . . . . .	77

## II Modification de la sélectivité de la réaction protéolytique en phase hétérogène 81

<b>1</b>	<b>Matériels et Méthodes</b>	<b>85</b>
1.1	L'hémoglobine . . . . .	87
1.1.1	Préparation . . . . .	87
1.1.2	Dosage par la méthode de Drabkin . . . . .	87
1.2	Les protéases . . . . .	87
1.2.1	Dosage de l'activité de la chymotrypsine avec un substrat synthétique . . . . .	88
1.2.2	Dosage de l'activité de l'endoprotéinase Glu-C avec un substrat synthétique . . . . .	88
1.3	Le support . . . . .	88
1.4	Conditions d'hydrolyse . . . . .	89
1.4.1	Hydrolyse de l'hémoglobine en phase homogène . . . . .	89
1.4.2	Hydrolyse de l'hémoglobine en phase hétérogène . . . . .	89
1.5	Dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl. . . . .	90
1.6	Dosage du SDS. . . . .	91
1.7	CLHP analytique . . . . .	92
1.7.1	CLHP analytique en gradient de solvants . . . . .	92
1.7.2	CLHP analytique en conditions isocratiques . . . . .	94

1.7.3	Détection des acides aminés aromatiques, et calcul des rapports molaires . . . . .	94
1.8	Analyse des acides aminés par dérivation au PITC . . . . .	98
<b>2</b>	<b>Mise en oeuvre des hydrolyses par l'endoprotéinase Glu-C et la chymotrypsine en phases homogène et hétérogène</b>	<b>103</b>
2.1	Introduction . . . . .	105
2.2	Mise au point des conditions d'hydrolyse en phase homogène . . . . .	106
2.2.1	Hydrolyse de l'hémoglobine native en solution . . . . .	106
2.2.2	Hydrolyse de l'hémoglobine dénaturée par le SDS . . . . .	106
2.2.3	Stabilité des protéases en présence de SDS . . . . .	106
2.3	Mise au point des conditions d'hydrolyse en phase hétérogène . . . . .	109
2.3.1	Conditions d'adsorption de l'hémoglobine sur le support . . . . .	109
2.3.2	Caractérisation du système d'hydrolyse en phase hétérogène . . . . .	110
2.3.2.1	Interaction du support avec le SDS. . . . .	110
2.3.2.2	Interaction du support avec l'hémoglobine . . . . .	111
2.3.2.3	Interaction du support avec les protéases . . . . .	111
2.3.3	Arrêt de la réaction et élution des peptides obtenus en catalyse hétérogène . . . . .	115
2.4	Critères de la fin de la réaction protéasique . . . . .	115
<b>3</b>	<b>Étude de la sélectivité de l'hydrolyse de l'hémoglobine par l'endoprotéinase Glu-C en phase hétérogène</b>	<b>117</b>
3.1	Analyse des chromatogrammes obtenus en fin de réaction en phases homogène et hétérogène . . . . .	120
3.1.1	Obtention d'un hydrolysats peptidique final . . . . .	120
3.1.2	Modification de la résolution des chromatogrammes en présence de SDS . . . . .	120
3.2	Comparaison des hydrolysats peptidiques obtenus en phase homogène et en phase hétérogène . . . . .	124
3.2.1	Comparaison des chromatogrammes obtenus en fin d'hydrolyse . . . . .	124
3.2.2	Analyse des peptides présents . . . . .	124
3.2.3	Comparaison du type de coupure effectué par l'enzyme . . . . .	128
3.2.4	Analyse des coupures réalisées par l'endoprotéinase Glu-C sur l'hémoglobine . . . . .	129
<b>4</b>	<b>Étude de la sélectivité de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la chymotrypsine en phase hétérogène</b>	<b>139</b>
4.1	Comparaison des hydrolysats peptidiques issus de l'hydrolyse de l'hémoglobine en phase homogène et hétérogène . . . . .	142
4.2	Choix et identification d'un peptide marqueur . . . . .	144
4.3	Comparaison des mécanismes réactionnels d'hydrolyse de l'hémoglobine en phases homogène et hétérogène . . . . .	147
4.4	Comparaison de la cinétique des réactions en phases homogène et hétérogène . . . . .	148
4.5	Suivi du peptide marqueur 1-14 $\alpha$ . . . . .	150

4.6	Capacité de transport de la protoporphyrine IX par les hydrolysats chymotrypsiques . . . . .	153
	<b>Conclusion</b>	<b>161</b>
	<b>Bibliographie</b>	<b>164</b>
	<b>A Articles</b>	<b>173</b>
	Fractionation at pilot-plant scale of an haemoglobin hydrolysate by strong anionic exchange chromatography: application to the preparation of an amphiphilic peptide . . . . .	174
	Selectivity modification of chymotryptic hydrolysis of haemoglobin by its adsorption on a solid phase . . . . .	183

# Introduction



L'hydrolyse enzymatique de protéines conventionnelles comme le gluten, les caséines ou les protéines de soja est largement pratiquée dans les industries agro-alimentaires. Les hydrolyses ménagées ont pour but d'améliorer les propriétés nutritionnelles organoleptiques ou fonctionnelles des protéines comme le goût [Aubes-Dufau et coll. 95], la solubilité [Adler-Nissen et Olsen 79], le pouvoir émulsifiant, gélifiant [Chobert et coll. 89] ou l'enrichissement en acides aminés. Les hydrolyses extensives des protéines mènent à des produits alimentaires intermédiaires à destination des industries alimentaires, de la nutrition thérapeutique [Cordano et Cook 85] et de la nutrition clinique de nourrissons allergiques aux protéines laitières [Kleinmann et coll. 91]. Ces hydrolysats trouvent également des applications en cosmétique ou comme milieux de culture de micro-organismes [Dive et coll. 89]. Ces dernières années, les industries pharmaceutiques et agro-alimentaires ont fait preuve d'un intérêt croissant pour des peptides à activité biologiques issus d'hydrolysats protéiques (alimentation fonctionnelle). Ainsi, de nombreux peptides biologiquement actifs ont été isolés à partir de sources protéiques aussi variées que les caséines [Schlimme et Meisel 95], les protéines de soja [Gunther 79], le gluten [Zioudrou et coll. 79] etc. Ces peptides montrent des activités biologiques multiples telles que des activités opioïdes [Brantl et coll. 79], antithrombotiques [Bouhallab et Touzé 95], antibactériennes [Bellamy et coll. 93] immunomodulatrices, etc.

La préparation de peptides à haute valeur ajoutée par hydrolyse de protéines agricoles avec des protéases conventionnelles soulève de nombreuses difficultés depuis leur isolement à partir d'hydrolysats peptidiques souvent complexes jusqu'à la maîtrise de leur obtention au cours de la réaction protéasique, car ces peptides sont souvent des intermédiaires présents à faibles concentrations dans les hydrolysats. Les méthodes d'analyse des hydrolysats peptidiques ont été considérablement améliorées ces dernières années grâce au développement de l'électrophorèse capillaire, et de la chromatographie de phase inverse couplée à des détecteurs à barette de diodes [Nyberg et coll. 86] ou à des spectromètres de masse [Yang et coll. 96]. Dans un but préparatif, des auteurs se sont intéressés à l'extraction de peptides présentant des propriétés fonctionnelles (peptides amers) ou biologiques (hémorphines) par des solvants non miscibles à l'eau, afin de réduire les étapes de purification [Zhao et Piot 98, Aubes-Dufau et Combes 97]. Une autre approche rencontrée dans la littérature est le couplage de la réaction protéasique avec des membranes d'ultrafiltration. Ainsi, Bouhallab et coll. [Bouhallab et Touzé 95] ont rapporté la préparation de peptides à activité antithrombotique par hydrolyse trypsique du caséinomacropeptide couplée à une membrane minérale. Des auteurs ont, dans le but d'améliorer l'accessibilité des liaisons peptidiques aux protéases, mis en oeuvre la réaction dans des solvants organiques miscibles à l'eau avec des protéines tel que la  $\beta$ -lactoglobuline [Dalgalarondo et coll. 95], la sérum albumine [Houen et Sando 91], les caséines [Tchorbanov et Iliev 93], le gluten [Hertmanni et coll. 91] ou l'hémoglobine [Lignot et coll. 99]. Plusieurs de ces auteurs ont observé une modification des populations peptidiques en présence d'alcools tels que l'éthanol et le glycérol [Dalgalarondo et coll. 95, Hertmanni et coll. 91, Lignot et coll. 99].

De nombreux sous-produits des industries agro-alimentaires ont fait l'objet de multiples applications sous forme d'hydrolysats peptidiques. C'est le cas en particulier des protéines du lactosérum. Comparativement à d'autres sources protéiques, le

sang des abattoirs constitue un sous produit non conventionnel qui a donné lieu à très peu de travaux, bien qu'il présente des potentialités en industries alimentaires. Depuis l'apparition du SIDA et de la maladie de kreutsfeld-Jacob, la valorisation du sang bovin a malheureusement été stoppée, par refus médiatique, bien que d'un point de vue scientifique et légal rien ne s'oppose à une utilisation dans les domaines alimentaires ou pharmaceutique. Lors de sa récolte, le sang est fractionné sous forme de plasma et de cruor (globules rouges et autres éléments figurés du sang). Si le plasma a trouvé des débouchés par exemple en tant qu'additif alimentaire notamment en charcuterie, le cruor reste très difficile à valoriser. Son principal inconvénient est la couleur brune qui se développe après oxydation de l'hémoglobine. Pourtant, l'intérêt du cruor est élevé puisqu'il est composé à 90% d'une protéine unique et parfaitement définie, l'hémoglobine, purifiée par simple lyse des érythrocytes. Diverses recherches ont été entreprises pour valoriser l'hémoglobine du cruor. Ainsi, des méthodes de décoloration de l'hémoglobine ou de ses hydrolysats par des solvants organiques ont permis d'éliminer l'hème, responsable de la coloration brune, en vue d'application dans les industries alimentaires. Des hydrolysats pepsiques enrichis en fer héminique par ultrafiltration ont été préparés pour le traitement des anémies ferriprives [Erickson 81]. Des études sur la nutrition thérapeutique des prématurés par supplémentation du lait de femme avec des hydrolysats pepsiques dépourvus d'hème ont été réalisées [Leke Lokombe 94]. Enfin, des peptides actifs ont été isolés à partir d'hydrolysats pepsiques ou tryptiques d'hémoglobine [Ivanov et coll. 97]. Ceux-ci présentent des activités opioïdes [Piot et coll. 92b], coronaro-constrictrices [Barkhudaryan et coll. 93], analgésiques ou potentialisent l'action de la bradikynine [Piot et coll. 92a].

Récemment, notre laboratoire s'est intéressé à la préparation de peptides amphiphiles transporteurs de porphyrines. Ces molécules possèdent des propriétés intéressantes employées en thérapie photodynamique [Dougherty 93], en diététique médicale sous la forme ferro-porphyrine (hème) pour la prévention ou le traitement des anémies ferriprives [Erickson 81]. Elles présentent également des propriétés antibactériennes vis à vis de nombreuses espèces [Nitzan et coll. 87]. Beaucoup de porphyrines sont malheureusement insolubles en milieu aqueux et nécessitent d'être transportées en vue d'applications thérapeutiques. Des études menées au laboratoire ont permis d'isoler à partir d'hydrolysats pepsique d'hémoglobine bovine, deux peptides amphiphiles transporteurs de la protoporphyrine IX (PPIX) [Cempel et coll. 95] et de l'hème [Lebrun et coll. 98].

Malgré les potentialités importantes de ces peptides amphiphiles transporteurs de porphyrines, de nombreuses difficultés s'opposent à leurs préparations. Ils sont difficiles à isoler à l'échelle préparative à partir d'hydrolysats peptidiques complexes, qui contiennent un grand nombre de peptides. Il est nécessaire de rechercher des peptides ayant une capacité de transport la plus élevée possible. Un autre obstacle au développement de ces peptides dans une formulation thérapeutique utilisable à grande échelle, provient de l'étape de formation du complexe soluble peptide-porphyrine. Mal connue et surtout mal maîtrisée, elle mène à des associations dans lesquelles les porphyrines sont moins efficaces que les porphyrines à l'état de monomère. Une meilleure compréhension et maîtrise de la formation de ces complexes peptide-PPIX est nécessaire. Enfin, l'isolement de nouveaux peptides amphiphiles

ne doit plus être guidée par le hasard. L'orientation de l'hydrolyse enzymatique vers leur formation permettrait une production plus aisée et de meilleurs rendements.

L'objectif principal de ce travail a été d'isoler et de produire des peptides amphiphiles ayant des capacités de transport de la PPIX fortement accrue. Cette quête de nouveaux peptides amphiphiles a été orientée par la connaissance des caractéristiques physico-chimiques nécessaires à un bon transporteur. En premier lieu, le peptide doit posséder une partie hydrophobe pour permettre l'interaction avec une molécule de porphyrine elle-même très hydrophobe. En outre, la présence de charges positives sur le peptide devrait permettre des interactions supplémentaires puisque la porphyrine est chargée négativement à pH neutre. Nous devons donc produire et/ou isoler des peptides hydrophobes et basiques. Dans cette optique, deux voies de recherches ont été entreprises. Dans un premier temps, nous avons souhaité mettre au point à l'échelle préparative l'isolement d'un peptide amphiphile à partir d'un hydrolysats pepsique d'hémoglobine bovine, et étudier ses interactions avec la PPIX en milieu aqueux. Dans un deuxième temps, nous avons tenté une nouvelle approche correspondant à l'hydrolyse de l'hémoglobine en phase hétérogène, pour orienter la réaction vers la production de peptides hydrophobes et basiques. Dans ce système, l'hémoglobine est adsorbée sur un support, afin d'orienter la sélectivité de la réaction protéolytique vers l'obtention des peptides recherchés.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse seront présentés en deux parties. Tout d'abord, nous avons mis au point la purification d'un peptide à partir d'un hydrolysats pepsique d'hémoglobine préparé à l'échelle pilote dans un réacteur à membrane, par l'intermédiaire d'une nouvelle méthode de purification à rendement élevé. Cette méthode, composée d'une étape de fractionnement par chromatographie d'échange d'ions, couplée à un dessalage par électrodialyse a mené à des fractions contenant des peptides basiques. Une chromatographie de phase inverse a ensuite permis de sélectionner les peptides les plus hydrophobes. Un peptide basique et hydrophobe isolé par ce processus a été testé comme transporteur de la PPIX, puis, nous avons étudié les interactions entre la PPIX et le peptide en milieu aqueux, afin d'accéder à la stoechiométrie du complexe en milieu dilué. Ensuite, nous avons tenté de minimiser la formation des polymères à fortes concentrations, ce qui permettrait de parvenir à une formule thérapeutique utilisable et efficace.

Dans la seconde partie, nous avons essayé de modifier la sélectivité de la réaction protéolytique afin de produire des peptides amphiphiles. Pour cela, nous avons imposé des contraintes visant à générer un phénomène de protection de certains sites de coupures par l'adsorption de l'hémoglobine sur un support. Ainsi, nous pouvons envisager le support comme le "négatif" du type de peptide recherché. Les peptides transporteurs de PPIX sont hydrophobes et cationiques, nous avons donc choisi un support hydrophobe et anionique afin d'adsorber les fragments d'hémoglobine hydrophobes et cationiques par interactions faibles. Une technique similaire a été employée par Chersi et coll. [Chersi et coll. 90] afin d'obtenir des peptides fluorescents monomarqués. Les auteurs ont eu recours à une résine pour protéger les peptides d'un polymarquage par une sonde fluorescente. Cette seconde partie est articulée en trois chapitres. Le premier insiste sur la mise en oeuvre des hydrolysats en phase homogène et hétérogène afin de définir clairement le système utilisé. Puis, dans le second chapitre, nous avons étudié l'hydrolyse de l'hémoglobine bo-

vine en phase hétérogène avec une enzyme très spécifique, l'endoprotéinase Glu-C (protéase V8), qui préserve les segments hydrophobes et basiques. Afin de définir si l'adsorption du substrat modifie la sélectivité de la protéolyse, tous les peptides présents dans l'hydrolysats ont été identifiés et comparés à ceux qui ont été obtenus en phase homogène. Enfin, dans le troisième chapitre, nous avons choisi d'hydrolyser l'hémoglobine par une enzyme peu spécifique, la chymotrypsine. Les analyses menées avec cette enzyme n'ont pas été systématiques comme dans le cas de l'endoprotéinase Glu-C pour laquelle tous les peptides ont été clairement identifiés. Les études ont été axées sur l'étude de la cinétique de la réaction et la capacité de transport de la PPIX des hydrolysats obtenus, dans le but de montrer si l'hydrolyse a pu être réellement orientée vers la production de peptides amphiphiles.

Avant la présentation de ces résultats, nous avons fait quelques rappels bibliographiques présentant notamment les différentes approches employées pour modifier la spécificité ou la sélectivité d'une réaction protéasique, et les différentes voies envisagées pour transporter la porphyrine dans un but thérapeutique. Nous avons d'autre part présenté l'endoprotéinase Glu-C et la chymotrypsine choisies pour cette étude, ainsi que l'hémoglobine.

## Rappels bibliographiques



## 1 Modification de la sélectivité de protéases

Les tentatives pour modifier la spécificité ou la sélectivité d'une réaction enzymatique sont nombreuses, et les résultats pas toujours convaincants. Les principales voies étudiées sont les paramètres de la réaction enzymatique tels que le pH, l'ajout de solvants organiques miscibles ou non, et enfin, les hydrolyses en milieu organique pur.

### 1.1 Modification de la sélectivité en milieux purement aqueux

En milieu aqueux, les paramètres modifiables pour changer la spécificité d'une protéase sont peu nombreux. Jouer sur le tampon d'hydrolyse est envisageable mais donne en général très peu de résultats. Nous avons trouvé une référence sur ce sujet impliquant l'endoprotéinase Glu-C [Houmard et Drapeau 72]. En tampon bicarbonate d'ammonium à pH 7,8 ou acétate d'ammonium à pH 4, l'endoprotéinase Glu-C hydrolyserait uniquement les liaisons impliquant un acide glutamique en position P<sub>1</sub>. A pH 7,8 dans un tampon phosphate, l'enzyme hydrolyserait en plus les liaisons impliquant un acide aspartique en cette position. Ces deux acides aminés ne diffèrent que par un CH<sub>2</sub> surnuméraire dans la chaîne latérale de l'acide glutamique et les auteurs n'expliquent pas cette modification de spécificité due au tampon. Récemment, Sorensen et coll. [Sorensen et coll. 91] ont démontré (sur l'insuline oxydée et le glucagon), que l'endoprotéinase Glu-C hydrolysait également les liaisons impliquant un acide aspartique en tampon bicarbonate d'ammonium, mais beaucoup plus lentement que pour les liaisons impliquant un acide glutamique. En fait, le bicarbonate serait un inhibiteur de l'endoprotéinase Glu-C ralentissant l'hydrolyse. Breddam et coll. [Breddam et Meldal 92] ont eux aussi étudié la spécificité de l'endoprotéinase Glu-C, mais en tampon Hepes 50 mM à pH 7,3. Dans ces conditions, les liaisons impliquant les acides glutamiques et aspartiques sont hydrolysées mais à des vitesses très différentes. Les auteurs ont pu déterminer que la valeur de  $k_{cat}/K_m$  est 1000 fois plus élevée pour l'hydrolyse d'une liaison impliquant un acide glutamique que pour une liaison impliquant un acide aspartique. La constante de catalyse  $k_{cat}$  est responsable de ce phénomène, puisque la constante  $K_m$  est 7 fois plus élevée pour l'hydrolyse d'une liaison impliquant un acide aspartique. Ainsi, un segment peptidique contenant un acide aspartique se lie très bien au site actif de l'enzyme, mais la coupure est beaucoup plus lente.

En 1995, Schmidt et coll. [Schmidt et coll. 95] ont étudié l'hydrolyse par la pepsine à différents pH des protéines du lactosérum ( $\alpha$ -lactalbumine,  $\beta$ -lactoglobuline, sérum albumine bovine et Immunoglobulines bovines). Ils espéraient trouver une explication à l'hypersensibilité de certains enfants aux protéines du lait de vache. Les enfants ont un pH stomacal relativement élevé (pH 3-4) comparativement à celui des adultes (pH 2), ce qui mène à une digestion incomplète des protéines du lait. Cette hydrolyse plus faible augmente l'antigénicité résiduelle de l' $\alpha$ -lactalbumine, de la sérum albumine bovine, et des Ig-G bovins. Les auteurs expliquent l'hydrolyse réduite de la sérum albumine bovine à pH 4 par une conformation plus proche de la forme native qu'à pH 2; les liaisons peptidiques seraient donc moins accessibles à la

pepsine.

De même, Lignot et coll. [Lignot 98] ont noté une modification de la sélectivité de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine en comparant les peptides libérés à pH 2 et à pH 4,5. Sept peptides surnuméraires ont été détectés à pH 4,5. Différentes explications sont avancées pour expliquer ce phénomène. Premièrement, l'état de la protéine substrat est différent à pH 2 et à pH 4,5. Native à pH 4,5, la protéine se déplie partiellement à pH 2, révélant certains sites inaccessibles. Deuxièmement, l'ionisation des produits d'hydrolyse est différente. A pH 2, les peptides sont chargés positivement et les répulsions électrostatiques empêchent les associations. A pH 4,5 par contre, les peptides sont beaucoup moins chargés ce qui favorise les interactions. Ces associations limiteraient l'accessibilité de certains sites de coupures.

## 1.2 Modification de la sélectivité en milieu hydro-organique

L'introduction de paramètres supplémentaires dans l'hydrolyse a été largement étudiée, notamment pour dénaturer le substrat; c'est surtout l'action des solvants organiques qui a été retenue. Deux classes de solvants organiques peuvent être définies. La classe des solvants miscibles à l'eau, et celle des solvants non miscibles.

### Solvants miscibles à l'eau

L'hydrolyse de la  $\beta$ -lactoglobuline par la pepsine à pH 2,5 [Dalgarrondo et coll. 95] a conduit à des produits différents selon le taux d'éthanol introduit dans la solution. Pour une quantité inférieure à 30% (V/V), l'hydrolyse produit des petits peptides hydrophiles. Quand la proportion en éthanol est de 30%, des peptides hydrophobes sont produits, qui sont ensuite partiellement hydrolysés en produits plus petits et hydrophiles. Enfin, pour un taux d'éthanol de 50%, la population de gros peptides hydrophobes reste stable, même si le temps d'incubation est prolongé. Les auteurs avancent l'hypothèse qu'en présence de plus de 40% d'éthanol, la pepsine coupe les boucles entre deux hélices  $\alpha$  induites par la présence du solvant, produisant d'abord des peptides longs et hydrophobes. La conformation de ces peptides doit être moins figée pour des concentrations intermédiaires en alcool, ce qui autorise d'autres clivages par la pepsine.

De même Seetharama et coll. [Seetharama et coll. 92], ont noté que l'induction d'hélices  $\alpha$  dans la  $\beta$ -globine, l'apocytochrome C et le domaine fonctionnel de la protéine M49 de Streptocoque, correspond à une baisse de leur flexibilité conformationnelle, que l'on peut mettre en relation directe avec la restriction de leur protéolyse par la protéase V8 en présence de n-propanol (0 à 30%) ou de trifluoroéthanol.

Hertmanni et coll. [Hertmanni et coll. 91] ont opté pour l'introduction de glycérol dans le milieu d'hydrolyse. Pour des concentrations en glycérol élevées (10 M), l'hydrolyse par la subtilisine de la chaîne B oxydée de l'insuline conduit au clivage direct d'un site de coupure non hydrolysé en milieu aqueux. Les auteurs supposent que l'hydrophobicité du milieu est augmenté par le glycérol, ce qui mène à une augmentation des parties hydrophobes du substrat présentées à l'enzyme. Le site de clivage non hydrolysé (entre les acides aminés 26 et 27 de l'insuline) est inaccessible en milieu aqueux. En présence d'une forte quantité de glycérol, les modifications de conformation induites permettent de présenter ce site de coupure à l'enzyme. Les autres

sites de coupure (de la chaîne B oxydée de l'insuline) sont hydrolysés que le milieu soit aqueux ou non, mais l'ordre des coupures est modifié. Ainsi, le site de coupure n°4 (entre les acides aminés 16 et 17) préférentiel en tampon (hydrolysé en premier), est clivé après le site n°3 (entre les acides aminés 15 et 16) et le site n°5 (entre les acides aminés 26 et 27) dans un milieu contenant du glycérol. Comme c'est le cas dans l'hydrolyse de la chaîne B de l'insuline par la subtilisine, la sélectivité de la pepsine est modifiée par la présence de glycérol lors de l'hydrolyse des  $\gamma$ -gliadines de blé. En chromatographie liquide de phase inverse, les gliadines sont éluées en quatre pics nommés A, B, C et D en fonction de leur temps de rétention. La fraction D, qui est la première hydrolysée en milieu purement aqueux ne subit aucune coupure dans un milieu contenant du glycérol en concentration supérieure à 0,5 M. A l'opposé, la fraction A est plus hydrolysée en présence de glycérol que dans le milieu aqueux. Les produits d'hydrolyse semblent également être différents puisqu'un nouveau pic correspondant à un peptide hydrophobe apparaît dans ces conditions. Cependant, des analyses chromatographiques plus résolutive seraient nécessaires pour confirmer ces résultats.

Welinder [Welinder 88] a étudié l'effet de plusieurs solvants organiques (méthanol, propan-2-ol et acétonitrile) en quantité inférieure à 20% sur la cinétique de huit protéases (trypsine, chymotrypsine, élastase, protéase V8, pepsine, lysil endopeptidase, thermolysine et l'endoprotéinase Arg-C). Les résultats prouvent que les protéases conservent leur spécificité dans chaque milieu, mais que leur activité est réduite de façon variable selon le solvant. La présence de solvant entraîne néanmoins un clivage plus spécifique dans le cas de la thermolysine. Cette protéase peu spécifique hydrolyse les liaisons peptidiques au niveau des acides aminés Leu, Met, Val, Phe, Ile, Ala en position P'<sub>1</sub> dans l'eau. En présence de 20% (V/V) de propan-2-ol la spécificité est restreinte aux acides aminés Phe, Leu et Ile en position P'<sub>1</sub>.

### Solvants non miscibles à l'eau

Les systèmes biphasiques sont surtout nécessaires lorsque le substrat et son enzyme ne sont pas solubles dans le même milieu. Par exemple, les lipides apolaires présentent une faible solubilité dans l'eau et sont utilisés de façon bien plus efficace par des enzymes localisées à l'interface huile/eau d'un système biphasique [Vergier et coll. 73]. Ces systèmes biphasiques sont également mis en oeuvre en fermentation pour conserver une concentration faible en produits inhibant, par leur extraction dans la phase non aqueuse.

Dans l'hydrolyse des protéines, les systèmes biphasiques permettent d'envisager une modification de la sélectivité de la réaction protéolytique. Par le choix d'un solvant adéquat, certains peptides provenant de l'hydrolyse passeront dans la phase organique et seront ainsi soustraits à l'action de l'enzyme insoluble dans ce solvant. Selon la règle régissant le partage entre les deux phases, le peptide s'accumulera en grande quantité, les sites de coupures potentiels qu'il présente n'étant pas hydrolysés [Froidevaux 98].

### 1.3 Modification de la sélectivité en milieu organique

Des enzymes lyophilisées et introduites dans un solvant organique restent actives dans un tel système [Rupley et coll. 83]. Plus étonnant, la courbe d'activité en fonction du pH est identique en milieu organique et en milieu aqueux. Ainsi, l'état d'hydratation de la protéine serait conservé après la lyophilisation.

La suspension d'enzymes dans les solvants peut modifier leurs propriétés fondamentales, menant à une très grande thermostabilité [Gupta 91], une grande stabilité au stockage ou un changement de spécificité [Zaks et Klivanov 86]. La spécificité d'une enzyme pour la catalyse d'une réaction par rapport à une autre est généralement définie par le rapport des constantes de spécificité  $k_{cat}/K_m$ . Ainsi, Zaks et Klivanov [Zaks et Klivanov 86] ont déterminé une sélectivité totalement inversée pour l' $\alpha$ -chymotrypsine et la subtilisine Carlsberg en solvant organique par rapport à un milieu aqueux. Dans la transestérification du N-Ac-L-Ser-OMe et N-Ac-L-Phe-OEt avec du propanol catalysé par les protéases citées précédemment, le dérivé serine est approximativement trois fois plus réactif que le dérivé phénylalanine dans l'octane. Lorsque l'hydrolyse est effectuée dans l'eau, le rapport  $k_{cat}/K_m$  est inversé à  $2 \cdot 10^{-5}$  pour l' $\alpha$ -chymotrypsine et  $10^{-2}$  pour la subtilisine. Selon les auteurs, le pouvoir catalytique des enzymes ( $V_m/K_m$ ) vis à vis de nombreux substrats pourrait être modulé en changeant uniquement le milieu de réaction. En milieu aqueux, les interactions enzyme-substrat seraient principalement dirigées par les effets hydrophobes. En remplaçant l'eau par un solvant anhydre, ces effets sont largement perturbés puisqu'un partage du substrat entre le site actif de l'enzyme et le solvant modifie l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Wescott et Klivanov [Wescott et Klivanov 93] ont examiné la sélectivité de la subtilisine Carlsberg dans la transestérification du N-Ac-L-Ser-OEt (Ser) et du N-Ac-L-Phe-OEt (Phe) avec du propanol dans 23 solvants anhydres. L'enzyme possède une forte préférence pour le substrat Ser dans des solvants tels que le dichlorométhane ou le benzène; à l'inverse, elle préfère le substrat Phe dans des solvants tels que la pyridine et le tert-butanol. Ryu et Dordick [Ryu et Dordick 92] ont observé que la sélectivité de l'oxydation de différents phénols para-substitués par la peroxidase peut être corrélée à l'hydrophobicité à la fois du solvant et du substrat. Les auteurs expliquent cette dépendance comme une conséquence de la partition du substrat entre les solvants et le site actif de l'enzyme. La sélectivité enzymatique varie donc en passant d'un milieu aqueux à un milieu non aqueux, mais elle varie également d'un solvant organique à un autre.

Sakurai et coll. [Sakurai et coll. 88] ont mis en évidence une forte dépendance de la subtilisine Carlsberg vis à vis du solvant pour l'énantiosélectivité dans la transestérification du N-Ac(L ou D)-Ala-OEt-Cl avec du propanol. Ces auteurs supposent que la liaison de l'ester avec l'enzyme déplace l'eau du site actif, mais, lorsque l'hydrophobicité du solvant augmente, l'énergie nécessaire pour transférer l'eau du site actif vers le solvant devient plus élevée. L'énantiomère D déplace moins d'eau du site actif que l'énantiomère L pour former un complexe réactif. Ainsi, plus l'hydrophobicité du solvant est élevée plus l'énantiomère D est favorisé par rapport au L.

Une corrélation similaire entre l'énantiosélectivité enzymatique et l'hydrophobicité du solvant a récemment été publiée pour la lipase de *Candida Cylindracea* [Gu-

bicza et Kelemen-Horvath 93]. De même, d'autres études révèlent une réversion de l'énantioselectivité enzymatique dans un solvant comparativement à un autre [Wu et coll. 91, Ueji et coll. 92]. La transestérification du N-Ac-(L ou D)-Phe-OEt-Cl avec du propanol catalysé par la protéinase d'*Aspergillus oryzae* donne une valeur  $(k_{cat}/K_m)_L / (k_{cat}/K_m)_D$  de 6,6 dans l'acétonitrile, mais un rapport inversé de 0,24 dans le toluène [Tawaki et Klibanov 92]. Lorsque l'énantioselectivité est mesurée pour une gamme de différents solvants organiques, une corrélation avec l'hydrophobicité du solvant est observée. Afin d'expliquer ces résultats, les auteurs supposent que le groupe phényl du substrat naturel L-Phe est enfoncé dans le site actif de l'enzyme dans un mode de liaison productif. La formation d'un complexe productif entre l'énantiomère D et l'enzyme nécessite l'orientation du substrat menant à l'exposition de la partie phényl au solvant. Dans les solvants hydrophiles, la solvation du groupe phényl nécessite une énergie importante, favorisant le mode de liaison productif de l'énantiomère L par rapport à l'énantiomère D. Lorsque l'hydrophobicité du milieu de réaction augmente, la solvation du groupe phényl devient finalement favorable et la liaison du substrat D est favorisée.

Tout comme l'énantioselectivité, la sélectivité prochirale des enzymes est fortement affectée par le milieu réactionnel. Hirose et coll. [Hirose et coll. 92] ont utilisé une lipase provenant de *Pseudomonas sp.* catalysant l'hydrolyse du dicarboxylate achiral bis-( $\alpha$ -coxométhyl)-1,4-dihydro-3,5-pyridine afin de produire un monoester optiquement actif. Lorsque la réaction est effectuée dans l'isopropanol saturé en eau, 99% du monoester obtenu est sous forme S. Au contraire, dans le cyclohexane saturé en eau, le substrat prochiral est préférentiellement converti en énantiomère R à 89%. Si l'enzyme est remplacée par la lipase de *Pseudomonas cecopia*, le produit R est formé dans les deux solvants mentionnés précédemment. Les auteurs ont conclu que l'effet du solvant résulte d'interactions spécifiques entre le solvant et la lipase.

## 2 Le transport des porphyrines hydrophobes en milieu aqueux

Nous nous intéresserons exclusivement au cas des porphyrines qui sont des molécules photosensibilisantes utilisées en thérapie photodynamique des cancers, et plus particulièrement à la protoporphyrine IX (PPIX) qui s'accumule de façon plus ou moins sélective sur les tumeurs [Dougherty 93, Moan et Berg 92]. Le grand handicap de la porphyrine et de tous les médicaments fortement hydrophobes est d'être insolubles en milieu aqueux, faisant apparaître des problèmes de formulation. Actuellement, l'injection se fait principalement avec des solvants organiques, par exemple le DMSO pour la porphyrine. Ces solvants sont toxiques pour notre organisme, mais le bénéfice retiré par l'action médicamenteuse de la molécule ainsi solubilisée est telle que l'autorisation de mise sur le marché a été donnée. D'autres voies de recherches sur la solubilisation et le transport de la PPIX sont malgré tout étudiées afin de mettre au point une formulation moins agressive pour l'organisme.

La porphyrine est une molécule naturelle, existant dans notre organisme en tant que précurseur de l'hème. Il est nécessaire qu'elle soit transportée, et de nombreuses possibilités lui sont offertes.

La première protéine du sérum décrite comme transporteur de porphyrine est la sérum albumine [Fairley 38]. L'albumine n'a pas un rôle de transporteur spécifique de la porphyrine. Elle a une forte affinité pour une grande variété de substances biologiques importantes pour lesquelles elle sert de transporteur. La stoechiométrie de fixation *in vitro* est estimée à 5 moles de porphyrines pour 1 mole d'albumine [Maracek et coll. 73]. Cette forte capacité de transport reflète probablement des interactions non spécifiques et/ou une agrégation de la porphyrine.

L'hémopexine est une glycoprotéine du sérum transportant la porphyrine. Le rapport porphyrine/protéine au sein du complexe a été estimé dans un premier temps à 15 à 20 molécules d'hème par molécules d'hémopexine, puis a été ramené à 1/1 [Heide et coll. 64].

Jori et coll. [Jori et coll. 84], ont démontré que les globulines ainsi que les lipoprotéines du sérum fixaient également la porphyrine. En fait, ils ont examiné la distribution de la porphyrine au cours du temps, après une injection. Elle n'est jamais retrouvée sous forme libre dans le sang, mais uniquement sous forme complexée. Pour des temps courts (inférieurs à 2h), la porphyrine est fixée sur les protéines (globuline et albumine). Par contre, pour des temps longs (1 semaine) seules les lipoprotéines transportent la porphyrine. La globuline et l'albumine perdent totalement leur porphyrine entre 24 et 48 heures après l'injection. En ce qui concerne les lipoprotéines, les HDL sont les premières à fixer la porphyrine en proportions importantes, à cause de leur taux élevé de protéines. Au cours du temps, les HDL et LDL perdent la porphyrine liée. La libération s'effectue de façon plus lente avec les VLDL.

Toutes les molécules que nous venons de citer sont des transporteurs naturels de porphyrine dans notre organisme. Cependant, et même s'ils ont déjà été employés comme transporteurs en photochimiothérapie [Hamblin et Newman 94, Barel et coll. 86], leur utilisation pour la formulation à grande échelle d'un médicament n'est pas réellement envisageable. En effet, l'albumine est une grosse protéine de 67000 Da qui ne peut fixer que 5 molécules de porphyrine. L'efficacité est encore moins bonne pour l'hémopexine qui a une masse de 57000 Da et ne peut transporter qu'une seule molécule de porphyrine. Les lipoprotéines sont elles de bien plus grosses entités. Des voies alternatives ont alors été envisagées. Des essais de couplages de porphyrines à des molécules de glucose ont par exemple été tentés [Bourhim et coll. 90].

De même, afin de la transporter de façon sélective vers un type de cellules, la porphyrine a été couplée à des anticorps monoclonaux se liant aux antigènes de surface des cellules cibles [Oseroff et coll. 87]. Le transport est ainsi très efficace, et la dose de porphyrine nécessaire à l'action thérapeutique est diminuée.

Les liposomes de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) apparaissent comme de très bons vecteurs de porphyrine. Ces liposomes sont capables de transférer la porphyrine aux lipoprotéines, probablement par fusion des vésicules avec les lipides des VLDL [Zhou 89].

Nous avons également noté l'utilisation de microsphères [Bachor et coll. 88] et de nanosphères de polyisobutylcyanoacrylate et de polyhexylcyanoacrylate [Brasseur et coll. 91]. La méthode de nanosphère n'autorise que de faibles capacités de transport.

Une autre voie a récemment été envisagée. Elle reprend la capacité de certaines protéines à transporter la porphyrine, mais en recherchant des entités plus efficaces. Ainsi, les peptides qui ont des masses moléculaires plus faibles que les protéines ont

été pressentis comme transporteurs. En 1987, Katagiri et coll. [Katagiri et coll. 87] ont examiné les interactions de l'hème avec un peptide synthétique mimant le site de liaison de l'hème d'une glycoprotéine riche en histidine. Ils ont ainsi découvert un motif de 6 acides aminés permettant de fixer une molécule d'hème.

En 1994, Cempel et coll. [Cempel et coll. 94] ont produit par hydrolyse de l'hémoglobine bovine une préparation transportant la porphyrine. Par purification de cette préparation, un peptide amphiphile a été isolé [Cempel et coll. 95]. Ce peptide a une masse de 1500 Da. Sa capacité de transport a été calculée, et 10 molécules de peptide sont nécessaires pour transporter 1 molécule de porphyrine. Toutefois, ce rapport ne représente pas la stoechiométrie réelle. En effet, le spectre UV-visible suggère la présence d'une porphyrine agrégée, et le dichroïsme circulaire observé peut indiquer une interaction élevée entre des agrégats de porphyrine et un groupe de peptides hélicoïdaux [Bourdon et coll. 96]. La préparation d'une formule applicable en médecine passe par une meilleure compréhension du complexe peptide-PPIX afin de produire une entité plus efficace au niveau du transport mais également mieux résolue et moins agrégée. C'est pourquoi les interactions entre les deux molécules sont très étudiées [Ikeda et coll. 91, Pispisa et coll. 94].

### 3 Les peptides anti-bactériens

L'analyse de la structure des peptides anti-bactériens a révélé de grandes similitudes avec celle des peptides capables de transporter la porphyrine. Un peptide transporteur de porphyrine pourrait donc également posséder une activité anti-bactérienne. En effet, les membranes bactériennes lipidiques sont donc hydrophobes mais également négatives par la présence de constituants tels les glycerophospholipides ou les acides teïchoïques et teïchuroniques. Les peptides antibactériens naturels sont de ce fait en grande majorité des peptides hydrophobes et chargés positivement, comme les peptides transporteurs de porphyrines. Notre laboratoire souhaitant développer un nouvel axe de production de peptides antibactériens, nous décrivons ici les propriétés des peptides antibactériens ainsi qu'une méthode de calcul du moment hydrophobe permettant de sélectionner une séquence peptidique avant de tester sa capacité à s'intégrer dans une membrane lipidique, et d'effectuer les tests biologiques sur les hydrolysats. De très nombreux peptides anti-bactériens peuvent être recensés. La plupart sont d'origine naturelle sous leur forme active, d'autres sont des peptides de synthèse et d'autres enfin, proviennent d'hydrolysats peptidiques. Les peptides antibactériens naturels ont été découverts chez les organismes tels que les insectes dont le système immunitaire n'est pas très développé (sans lymphocytes ni immunoglobulines). Dépourvus d'un système immunitaire spécifique, ils possèdent néanmoins un système de défense très efficace basé en partie sur des peptides et protéines anti-bactériennes. Les bactéries développant sans cesse de nouvelles résistances aux antibiotiques, les peptides antibactériens naturels ou synthétiques deviennent un outil potentiel de la lutte contre ces microorganismes.

L'étude des peptides anti-bactériens naturels a permis de déterminer leurs caractéristiques communes, telles que la structure, la charge ou la taille. Ils peuvent être linéaires (famille des cécropines ou des melittines) [Boman et coll. 91, Steiner et coll.

81], mais aussi circulaire comme dans la famille des défensines [Lehrer et coll. 93]. Cependant, ils présentent tous la caractéristique commune d'être amphiphiles. Les peptides linéaires s'organisent en hélice  $\alpha$  amphiphile, les acides aminés hydrophobes se présentant sur une face de l'hélice et les acides aminés hydrophiles se présentant sur l'autre face. Les peptides circulaires sont organisés en feuillet  $\beta$ , et c'est un assemblage en dimères qui fournit la conformation amphiphile. La taille du peptide a également de l'importance, la membrane bactérienne fait environ 30 Å, et il faut au moins 18 acides aminés à un peptide en hélice  $\alpha$  pour la traverser. De même, la majorité des peptides antibactériens en hélice  $\alpha$  sont basiques.

La découverte de ces caractéristiques a permis le développement d'un thème de recherche visant à produire de nouveaux peptides anti-bactériens. Les peptides naturels ont été hybridés [Lee et coll. 86], en espérant obtenir une activité plus élevée, et des peptides de synthèse ont été créés [Degrado et coll. 80]. Enfin, certains ont cherché de nouveaux peptides anti-bactériens parmi des hydrolysats de protéines [Mamoru et coll. 91]. A notre connaissance, très peu d'hydrolysats peptidiques ont fourni des peptides antibactériens. Nous avons cependant relevé une hydrolyse de la lactoferrine bovine. Le cas de cette protéine est particulier puisque la lactoferrine présente à l'état natif une activité antibactérienne. L'apolactoferrine endommage directement la membrane externe des bactéries Gram<sup>-</sup> entraînant la libération des lipopolysaccharides [Ellison III et coll. 88]. De tels faits suggèrent une affinité de la lactoferrine pour des membranes biologiques et un effet léthal par rupture de la membrane. Afin de cerner la partie active de la protéine, l'hydrolyse de la lactoferrine a été menée par différentes enzymes (trypsine, papaïne, pepsine). Alors que l'hydrolysats pepsique montre une forte activité contre *E. coli* O111, les hydrolysats produits par la trypsine ou la papaïne sont moins actifs [Mamoru et coll. 91]. L'hydrolyse pepsique génère des peptides de petites masses moléculaires possédant une activité anti-bactérienne à large spectre, inhibant la croissance de bactéries Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>, y compris des souches résistantes à la lactoferrine native. L'activité antibactérienne de l'hydrolysats est en fait 8 fois plus élevée que l'activité de la lactoferrine non digérée pour toutes les souches testées. Bellamy et coll [Bellamy et coll. 92] ont alors recherché dans l'hydrolysats pepsique de la lactoferrine humaine et bovine le ou les peptides possédant l'activité antibactérienne. Dans chaque cas, un seul peptide a été identifié. La lactoferrine humaine conduit après hydrolyse pepsique à un peptide anti-bactérien correspondant aux acides aminés N-terminaux 1 à 47. Il a une masse moléculaire de 5538 Da et est composé de deux fragments reliés par des ponts disulfures. Le premier comprend les acides aminés 1 à 11 et le second les acides aminés 12 à 47. Pour la lactoferrine bovine, le peptide anti-bactérien correspond aux acides aminés 17 à 41 proche de l'extrémité N-terminale, et possède une masse moléculaire de 3126 Da. Les peptides purifiés ont une activité plus élevée que la lactoferrine native, 2 fois dans le cas du peptide humain et 12 fois dans le cas du peptide bovin.

Eisenberg et coll. [Eisenberg et coll. 82] ont proposé une approche pour mieux rationaliser et quantifier les propriétés amphiphiles des peptides. Le concept d'hélice amphiphile peut être abordé en combinant l'échelle d'hydrophobicité avec une représentation de l'hélice en roue. Pour une hélice, l'amphiphilie signifie qu'une face de l'hélice projette majoritairement les chaînes latérales d'acides aminés hydrophobes,

alors que la face opposée projette majoritairement les chaînes latérales d'acides aminés hydrophiles (figure 1).

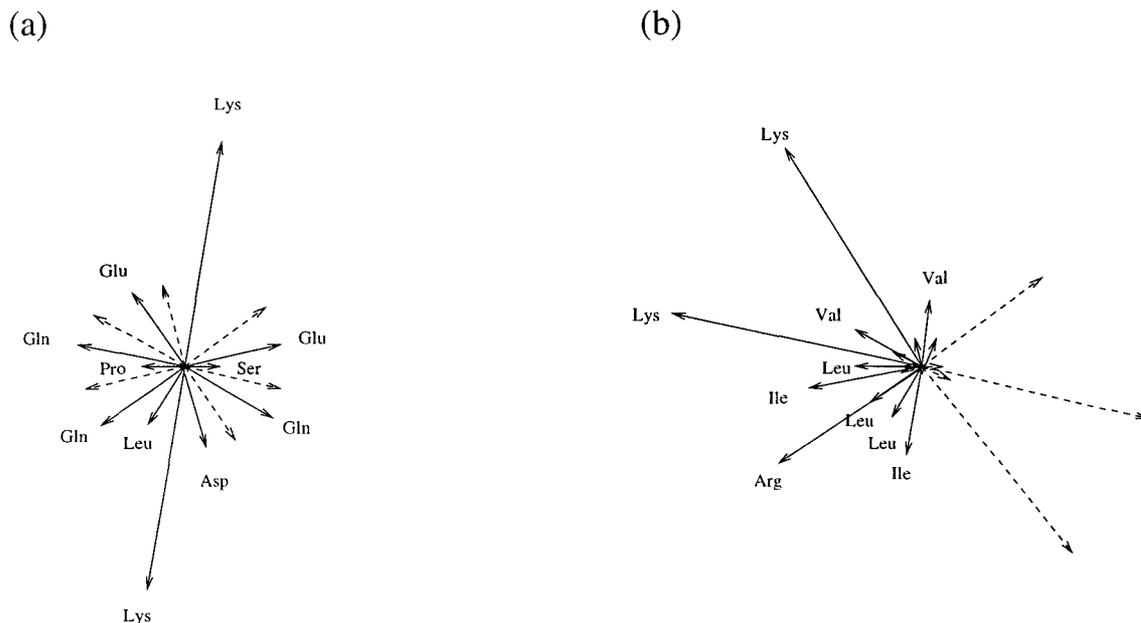


FIGURE 1 – Représentation schématique de la contribution de chaque résidu d'un peptide au moment hydrophobe hélical  $\langle \vec{\mu}_H \rangle$ . (a) Représentation des 11 résidus d'une hélice de la lactate deshydrogénase commençant au résidu 308. Les résidus hydrophobes ont des valeurs d'hydrophobicité  $H_i$  positives et sont représentés par des vecteurs en traits pleins partant du centre axial de l'hélice. Les résidus hydrophiles ont des valeurs de  $H_i$  négatives et leur position dans l'hélice est représentée par un vecteur en pointillé partant du centre. Leur contribution vectorielle est représentée par les vecteurs en traits pleins après une rotation de  $180^\circ$ . La somme des vecteurs  $\vec{H}_i$  mène au moment hydrophobe  $\vec{\mu}_H$ . Lorsque la distribution des vecteurs en trait plein est relativement symétrique, le segment a un moment hydrophobe faible  $\mu_H=0,1$ . (b) Résidus 5 à 22 de la mélattine. La distribution des vecteurs en traits pleins n'est pas symétrique, le moment hydrophobe est élevé  $\mu_H=0,4$ . Les résidus ayant une contribution faible sont représentés par des vecteurs mais ne sont pas nommés.

Ces auteurs ont ainsi défini le moment hydrophobe moyen :

$$\langle \vec{\mu}_H \rangle = \frac{\sum_{i=1}^N \vec{H}_i}{N} \quad (1)$$

ou  $\langle \vec{\mu}_H \rangle$  est la somme des vecteurs  $\vec{H}_i$  correspondant aux hydrophobicités des chaînes latérales d'une hélice de N résidus. La taille du vecteur  $\vec{H}_i$  est l'hydrophobicité numérique signée (+ ou -) associée à chaque acide aminé, et la direction est déterminée par l'orientation de la chaîne latérale par rapport à l'axe de l'hélice.

De façon plus simple, la valeur du moment hydrophobe est obtenue grâce à la formule suivante :

$$\mu_H = \left[ \left[ \sum_{n=1}^N H_n \sin(\delta_n) \right]^2 + \left[ \sum_{n=1}^N H_n \cos(\delta_n) \right]^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

ou  $H_n$  est l'hydrophobicité de n<sup>eme</sup> résidu et  $\mu_H$  le moment hydrophobe.  $\delta_n$  est l'angle séparant les chaînes latérales de deux acides aminés consécutifs dans la séquence. Pour une hélice  $\alpha$  parfaite, l'angle  $\delta_n$  est de 100°.

Le moment hydrophobe est utilisé par Eisenberg pour identifier les hélices transmembranaires probables dans une séquence. Le protocole suivi présente de nombreuses étapes. Dans un premier temps, l'hydrophobicité d'une séquence est déterminée. Si elle est inférieure à 0,42 la procédure ne va pas plus loin, le segment est disqualifié. Après leur sélection, les séquences sont classées dans un diagramme présentant le moment hydrophobe en fonction de l'hydrophobicité (figure 2).

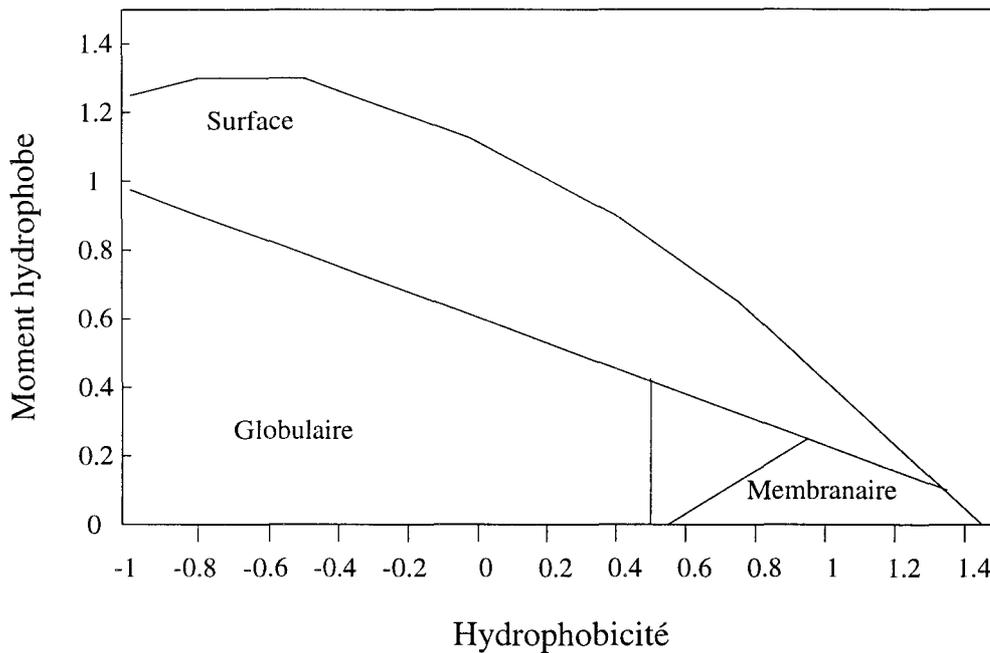


FIGURE 2 – Diagramme du moment hydrophobe d'un peptide en fonction de son hydrophobicité.

Dans ce diagramme, l'abscisse  $\langle H \rangle$  représente la solubilité d'une hélice dans un milieu non polaire, et se calcule de la façon suivante :

$$\langle H \rangle = \frac{\sum_{i=1}^N H_i}{N} \quad (3)$$

L'ordonnée  $\langle \mu_H \rangle$  représente la tendance de l'hélice à préférer l'interface entre un milieu polaire et un milieu apolaire. Globalement, le diagramme est divisé en trois parties. Dans la partie correspondant à une hydrophobicité inférieure à 0,5 et à un moment hydrophobe inférieur à 1, nous trouverons des peptides globulaires solubles en milieu aqueux. La partie correspondant à une hydrophobicité comprise entre 0,6 et 1,4 et un moment hydrophobe inférieur à 0,3, nous trouverons des peptides membranaires solubles préférentiellement en milieu hydrophobe. Enfin, des peptides de surface qui se localisent à l'interface des deux milieux sont situés dans une région dont l'hydrophobicité est comprise entre -1 et 1,4 mais dont le moment hydrophobe est plus élevé que celui des deux régions citées précédemment.

## 4 Rappels sur la structure de l'hémoglobine bovine et sur les protéases employées

### 4.1 L'hémoglobine bovine

Nous avons choisi de conserver l'hémoglobine bovine comme substrat car malgré les réticences provoquées chez les consommateurs par la maladie de Kreutzfeld Jacob, elle reste un très bon modèle d'étude. Sa qualité constante et sa séquence totalement déterminée ne variant pas d'un individu à l'autre font de l'hémoglobine la protéine idéale pour l'identification systématique des peptides d'un hydrolysat. L'hémoglobine possède une masse moléculaire de 64 000 Da, et est composée de deux parties : l'apoprotéine ou globine (quatre chaînes polypeptidiques) et un groupement prosthétique, l'hème. Son  $pH_i$  est de 7,1.

#### La globine

Les quatre chaînes polypeptidiques qui composent la globine sont identiques deux à deux. Chez les bovins adultes, la globine est formée de deux chaînes  $\alpha$  et de deux chaînes  $\beta$ . La chaîne  $\alpha$  contient 141 acides aminés et la chaîne  $\beta$  145. La composition en acides aminés ainsi que le pourcentage de chacun d'entre eux dans une chaîne sont rassemblés dans le tableau 1. La structure secondaire de la globine est hélicoïdale à plus de 75%. Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  contiennent respectivement sept et huit hélices  $\alpha$  interrompues par des segments non hélicoïdaux (figure 3 et figure 4). Les extrémités N et C terminales sont elles aussi désordonnées. La structure tertiaire de chaque chaîne forme une cavité hydrophobe qui accueille l'hème.

#### Le groupement prosthétique : l'hème.

L'hème est constitué d'une molécule de protoporphyrine IX dont la position centrale est occupée par un atome de fer sous forme ferreux ou ferrique (figure 5). La porphyrine est une molécule possédant un noyau tétrapyrolique. Les pyroles sont reliés entre eux par des ponts méthènes et sont substitués par différents groupes en position externes qui permettent leur classification.

acide aminé	nombre dans la chaîne $\alpha$	% dans la chaîne $\alpha$	nombre dans la chaîne $\beta$	% dans la chaîne $\beta$
Gly	9	6,38	11	5,9
Ala	20	14,18	16	11,03
Val	12	8,51	18	12,44
Leu	20	14,18	17	11,72
Ser	13	9,23	5	3,44
Asp	8	5,67	11	7,58
Glu	5	3,54	8	5,52
Lys	11	7,8	13	8,95
Arg	3	2,13	4	2,75
His	10	7,1	6	4,13
Asn	3	2,13	5	3,44
Gln	1	0,71	3	2,06
Thr	8	5,67	6	4,13
Met	1	0,71	3	2,06
Cys	0	0	1	0,69
Pro	6	4,25	6	4,13
Tyr	3	2,13	2	1,35
Phe	7	4,96	10	6,89
Trp	1	0,71	2	1,37

TABLEAU 1 – *Composition en acides aminés des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine bovine.*



FIGURE 3 – *Représentation spatiale de la chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine bovine.*

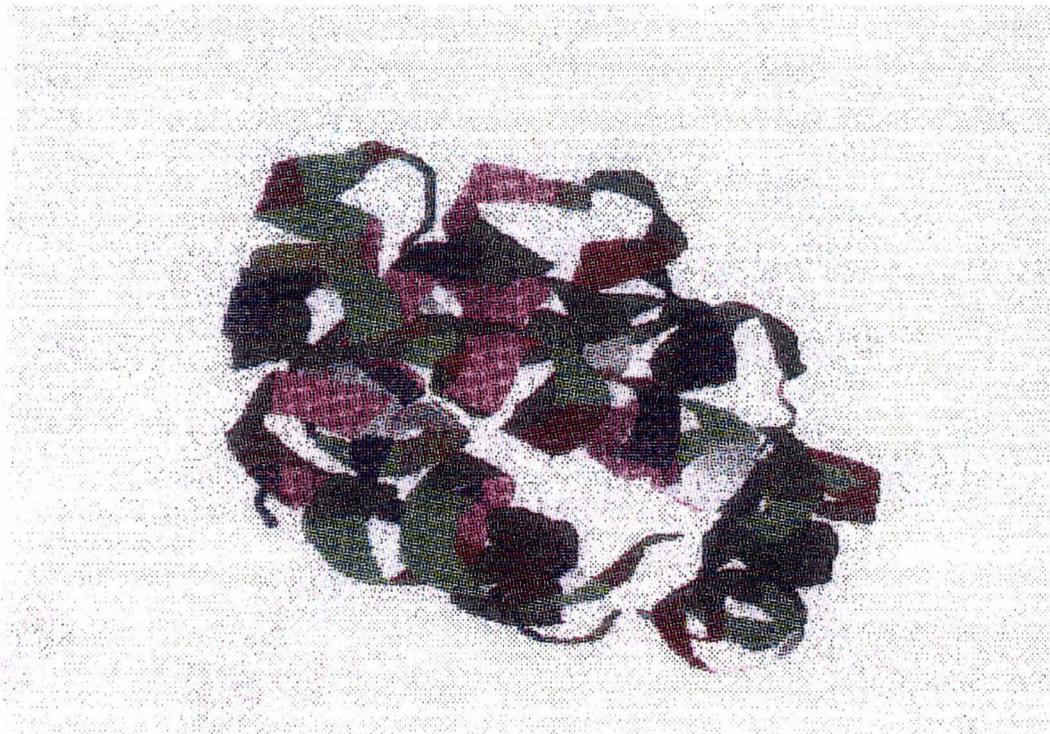


FIGURE 4 – *Représentation spatiale de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine.*

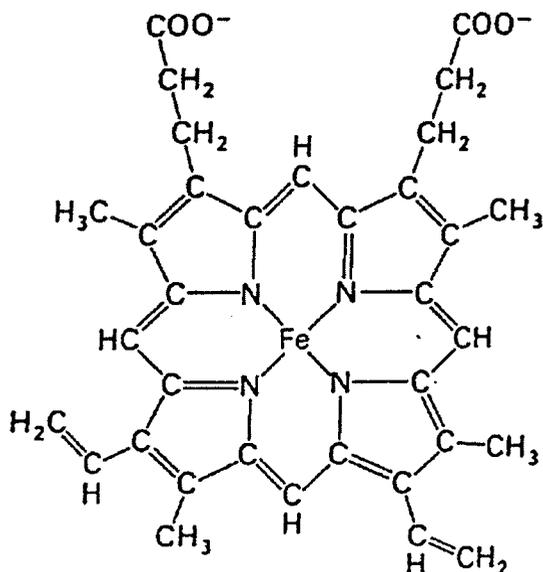


FIGURE 5 – Schéma de l'hème (*Fe protoporphyrine IX*).

## 4.2 Les protéases

Nous avons choisi deux enzymes pour réaliser les hydrolyses: l'endoprotéinase Glu-C qui est très spécifique et la chymotrypsine, qui l'est beaucoup moins.

### L'endoprotéinase Glu-C ou protéase V8(EC 3.4.21.19).

L'endoprotéinase Glu-C est une des enzymes sécrétées dans le milieu extracellulaire par *Staphylococcus aureus* [Beaudet et coll. 74]. Elle possède une masse moléculaire de 27 000 Da et elle est active dans un domaine de pH allant de 3,5 à 9,5 avec un pic d'activité maximal autour de pH 7 [Houmard 76]. Elle est inhibée par le DFP, mais pas par l'EDTA. Elle est active à pH alcalin et ne possède pas de groupe sulfhydryl. Tout ces faits suggèrent que l'endoprotéinase Glu-C est une protéase à sérine [Drapeau et coll. 72] bien qu'elle ne soit pas inhibée par le PMSF.

La particularité de cette enzyme est d'être très spécifique envers les acides glutamiques et aspartiques en tampon phosphate. Elle catalyse principalement (1000 fois plus vite) l'hydrolyse des liaisons impliquant l'extrémité carbonyle de l'acide glutamique [Breddam et Meldal 92]. En tampon bicarbonate d'ammonium et acétate d'ammonium, les premières études sur l'enzyme avaient conclu à une spécificité restreinte à l'acide glutamique [Houmard et Drapeau 72]. Cependant, des travaux ultérieurs ont montré que l'enzyme est inhibée par des anions monovalents. Dans ce cas, l'hydrolyse des liaisons impliquant un acide aspartique est très lente et difficilement détectable. L'enzyme n'a pas une spécificité restreinte, elle est juste inhibée.

L'endoprotéinase Glu-C a été choisie car elle n'hydrolyse pas au niveau des acides aminés positifs ni au niveau des acides aminés hydrophobes. Ainsi, l'obtention de peptides hydrophobes et positifs est envisageable en solution et davantage encore dans le cas de l'hydrolyse de l'hémoglobine adsorbée sur le support. Les segments hydrophobes et positifs interrompus par un acide aminé négatif vont être hydrolysés en solution. Par contre, l'adsorption possible d'un tel segment sur le support (hydrophobe et anionique) peut mener à une protection vis-à-vis de l'enzyme.

#### **La chymotrypsine (EC 3.4.21.1).**

La chymotrypsine bovine a fait l'objet de très nombreuses études. Elle est synthétisée dans le pancréas, sous la forme d'un précurseur inactif le chymotrypsinogène. Celui-ci, sous l'action d'enzymes protéolytiques du petit intestin, est converti en chymotrypsine. La chymotrypsine a une masse moléculaire de 25 000 Da et contient 241 acides aminés répartis en trois chaînes polypeptidiques. Son pH optimum est de 7,5. La présence dans son site actif d'un résidu de serine indispensable a permis de la classer parmi les protéases à serine [Boyer 71].

La chymotrypsine catalyse prioritairement l'hydrolyse des liaisons impliquant l'extrémité carbonyle d'un acide aminé aromatique [Boyer 71]. L'hydrolyse de liaisons impliquant d'autres résidus comme la leucine ou l'asparagine est faite plus lentement [Boyer 71].

La chymotrypsine a été choisie car sa spécificité permet d'obtenir des peptides chargés. L'hydrolyse des liaisons peptidiques impliquant un acide aminé hydrophobe peut sembler au premier abord contraire au but recherché (peptide amphiphile), pour une hydrolyse en solution. Afin d'orienter la protéolyse, nous utiliserons un support fortement hydrophobe, car des interactions support-substrat devraient permettre la protection de certains sites hydrophobes. Nous espérons une action protectrice du support et un enrichissement de l'hydrolysate en peptides hydrophobes cationiques.



## Première partie

Préparation et caractérisation  
d'un peptide amphiphile à partir  
d'un hydrolysat pepsique



## Introduction

Le premier objectif de cette partie est de préparer, à partir d'un hydrolysate pepsique d'hémoglobine bovine, un peptide amphiphile ayant la capacité de transporter la protoporphyrine IX (PPIX). Cet hydrolysate a déjà donné lieu à l'isolement de nombreux peptides actifs dont un, capable de transporter la porphyrine [Cempel et coll. 95]. Nous avons recherché un peptide ayant une capacité de transport supérieure. Nous avons, de plus, mis au point une méthode de purification à l'échelle préparative afin d'augmenter sa production. La première étape est une chromatographie d'échange d'ions à l'échelle pilote permettant de fractionner de grandes quantités d'hydrolysats. Elle a été substituée à la méthode de chromatographie de tamisage moléculaire classique qui limite fortement les quantités d'hydrolysats à séparer. Cependant, les fractions obtenues sont très chargées en sels. Cette première étape a donc été couplée à une électrodialyse, également à l'échelle pilote, afin d'éliminer la plupart des sels. Enfin, la seconde étape est une chromatographie de phase inverse classique C18 menant à l'isolement d'un peptide pur à partir d'une fraction obtenue par chromatographie d'échange d'ions. Après la mise au point du protocole, les deux chromatographies successives ont permis d'isoler un peptide pur représentant 4% de l'hydrolysate total. Il s'agit du peptide 1-23 $\alpha$  correspondant aux 23 premiers acides aminés de la chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine bovine.

Le deuxième objectif de cette partie est d'étudier le complexe formé entre le peptide isolé précédemment et la PPIX. Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'état d'agrégation ainsi que la structure du peptide 1-23 $\alpha$  en solution. Certains peptides amphiphiles peuvent également posséder un rôle antibactérien, aussi en première approche d'étude dans ce domaine nous avons testé le pouvoir lytique du peptide 1-23 $\alpha$  vis-à-vis de liposomes dont la composition lipidique est identique à celle de la membrane d'E.coli. Certains peptides antibactériens sont également lytiques pour les erythrocytes mais dans la majorité des cas, ils sont inactifs sur les membranes eucaryotes. Dans un deuxième temps, les solutions de porphyrine ont également été étudiées. Cette molécule est très insoluble et a une forte tendance à la polymérisation. Nous avons cherché à réduire ce phénomène de polymérisation afin d'obtenir des complexes ayant la plus petite taille possible ainsi qu'une meilleure définition de l'état de la porphyrine. Ensuite, la capacité de transport du peptide 1-23 $\alpha$  vis-à-vis de la porphyrine a été calculée. La caractérisation du complexe a été effectuée par l'étude des modifications des spectres de la porphyrine seule et complexée au peptide. Le calcul de la constante d'affinité du peptide pour la porphyrine a été effectué. Enfin, comme ces complexes sont destinés à une utilisation pharmacologique dans le cadre de la photo-chimiothérapie, nous avons souhaité savoir si la présence du peptide ne nuisait pas à l'interaction de la PPIX avec les membranes biologiques. Nous avons donc cherché à connaître l'affinité entre la PPIX et des lipides membranaires en vue de la comparer avec celle du peptide au sein du complexe peptide-PPIX.



# Chapitre 1

## Matériel et méthodes



## 1 Obtention des hydrolysats

L'hémoglobine a subi une protéolyse totale à pH2 dans un réacteur à ultrafiltration. Cet hydrolysats a ensuite été décoloré par la magnésie, déssalé par électrodialyse et atomisé [Piot et coll. 88]

## 2 Chromatographie d'échange d'ions

La chromatographie d'échange d'ions au stade analytique a été réalisée en utilisant le système FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography), (Pharmacia Biotech, Orsay, France). La colonne est de type monoQ HR 5/5 de taille 5mmx50mm, et la taille des particules est de 10 $\mu$ m. L'équipement consiste en:

- un contrôleur GP 250 plus
- deux pompes P500
- un détecteur Uvicord SII à 226 nm
- un enregistreur REC 101

La montée en échelle de la chromatographie d'échange d'ions a été effectuée avec une colonne pré-packée de 20 cm<sup>3</sup> et de dimensions 16mmx100mm contenant le gel Q Sepharose Fast Flow (milieu bio-compatible). Ensuite une colonne XK 50 (50mmx300mm) contenant un volume de 380 cm<sup>3</sup> du même gel a été utilisée, et enfin une colonne BPG 200 (200mmx750mm) d'un volume de gel de 6120cm<sup>3</sup> avec un système Bio Pilot Liquid chromatography (Pharmacia) constitué par:

- un contrôleur C3 plus
- Un conductimètre
- un détecteur Uvicord SII à 226 nm
- un équipement industriel
- une pompe péristaltique (Watson Marlow)

Pour l'optimisation du pH, des échantillons d'hydrolysats peptidique (1mg dans 100 mm<sup>3</sup> de tampon) ont été injectés sur la colonne monoQ préalablement équilibrée dans le même tampon A. Six solutions tampons A ont été utilisées:

- acétate d'ammonium 20 mM à pH 6
- acétate d'ammonium 20 mM à pH 7
- Tris/HCl 20 mM à pH 8
- Tris/HCl 20 mM à pH 9
- éthanolamine/HCl 20 mM à pH 10
- éthanolamine/HCl 20 mM à pH 10,5

Le tampon B utilisé pour l'élution est composé du tampon A additionné de 1 M en NaCl. Le débit appliqué est de 1 ml/min. Après 4 minutes de lavage isocratique avec le tampon A, l'élution est réalisée en utilisant un gradient linéaire de 0 à 0,5 M en NaCl en 20 minutes et ensuite 4 minutes d'élution isocratique avec le tampon B. Après chaque chromatographie, la colonne est rééquilibrée pendant 15 minutes avant l'injection de l'échantillon suivant.

Pour l'optimisation du gradient, une élution isocratique avec le tampon A a été suivie par un gradient linéaire A-B (0,55 M NaCl/min) pendant 160 minutes et ensuite un gradient linéaire A-B (2 M NaCl/min) pendant 80 minutes. Enfin, un lavage isocratique avec du tampon contenant 0,35 M et 1 M en NaCl ont été effectués avant de rééquilibrer la colonne avec du tampon A. Le débit est de 0,5 ml/min.

### 3 CLHP de phase inverse

L'analyse des peptides des différentes fractions séparées en chromatographie d'échange d'ions a été réalisé par RP-CLHP.

La chaîne CLHP se compose de:

- un contrôleur LKB 2150
- un détecteur LKB 2510 Uvicord SD à 226 nm
- un intégrateur LKB 2152

La séparation a été réalisée en utilisant une colonne Vydac C18 de dimensions 250mmx4,6mm. Le tampon d'élution A est l'acétate d'ammonium 10 mM à pH 6 et le tampon d'élution B est composé d'un mélange de tampon A et d'acétonitrile (20/80)(V/V). Le gradient appliqué est de 0 à 50% sur une période de 80 minutes et le débit est de 0,8 ml/min. Chaque fraction éluée de la colonne est collectée manuellement pour une analyse en spectrométrie de masse.

### 4 Electrodialyse

Le déssalage de fractions de 2 l a été réalisée par électrodialyse (EUR 2D-5P11, eurodia industries A.A, Wissous, France). L'élimination du sel a été vérifiée en suivant la baisse d'intensité (3,1 à 0,1 A) pour un voltage constant imposé de 18V. La conductivité de la solution a été mesurée avant et après électrodialyse. La concentration en NaCl a été déterminée en utilisant une courbe étalon en NaCl, mais a également été vérifiée par la méthode de Mohr (précipitation par  $\text{AgNO}_3$ ).

### 5 Préparation des solutions de protoporphyrine IX

De nombreuses solutions de protoporphyrine IX ont été utilisées. Elles ne sont pas toutes identiques, tant par la composition du milieu (aqueux ou organique) que par la méthode de préparation ou la forme de la porphyrine utilisée (acide ou basique).

## 5.1 Solutions de porphyrine en milieux aqueux

Le calcul de la constante de dimérisation de la PPIX, ainsi que celui de la constante d'affinité entre le peptide et la PPIX ont nécessité des solutions de porphyrine en milieu aqueux. La PPIX sous forme acide est la moins soluble et elle est en général utilisée pour cette propriété afin de préparer le complexe. Il a été impossible d'obtenir des spectres de fluorescence reproductibles avec des solutions de PPIX sous forme acide. C'est pourquoi la PPIX sous forme basique a été choisie dans ce cas. Elle présente une solubilité un peu plus élevée sous cette forme et permet d'obtenir des solutions présentant des spectres de fluorescence reproductibles.

### Solutions de PPIX pour les études de spectrométrie de différence

La PPIX acide est dissoute dans un volume minimum d'ammoniaque 0,1 M. Une dilution est ensuite effectuée avec de l'eau, et l'acétate d'ammonium est ajouté de façon à obtenir une concentration finale de 10 mM en tampon. Le pH est alors ajusté à 7 avec de l'acide acétique et le volume complété, pour obtenir une solution de PPIX à 10  $\mu\text{M}$ .

### Solutions de PPIX pour les études de spectrofluorimétrie

La PPIX sous forme basique est dissoute dans un volume minimum d'ammoniaque 0,1 M. Une dilution est effectuée avec de l'eau, et l'acétate d'ammonium est ajouté de façon à obtenir une solution finale de 10 mM en tampon. Le pH est alors ajusté à 7 avec de l'acide acétique et le volume complété pour obtenir une solution à 2,5  $\mu\text{M}$ . Cette solution est protégée de la lumière pendant toute sa préparation et ne peut être stockée.

Pour le calcul de la constante de dimérisation de la PPIX, une solution stock intermédiaire à 0,6  $\mu\text{M}$  est réalisée. A partir de cette solution, une gamme de dilution de 0 à 0,6  $\mu\text{M}$  est effectuée.

Pour le calcul de la constante de dimérisation en présence de peptide, nous avons réalisé une solution mère intermédiaire à 0,6  $\mu\text{M}$  en PPIX et 6  $\mu\text{M}$  en peptide (soit dix fois plus de peptide que de PPIX en nombre de moles). A partir de cette solution mélange, la même gamme de dilution que précédemment a été réalisée.

## 5.2 Solutions de PPIX en milieu organique

Les solutions de PPIX en milieu organique ont surtout été utilisées pour préparer le complexe peptide-porphyrine.

### Solution de PPIX pour les études de spectrométrie

La PPIX sous forme acide est dissoute dans un volume minimum d'ammoniaque 0,1 M. Une dilution est ensuite effectuée avec de l'eau et le tampon acétate d'ammonium est ajouté de façon à obtenir une concentration finale en tampon de 10 mM. Le pH est alors ajusté à 7 avec de l'acide acétique et le volume est complété pour obtenir

une solution de porphyrine à 20  $\mu\text{M}$ . Une dilution au demi est enfin effectuée avec de l'acétone pour obtenir une solution de PPIX 10  $\mu\text{M}$  en tampon/acétone 50/50 (V/V).

## Solution de PPIX pour la préparation du complexe

Pour la préparation du complexe, deux types de solutions ont été utilisées. Leur concentration en PPIX est identique, mais le mode de préparation est différent.

Dans le premier cas, 5,3 mg de PPIX sous forme acide sont dissous dans 10 ml de tampon acétate d'ammonium 10 mM à pH 7. Une sonication de 15 minutes est effectuée afin de séparer les agrégats. 5 ml d'acétone sont ajoutés, et un deuxième cycle de sonication est effectué. La solution est complétée à 20 ml avec de l'acétone. Elle nécessite une centrifugation car des insolubles sont visibles. Le surnageant est récupéré et le culot est remis en suspension dans 10 ml de tampon acétate d'ammonium. Le même protocole que précédemment est appliqué. Autant de cycles que nécessaire pour solubiliser les 5,3 mg de départ sont effectués. Finalement, une solution soluble de 100 ml est obtenue.

Dans le deuxième cas, les 5,3 mg de PPIX sont dissous directement dans 50 ml de tampon acétate d'ammonium. Une sonication de 15 minutes est effectuée et 25 ml d'acétone sont ajoutés. Après un deuxième cycle de sonication, le volume est ajusté à 100 ml. Cette solution est donc de même concentration que la précédente, mais a été réalisée en une seule étape.

### 5.3 Solubilité de la PPIX dans différents tampons et milieux organiques

La solubilité de la PPIX a été testée dans différents tampons et également dans différents milieux organiques. La préparation est, dans chaque cas, rigoureusement identique. La PPIX est d'abord dissoute dans le milieu aqueux tamponné (la moitié du volume final) et soniqué 15 minutes. Ensuite, si le milieu est purement aqueux, du tampon à raison d'un quart du volume final est ajouté, et une autre étape de sonication est effectuée. Le volume est enfin ajusté en fiole. Une centrifugation permet d'éliminer les insolubles. Si le milieu est organique, le même protocole est utilisé en remplaçant le tampon par le solvant. S'il s'agit d'un mélange tampon/milieu organique 50/50 (V/V) la première étape est réalisée en tampon, et la seconde permet d'ajouter le solvant.

## 6 Méthode de formation du complexe

La méthode de formation du complexe peptide-porphyrine mise au point précédemment au laboratoire par Cempel et coll. [Cempel et coll. 95], nécessitait une quantité de 50 mg de peptide. La méthode mettait en oeuvre des volumes compatibles avec l'utilisation de fioles jaugées. Un peptide pur étant très précieux, nous avons décidé de miniaturiser la méthode. Le principe est toujours le même. Le peptide et la PPIX sont mis en contact dans 2 ml d'une solution 50/50 de tampon/acétone

(V/V). L'acétone est évaporé sous vide, puis la solution est centrifugée pour culotter la PPIX non solubilisée. Le surnageant est récupéré puis lyophilisé. La poudre obtenue est alors remise en suspension dans 1 ml d'eau si nous utilisons le tampon phosphate non volatil, ou dans 1 ml de tampon acétate d'ammonium qui lui est volatil. Cette technique permet de réduire la quantité de peptide à 0,5 mg par point contre 10 précédemment.

## 7 Chromatographie d'exclusion

La séparation en chromatographie de tamisage moléculaire est basée sur la masse moléculaire des composés. Elle n'est, en général, pas utilisée pour la détermination de masse moléculaire des peptides car la précision n'est pas suffisante. La masse des peptides est faible, inférieure à 10 000 Da et les gels de tamisage moléculaire surtout efficaces au-dessus de cette zone. Une nouvelle colonne a récemment été mise au point par la société Pharmacia (Superdex) pour séparer les peptides possédant des masses moléculaires inférieures à 7500 Da. Elle est reliée à une chaîne FPLC, ce qui augmente la résolution normalement obtenue avec une chaîne basse pression.

Le matériel utilisé (Pharmacia) est le suivant :

- Un contrôleur de type GP 250
- Deux pompes P500
- Un détecteur Uvicord SII équipé d'un filtre à 226 nm
- Un enregistreur REC 101
- Une colonne Superdex G HR 10-30 contenant 24 ml de volume de gel.

La colonne est étalonnée avec des peptides purs de masses moléculaires différentes dans le tampon acétate d'ammonium 10 mM pH 7. Le débit appliqué est de 0,5 ml/min, les volumes injectés sont de 50  $\mu$ l, et les concentrations en peptide sont à 1 % (P/V). Les peptides étalons sont les suivants :

Sérum albumine 67 000 Da  
Chaîne A de l'insuline bovine 2531,6 Da  
Angiotensine II 1046,2 Da  
 $\beta$  NAD 663,4 Da  
Gluthation 307,3 Da

La masse moléculaire d'un composé inconnu peut être déterminée grâce à la courbe donnant le  $K_{av}$  en fonction du log de la masse moléculaire du composé.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (4)$$

ou  $V_e$  est le volume d'élution,  $V_0$  le volume mort et  $V_t$  le volume totale de la colonne.

## 8 Préparation des liposomes

Nous avons choisi pour les liposomes, une composition en lipides semblable à ceux de la membrane d'*Escherichia coli*.

- Phosphatidyl éthanolamine 1 mg (100  $\mu$ l)
- Phosphatidyl glycérol 0,3 mg (30  $\mu$ l)
- Cardiolipine 0,15 mg (30  $\mu$ l)

Dans un tube à hémolyse en verre, 840  $\mu$ l de chloroforme sont ajoutés à ce mélange de lipides. Un séchage sous azote permet d'obtenir un film lipidique sur la paroi du tube. Les lipides sont remis en solution dans 1 ml de tampon Tris/HCl 20 mM à pH 7 en vortexant longuement. Ensuite 5 cycles de congélation/décongélation sont effectués. La dernière étape consiste à calibrer les liposomes par extrusion à travers une membrane de polycarbonate COSTAR (ref 110405 de 13 mm de diamètre avec des pores de 0,1  $\mu$ m). La concentration des lipides pour l'extrusion doit être typiquement inférieur à 10  $\mu$ moles/ml, sinon la pression requise pour la filtration est trop élevée. Cinq filtrations à travers la membrane ont été effectuées jusqu'à l'obtention d'une solution transparente.

Nous avons également utilisé des liposomes qui contiennent de la carboxyfluoresceine. Dans ce cas, le protocole diffère du précédent à partir du séchage des lipides sous azote. Les lipides doivent ici être remis en solution dans 1 ml de tampon Tris/HCl 20 mM à pH 7 contenant de la carboxyfluoresceine 100 mM. La carboxyfluoresceine est insoluble à pH acide et il est nécessaire de réajuster le pH. Il est également nécessaire après l'extrusion, d'effectuer une chromatographie d'exclusion afin de séparer les liposomes de la carboxyfluoresceine non encapsulée. Le gel de chromatographie utilisé est de type Sephadex G75. La colonne a un diamètre de 1 cm et une hauteur de gel de 20 cm. La détection se fait à 280 nm, et un volume de 1 ml par tube est récolté. Le débit est de 4 ml/h. Lors de la chromatographie, deux espèces sont séparées et sont éluées en deux pics. Le premier pic exclu correspond aux liposomes, et le deuxième pic à la carboxyfluoresceine non encapsulée. Les liposomes ainsi obtenus peuvent se conserver environ une semaine à 4° C sans que la carboxyfluoresceine ne soit libérée.

### 8.1 Mesure de la concentration en lipides des liposomes

Pour préparer les liposomes, nous avons utilisé des lipides d'origine naturelle extraits de jaune d'œufs. Leur masse moléculaire est inconnue puisque les acides gras les composant ne sont pas déterminés. Afin d'avoir accès à la concentration en lipides des liposomes, le phosphore a été dosé. Le dosage se fait en deux étapes, la première étant la minéralisation, et la seconde le dosage colorimétrique.

#### *Minéralisation*

Dans un matra, 0,5 ml de liposomes sont introduits, ainsi que 1 ml d'acide perchlorique. Le matra est placé sur une rampe de minéralisation dont la température monte progressivement jusqu'à 230°C. Après une demi-heure à température maximum, le chauffage est stoppé.

### *Dosage du phosphore*

Une gamme étalon de phosphore sous forme de phosphate monopotassique ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) de 0 à 120  $\mu\text{g}$  de phosphore par tube est réalisée selon la méthode de Briggs.

La totalité des liposomes minéralisés est récupérée et placée dans un tube. Tous les tubes, (gamme + liposomes) sont complétés à 6 ml avec de l'eau. On ajoute ensuite dans l'ordre les réactifs suivants :

- 2 ml molybdate d'ammonium.

25 g de molybdate d'ammonium sont mis en solution pour obtenir un volume de 300 ml. 75 ml d'acide sulfurique concentré sont ajoutés à 125 ml. Après mélange de ces deux préparations, la solution est prête à l'emploi.

- 1ml de sulfite de sodium à 20%.

- 1ml de solution d'hydroquinone.

1 g d'hydroquinone est complété à 100 ml, puis on ajoute 2 gouttes d'acide sulfurique concentré.

Les tubes sont placés à l'obscurité pendant une demi-heure pour que la coloration puisse se développer. Une lecture de la densité optique est effectuée à 725 nm. Les résultats obtenus pour la gamme étalon sont rassemblés dans la figure 6.

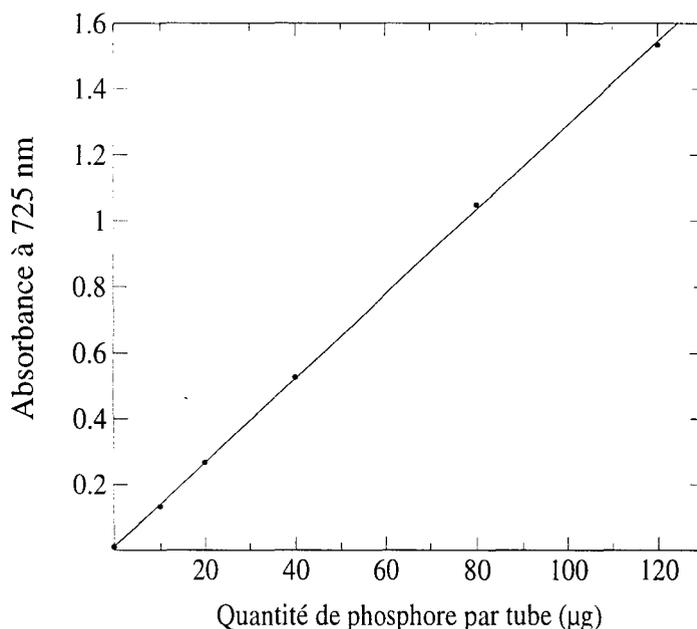


FIGURE 6 – Gamme étalon obtenue pour le dosage du phosphore.

### *Calcul de la concentration en lipides de la solution de liposomes*

Nous avons trois composants dans les liposomes en proportions différentes, qui ne contiennent pas tous un atome de phosphore par molécule de lipide.

- 1,05 mg de phosphatidyl éthanolamine dont chaque molécule contient 1P
- 0,3 mg de phosphatidyl glycérol dont chaque molécule contient 1P
- 0,3 mg de cardioline dont chaque molécule contient 2P

Dans une solution de concentration  $x$  de phosphore déterminée par dosage, les deux premiers composants représentent 83% des lipides et renferment 1P. Le troisième composant représente 17% des lipides et renferme 2P. En considérant que les masses moléculaires de ces composés sont proches, la concentration en lipide peut être déterminée par la relation suivante :

$$C_{lip} = x \left( 0,83 + \frac{0,17}{2} \right) \quad (5)$$

où  $C_{lip}$  est la concentration en lipide recherchée exprimée en mole.l<sup>-1</sup>, et  $x$  la concentration en phosphore en mole.l<sup>-1</sup>.

## **9 Détermination du pourcentage de lyse des liposomes**

De la carboxyfluoresceine 100 mM est encapsulée dans les liposomes. Si le peptide est capable de lyser les liposomes, la carboxyfluoresceine encapsulée sera libérée dans le milieu extérieur et sera détectée par spectrofluorimétrie. Le témoin correspondant à une lyse totale des liposomes est obtenu grâce à l'action d'un détergent, le triton X100 à une concentration de 0,2 mg/l. Le calcul de l'activité lytique d'un peptide est défini par l'expression suivante :

$$L = \frac{F - F_0}{F_T - F_0} \quad (6)$$

ou  $L$  représente le pourcentage de lyse des liposomes,  $F$  l'intensité de fluorescence maximale obtenue en présence du peptide,  $F_0$  l'intensité de fluorescence initiale des liposomes en l'absence du peptide, et  $F_T$  l'intensité maximale de fluorescence obtenue pour 100% de lyse en présence du triton X100.

## **10 Analyse des peptides par spectrométrie de masse en désorption laser**

Le contenu de chacune des fractions obtenues par CLHP de phase inverse a été caractérisé par spectrométrie de masse afin de déterminer la masse du ou des peptides présents. La technique d'ionisation par désorption laser a été retenue parce qu'elle permet d'analyser les mélanges de peptides et qu'elle est moins sensible à la

présence de sels dans le milieu que la technique FAB (bombardement par atomes rapides) ou la technique de désorption par plasma. D'autres part, l'interprétation des spectres est facilitée par l'absence de fragments. Les spectres de masse ont été réalisés dans le centre commun de mesure de spectrométrie de masse de l'Université de Lille I, avec la collaboration du Dr. Guy Ricard.

## 10.1 Principe de la désorption laser

Un laser émettant un rayonnement dans l'ultraviolet (UV) ou infrarouge (IR) est utilisé pour désorber et ioniser des molécules enrobées dans une matrice. Le mélange peptide matrice forme, lors du séchage de l'échantillon sur la cible, une couche monocristalline. La matrice a une double fonction : absorber l'énergie du laser et isoler les molécules de l'échantillon les une des autres pour éviter la formation de complexes de taille trop importante. Le laser produit un bref rayonnement UV pulsé de 5 à 20 ns qui va irradier l'échantillon. L'énergie transmise par ce rayonnement est absorbée par la matrice. Elle est ensuite restituée en partie et transférée à l'échantillon qui sera alors volatilisé et ionisé par des processus photochimiques. Il y a en général formation d'ions pseudomoléculaires mono  $(M+H)^+$  et doublement chargés  $(M+2H)^{2+}$ ,  $M$  correspondant à la masse de la molécule étudiée. Des ions de cationisations  $(M+Na)^+$ ,  $(M+K)^+$ , et  $(M+Na+K-H)^+$  sont également détectables.

## 10.2 Conditions opératoires

### *Appareillage*

Les spectres de masse ont été réalisés sur un spectromètre de masse VISION 2000 MALDI TOF (FINNIGHAN MAT) de résolution de masse 2000. Le potentiel d'accélération a été fixé à 5 kV. La source de rayonnement est un laser UV à azote ( $\lambda=337$  nm) de pulse 3 ns et l'analyseur est du type temps de vol.

### *Matrice*

La matrice utilisée (absorbant le rayonnement UV) est constituée d'une solution d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (ou DHB) à 10 mg/ml dans un mélange 4/1 (V/V) d'eau et d'acétonitrile.

### *Obtention et traitement du spectre de masse*

20 tirs sur chaque cible ont, en général, été accumulés afin de produire le spectre de masse final. Un logiciel de traitement des spectres a permis d'intégrer chaque pic détecté et de déterminer ainsi les masses correspondantes. La précision sur la masse est de 0,01%.

## 11 Méthodes spectroscopiques

### 11.1 Spectroscopie de différence en UV-visible

Les spectres de différence sont enregistrés avec un spectrophotomètre de type UVIKON 930 de la société Kontron Instruments. Des incréments de  $3\mu\text{l}$  d'une solution de peptide ( $9,6 \cdot 10^{-3}\text{M}$ ) sont additionnés à 3 ml de PPIX dans la cuve échantillon (concentration en peptide variant de 9,6 à  $67\mu\text{M}$ ). L'équivalent en tampon est ajouté dans la cuve référence. Après chaque addition, le spectre est enregistré. Des spectres absolus sont également enregistrés au début et à la fin de chaque expérience.

### 11.2 Spectroscopie de fluorescence

Les études ont été réalisées avec un spectrofluorimètre LS 50B Perkin-Elmer. L'excitation du tryptophane contenu dans le peptide se fait à 280 nm, et l'émission est enregistrée entre 300 et 400 nm. La PPIX est excitée à 340 nm et l'émission est enregistrée entre 550 et 750 nm. Le spectre présente un premier maximum à 625 nm, et un second à 685 nm. La carboxyfluoresceïne est excitée à 470 nm, et le spectre d'émission est enregistré entre 450 et 700 nm.

### 11.3 Spectroscopie Infra-Rouge à transformée de Fourier

#### *Principe*

Une protéine est constituée d'un enchaînement covalent d'acides aminés reliés entre eux par la liaison peptidique plane CO-NH. Les liaisons hydrogènes que peuvent former les groupements C=O et N-H des liaisons peptidiques les uns avec les autres imposent une architecture locale particulière à la chaîne polypeptidique. La structure secondaire ainsi formée est principalement de trois types : hélices  $\alpha$ , feuillets  $\beta$ , coude et forme indéterminée.

La spectroscopie infra-rouge donne accès aux vibrations moléculaires de la liaison peptidique. En fonction de la structure secondaire, ce groupement ne forme pas les mêmes liaisons hydrogène ce qui mène à différents modes de vibration. La bande amide I est observée entre  $1620$  et  $1700\text{ cm}^{-1}$ . Elle est due à 80% aux vibrations d'élongation du groupement C=O, et à 20% à la déformation de la liaison N-H. La bande amide II observable dans la région  $1500$ - $1580\text{ cm}^{-1}$  est majoritairement attribuée aux déformations de la liaison N-H. Une bande amide est constituée des contributions correspondant à tous les éléments de structure secondaire présents dans la protéine (hélices  $\alpha$ , feuillets  $\beta$ , coude, structure non ordonnées). A cause de la largeur spectrale due à l'amortissement et aux perturbations environnantes, il est difficile d'observer directement les contributions de chaque type de structure secondaire. L'autodéconvolution de Fourier ou les dérivés secondes des spectres permettent d'accentuer les extrema du spectre et d'accéder aux pourcentages globaux de chaque élément de structure secondaire de la protéine.

*Réalisation des spectres IR-TF (infra-rouge à transformée de Fourier) du peptide 1-23 $\alpha$*

Les spectres IR-TF ont été effectués au L.A.S.I.R. (Lille I) en collaboration avec le professeur J.P. Huvenne et M. C. Ruckebusch. Les spectres infra-rouge ont été réalisés en transmission (après séchage de la solution de peptide sur des pastilles de silicium) avec un spectrophotomètre Brucker IFS-48. Le spectre représente l'accumulation de 200 enregistrements avec une résolution de  $4\text{ cm}^{-1}$  dans la gamme  $4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$ . Les spectres à transformée de Fourier ont été obtenus à l'aide du logiciel standard Brüker.

D'après Aichun et coll. [Aichun et coll. 90], la bande II ( $1660\text{ cm}^{-1}$ ) correspond à la structure hélice  $\alpha$ , alors que la bande amide III ( $1620\text{ cm}^{-1}$ ) est caractéristique de la structure en feuillet  $\beta$ . La bande I ( $1680\text{ cm}^{-1}$ ) serait caractéristique des conformations  $\beta$  antisymétriques. Les proportions relatives d'hélice  $\alpha$ , de feuillet  $\beta$  et de coude ont été déterminées d'après l'aire des pics d'adsorption sur les spectres dérivés.



## Chapitre 2

# Préparation et caractérisation du peptide 1-23 $\alpha$



## 1 Isolement et préparation du peptide 1-23 $\alpha$

L'hydrolysate peptidique utilisé pour la recherche d'un nouveau peptide amphiphile a déjà fait l'objet de nombreuses études au laboratoire. A partir de celui-ci, deux peptides à activité opioïde [Piot et coll. 92b], un peptide potentialisateur de la bradykinine [Piot et coll. 92a] et un peptide amphiphile transporteur de la porphyrine [Cempel et coll. 95] ont été isolés. Cet hydrolysate a été obtenu par hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine à pH 2 et 40 °C, dans un réacteur ouvert couplé à une membrane d'ultrafiltration, à l'échelle pilote. Il a ensuite été décoloré par adsorption de l'hème résiduel sur de la magnésie, puis dessalé par électrodialyse et enfin concentré et séché en poudre par atomisation [Piot et coll. 88].

La production d'un peptide pur à l'échelle préparative à partir d'un hydrolysate protéique complexe comme celui-ci, comprenant plus de 100 peptides, est difficile et nécessite plusieurs étapes de chromatographie. Au laboratoire, une chromatographie d'exclusion était pratiquée comme méthode de pré-fractionnement, mais les quantités d'hydrolysate traitées étaient faibles en comparaison des quantités nécessaires pour l'étape de CLHP de phase inverse préparative, menant à l'isolement du peptide pur.

La chromatographie d'exclusion stérique étant l'étape limitante de ce processus, nous avons cherché à améliorer la purification en vue d'une production à plus grande échelle. La chromatographie d'échange d'ions permet le traitement de grandes quantités d'échantillon, car sa capacité dépend du nombre de groupements chargés sur le gel et non du volume injecté comme dans le cas de la chromatographie d'exclusion. Cependant, l'utilisation de la chromatographie d'échange d'ions était jusqu'à présent limitée par la présence de sels dans les fractions éluées et par la difficulté de dessaler des peptides. Nous avons donc développé une méthode de pré-fractionnement de l'hydrolysate peptidique complexe par chromatographie d'échange d'ions suivi d'une électrodialyse à l'échelle pilote permettant le dessalage des fractions [Kosciarz et coll. 98].

Les conditions chromatographiques d'échange d'ions ont été développées sur une colonne monoQ de 1 ml, puis extrapolées par une montée en échelle linéaire à partir d'une colonne semi-préparative de 20 ml jusqu'à une colonne de 6 l. Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence du pH du tampon d'éluion sur la fixation des peptides et leur séparation au niveau analytique sur la colonne de 1 ml. Seul un pH très alcalin de 10,5 provoque la fixation de pratiquement tous les peptides. La meilleure résolution est également obtenue à ce pH. C'est le tampon éthanolamine 20 mM à pH 10,5 qui a été retenu car il est volatil et permet des changements de milieux aisés pour les étapes ultérieures.

Puis, nous avons étudié différents paramètres tels que le gradient d'éluion, le débit et la quantité d'hydrolysate injecté, permettant d'obtenir les meilleures séparation et résolution de l'hydrolysate. L'influence du gradient sur la séparation des peptides a été optimisée sur la colonne de 1 ml et les paramètres ont été transposés au gel Q Sepharose fast flow dans la colonne semi-analytique de 20 ml. La meilleure résolution est obtenue par passage d'un volume de tampon initial permettant d'adsorber le maximum de peptides sur la matrice, suivi d'un gradient lent à 0,05 mM de NaCl par minute et d'un gradient plus rapide à 2 mM de NaCl par mi-

nute. 12 fractions sont ainsi séparées (figure 7). Un débit lent de 0,5 ml/min permet la meilleure séparation et une chromatographie complète en 6 h. Même si la qualité de la matrice autorise des débits plus élevés pour les protéines, le gain de temps ne contrebalance pas la perte de résolution pour les peptides. La quantité maximale d'hydrolysats injectés est de 25 mg, au-delà, il y a une réorganisation de la distribution des pics, et la résolution est affectée.

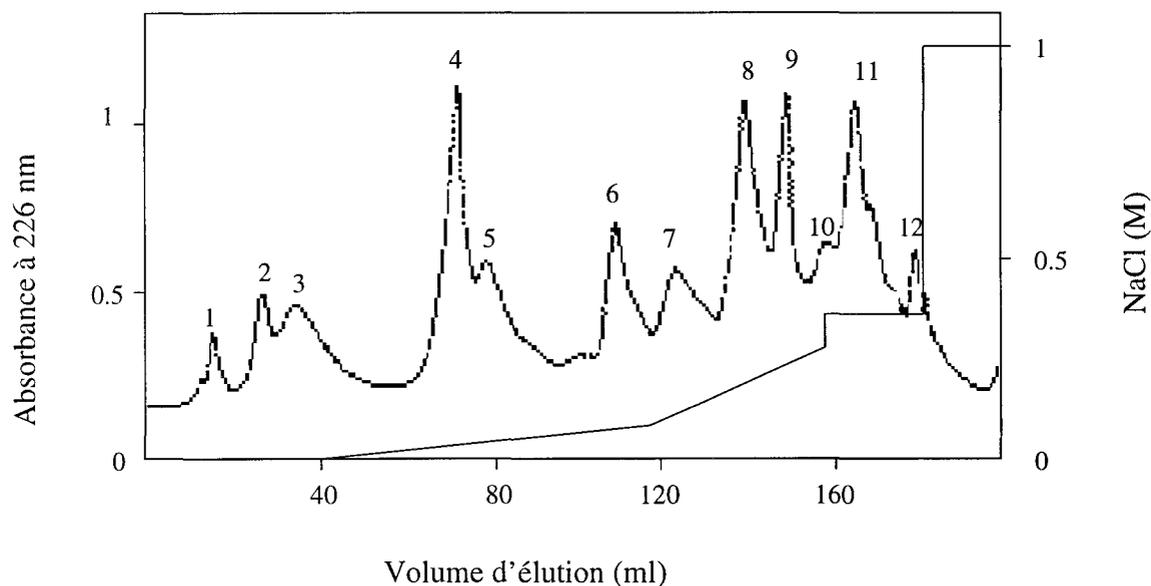


FIGURE 7 - Profil d'élution obtenu en gradient sur la colonne Q Sepharose fast flow de 20 ml. Après 40 ml d'élution isocratique avec le tampon sans NaCl, 80 ml d'un gradient linéaire jusqu'à 0,09 mM sont appliqués puis 40 ml d'un gradient linéaire plus rapide jusqu'à 0,25 mM. Deux paliers isocratiques sont ensuite appliqués à 0,35 mM et 1 M en NaCl respectivement. Le débit est de 0,5 ml/min.

Afin de vérifier que le processus de montée en échelle permet d'obtenir le même degré de pureté des produits, nous avons dans un deuxième temps choisi un peptide marqueur. Les 12 fractions ont été analysées en CLHP de phase inverse dans le but d'identifier un peptide hydrophobe et majoritaire. La fraction 7, élue à 0,054 mM en NaCl a été retenue car elle contient un peptide élué à 23 % d'acétonitrile représentant 20 % de la fraction peptidique. Le peptide récolté a été analysé par spectrométrie de masse à désorption laser et par fluorescence. Sa masse moléculaire est de 2235,18 Da et il possède un tryptophane. D'après la séquence de l'hémoglobine bovine, ce peptide correspond aux 23 premiers acides aminés de la chaîne  $\alpha$ .

A l'échelle pilote, utiliser une élution isocratique par palier est plus pratique qu'un gradient. Après un palier avec un tampon sans NaCl pour adsorber les peptides, 2 autres paliers ont été choisis (0,025 et 0,045 mM) pour éliminer le maximum de peptides précédant la fraction 7 (palier à 0,054 mM). Enfin, un palier à 1 M en sel permet de libérer le reste de l'hydrolysats et de régénérer la colonne de 20 ml. Cette chromatographie par palier permet une meilleure résolution, en particulier pour la fraction 7 (figure 8). Le peptide 1-23  $\alpha$  représente environ 30 % de la fraction

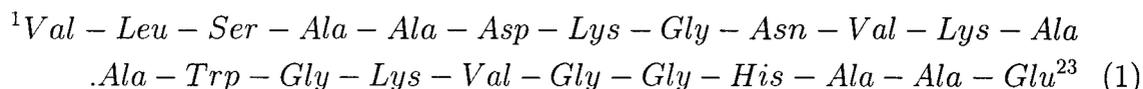
peptidique.

La montée en échelle du processus chromatographique a été réalisée à partir de la colonne de 20 ml jusqu'à une colonne de 6130 ml avec une colonne intermédiaire de 380 ml. Il est nécessaire de maintenir un débit linéaire constant de 15 cm.h<sup>-1</sup>, pour augmenter le débit de façon proportionnelle à la section de la colonne et aussi d'augmenter la masse d'échantillons et les volumes d'élution de chaque palier proportionnellement au volume de gel. A l'échelle pilote, la résolution du chromatogramme est un peu modifiée, et il y a une augmentation de la quantité de peptide 1-23  $\alpha$  et de sa pureté dans la fraction 7. Sur la colonne de 6 l, 7,6 g d'hydrolysate en solution peuvent être injectés. La fraction 7, collectée en 10 h de chromatographie, contient 0,714 mg de peptides.

En dépit de la faible concentration en NaCl nécessaire pour éluer la fraction 7 (0,054 mM), les sels représentent 93 % du poids sec de la fraction et les peptides seulement 7 %. L'élimination des sels est par conséquent un point crucial de cette méthode de purification. En utilisant une électrodialyse à l'échelle pilote, 99,5 % de NaCl est éliminé en 30 min alors que seulement 14 % des peptides sont perdus. Le développement de ces études est présenté dans la publication correspondante jointe en annexe B.

## 2 Caractérisation du peptide 1-23 $\alpha$ en solution

Le peptide purifié à partir de l'hydrolysate pepsique est constitué par les 23 premiers acides aminés de la chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine bovine. Sa séquence est la suivante :



Dans l'hémoglobine, le peptide 1-23 $\alpha$  est sous forme d'hélice  $\alpha$  (figure 9), avec une partie N-terminale non structurée. Il se trouve à la surface de la protéine en contact d'un côté avec le milieu extérieur (aqueux et hydrophile) et de l'autre côté avec l'intérieur de la protéine (en général hydrophobe). Sa séquence montre qu'il possède de nombreux acides aminés hydrophobes (hydrophobicité moyenne par résidu de 0,14 et moment hydrophobe par résidu de 0,05) et que sa charge nette est positive (3 lysines et deux acides aminés acides). Ce peptide semble être un bon candidat pour le transport de la PPIX. Avant de tester ses capacités dans ce domaine, l'état d'agrégation du peptide ainsi que sa structure en solution ont été caractérisés.

### 2.1 Etat d'agrégation du peptide

Les peptides en solution ne sont pas forcément sous forme de monomère, ils peuvent former des micelles à des concentrations relativement faibles de 9.10<sup>-5</sup>M [Venkatesch et coll. 96]. Dans un premier temps, une gamme de concentration du peptide a été réalisée pour une étude en spectrométrie UV-visible. Ensuite, nous avons procédé à une chromatographie d'exclusion.

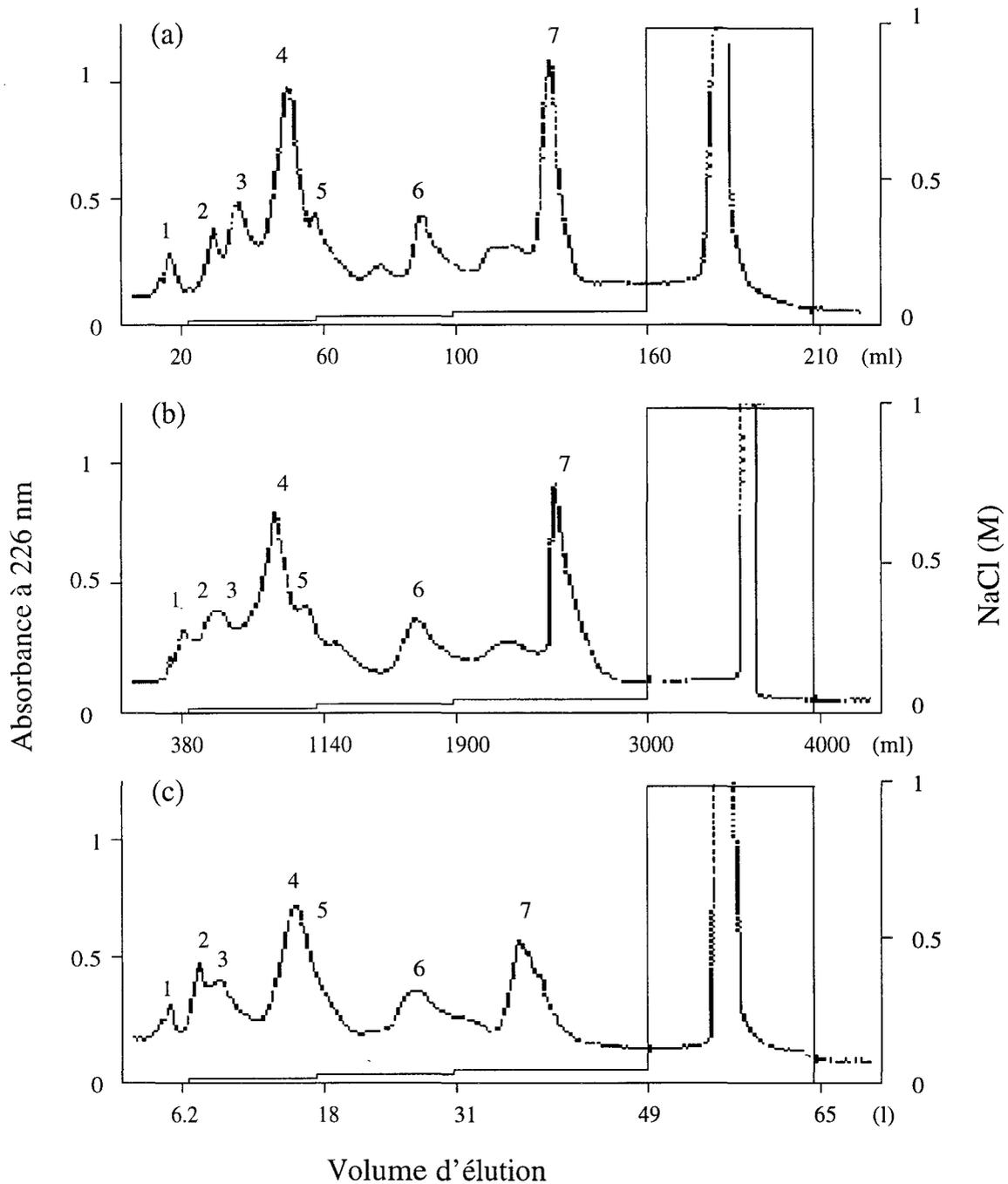


FIGURE 8 – Montée en échelle des paramètres chromatographiques. (a): colonne de 20 ml; (b): colonne de 380 ml; (c): colonne de 6120 ml. L'élu­tion est réalisée par paliers isocratiques contenant des concentrations successives en NaCl de 0,025; 0,045; 0,054 et 1M.

FIGURE 9 – Représentation spatiale en hélice du peptide 1-23  $\alpha$ 

Les études d'association entre des molécules identiques peuvent être réalisées par différentes méthodes. Par exemple, il est possible de suivre la conductimétrie de la solution en fonction de sa concentration. Une chute brutale de la conductimétrie peut être reliée à un changement de l'état d'association, et permet de déduire la concentration critique micellaire [Venkatesch et coll. 96]. Les mêmes études peuvent être réalisées en spectrométrie UV-visible. Là également, il faut réaliser une gamme de concentration du produit étudié. Le suivi se fait à une longueur d'onde donnée à laquelle le produit absorbe. Si la courbe obtenue est une droite, et que le monomère et les espèces polymérisées ont un  $\epsilon$  différent, cela signifie que le produit est sous une forme unique dans la gamme de concentrations considérées, car la loi de Beer-Lambert est respectée. Si la courbe obtenue est une droite avec une rupture de pente pour une concentration donnée, cela signifie que le produit n'est pas sous une forme unique, et peut être représentatif de la dimérisation d'une molécule.

Une solution mère à 5,06 mM de peptide a été effectuée. A partir de cette solution, nous avons réalisé une gamme de concentration de 0 à  $30,3 \cdot 10^{-5}$  M. Une courbe de l'absorbance à 280 nm en fonction de la concentration du peptide a été tracée (figure 10). Les points sont alignés et forment une droite. Le coefficient d'extinction molaire du peptide est de  $3290 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  à 280 nm. Cette gamme de concentration du peptide a été réalisée de façon à inclure les zones de concentrations dans lesquelles les différentes expériences de formation du complexe ou d'interaction ont été effectuées. Elle nous permet de supposer que le peptide est sous une forme unique car il n'y a pas de rupture de pente. Puisque la gamme commence à des concentrations très faibles, le peptide est sans doute sous forme de monomère.

Afin de confirmer ce résultat, une chromatographie d'exclusion stérique permettant d'estimer la masse moléculaire de l'entité en solution a été réalisée. La colonne a été étalonnée avec des peptides témoins dans un tampon acétate d'ammonium 20

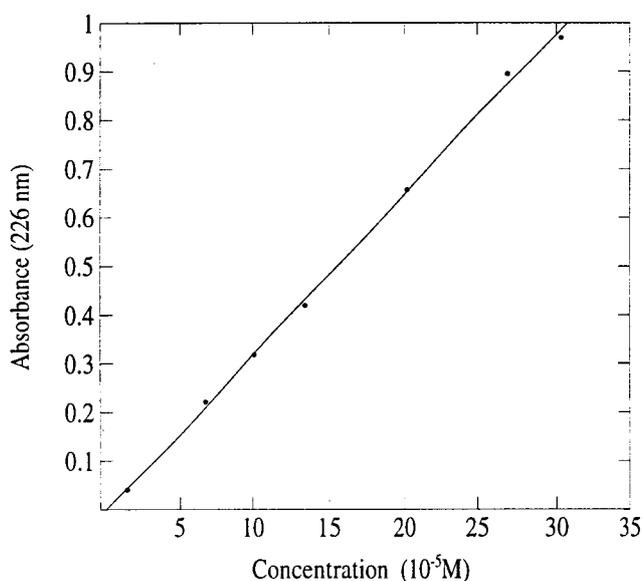


FIGURE 10 – Absorbance à 226 nm du peptide 1-23 $\alpha$  en solution dans le tampon acétate d'ammonium 20 mM à pH 7 en fonction de sa concentration.

mM pH 7 dans lequel le peptide 1-23 $\alpha$  a été mis en solution. A priori, ce tampon ne modifie pas les interactions hydrophobes et ioniques. La chromatographie ne devrait pas modifier un éventuel équilibre entre peptide monomère et dimère. Le peptide est élué à 6,15 ml ce qui correspond à une masse approximative de 2200 Da (figure 11). La masse molaire exacte est de 2231 Da, le peptide 1-23 $\alpha$  semble donc se présenter sous forme de monomère.

## 2.2 Structure en solution

Dans l'hémoglobine, les 23 premiers acides aminés correspondant au peptide que nous étudions sont majoritairement sous forme d'hélice  $\alpha$ . Il n'est cependant pas évident que seul, en solution, ce peptide conserve la même structure secondaire, d'autant plus que les méthodes de purification sont souvent dénaturantes (acétonitrile, lyophilisation...). Afin de vérifier ce point, des spectres de spectrométrie infra-rouge à transformée de Fourier ont été effectués. Le spectre obtenu en tampon acétate d'ammonium 20 mM à pH 7 est représenté dans la figure 12. Les résultats chiffrés de prédiction de structure sont rassemblés dans le tableau 2.

Ils ont été obtenus avec l'hémoglobine comme référence. Si nous supposons que les structures en hélices  $\alpha$ , feuillets  $\beta$  coudes ou désordonnées d'un peptide émettent aux mêmes longueurs d'ondes que ces mêmes structures dans l'hémoglobine, nous pouvons conclure que le peptide 1-23  $\alpha$  est sous forme d'hélice  $\alpha$  à environ 60 % pour les trois concentrations testées (bande entre 1620 et 1653  $cm^{-1}$ ). Ce pourcentage d'hélice  $\alpha$  est plus faible que dans l'hémoglobine native (75 %). Cependant, ce résultat semble normal puisque le peptide 1-23  $\alpha$  contient dans sa forme

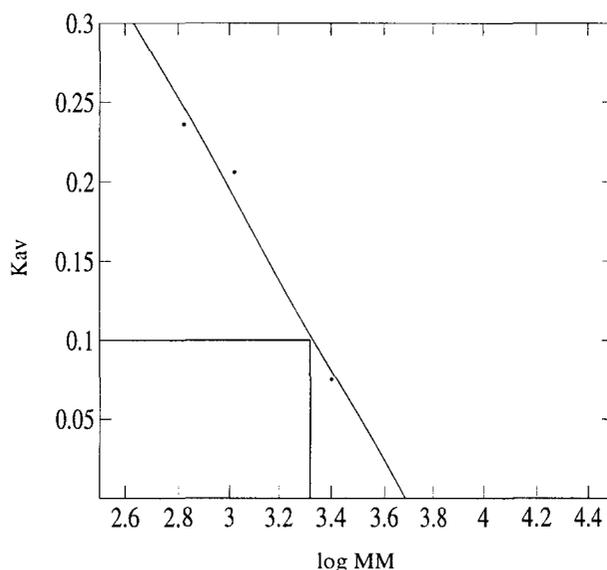


FIGURE 11 – Estimation de la masse moléculaire du peptide 1-23  $\alpha$  par chromatographie d'exclusion stérique. Étalonage de la colonne de chromatographie d'exclusion avec des peptides purs dans le tampon acétate d'ammonium 20 mM pH 7: Chaîne A de l'insuline bovine 2531,6 Da; angiotensine II 1046,2 Da;  $\beta$  NAD 663,4 Da; peptide 1-23 $\alpha$  de masse d'environ 2231 Da est désigné par l'intersection des droites.

native intégrée à l'hémoglobine une extrémité N-terminale non structurée et une extrémité C-terminale sous forme de coude. Les résultats obtenus par spectrométrie infra-rouge concordent tout à fait. Entre 1653 et 1675  $\text{cm}^{-1}$  se trouve la bande correspondant à une structure désordonnée dans l'hémoglobine. Pour le peptide, cette bande représente environ 20 % du spectre quelle que soit la concentration testée. Ces 20 % du peptide 1-23  $\alpha$  correspondent à 4,6 acides aminés et représentent sans doute la partie N-terminale. De même, entre 1675 et 1698  $\text{cm}^{-1}$  nous observons dans l'hémoglobine la structure correspondant aux coudes. Si l'extrapolation au peptide 1-23  $\alpha$  peut-être faite, cela signifie que 20 % de ce peptide se trouve sous forme de coude. Soit 4,6 acides aminés, ce qui peut correspondre au coude effective-

	feuillet $\beta$	hélice $\alpha$	désordonnée	coude
Concentration	1600-1620	1620-1653	1653-1675	1675-1698
1,25%	4%	57%	20%	19%
2,5%	1%	58%	21%	20%
5%	4%	62%	18%	18%

TABLEAU 2 – Pourcentage de chaque type de structure dans le peptide 1-23  $\alpha$  en tampon acétate d'ammonium 20 mM à pH 7, calculé par comparaison avec les résultats obtenus avec l'hémoglobine en spectroscopie infra-rouge.

ment présent à l'extrémité C-terminale du peptide 1-23  $\alpha$  dans l'hémoglobine. Si la présence de ce coude dans l'hémoglobine est normale, elle est plus difficile à expliquer dans le peptide après hydrolyse, car la séquence ne comprend pas de proline. Ces résultats semblent indiquer que le peptide 1-23  $\alpha$  reste sous une forme identique à celle observée dans l'hémoglobine après hydrolyse et purification. Cependant, ces hypothèses demandent à être vérifiées par une autre technique comme par exemple le dichroïsme circulaire.

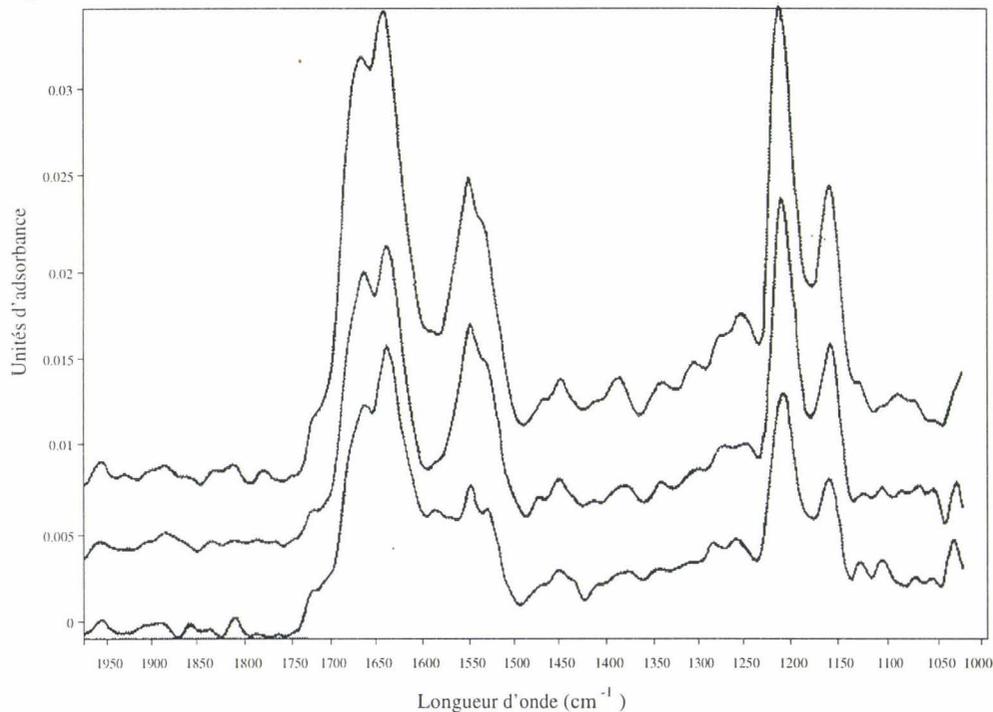


FIGURE 12 – Spectres infrarouges du peptide 1-23 $\alpha$  à 1,25%, 2,5% et 5% en solution dans le tampon acétate d'ammonium 20 mM à pH 7

Cette partie consacrée à l'étude du peptide 1-23 $\alpha$ , a permis de déterminer qu'il se trouve sous forme de monomères en solution dans l'acétate d'ammonium jusqu'à au moins une concentration de  $3 \cdot 10^{-4}$  M. De plus, les études en spectroscopie infrarouge semble indiquer que ce peptide conserve une forme structurée en hélice  $\alpha$  dans ces conditions.

### 3 Interactions du peptide 1-23 $\alpha$ avec des liposomes

De nombreux peptides naturels sont antibactériens. Ils font en général partie du système de défense d'espèces qui n'ont pas de système immunitaire spécifique, telles que les insectes. Ces peptides agissent souvent en perméabilisant la membrane bactérienne par la formation de pores. Un test simple est communément employé par les équipes travaillant sur la recherche de nouveaux peptides antibactériens naturels ou non [Ando et coll. 93, Lee et coll. 94]. Ce test consiste à utiliser des liposomes

composés d'une bicouche lipidique comme dans le cas d'une membrane biologique. Un peptide ayant la capacité de lyser ces liposomes est alors considéré comme un bon candidat pour posséder des propriétés antibactériennes potentielles. La composition en lipides que nous avons choisi pour confectionner ces liposomes est identique à celle de la membrane d'*Escherichia coli*. D'un point de vue pratique, plusieurs concentrations de peptides ont été mises en contact avec une suspension de liposomes. L'intensité de fluorescence due à la libération de la carboxyfluoresceine encapsulée dans les liposomes a été suivie au cours du temps. On en déduit l'activité lytique  $L$  des liposomes :

$$L = \frac{F - F_0}{F_T - F_0} \quad (7)$$

ou  $F$  représente l'intensité de fluorescence pour chaque concentration de peptide,  $F_0$  l'intensité de fluorescence initiale et  $F_T$  l'intensité de fluorescence maximale obtenue par action d'un détergent, le triton X100 à 0,1% final.

Les résultats sont rassemblés dans la figure 13. L'action du peptide n'est pas

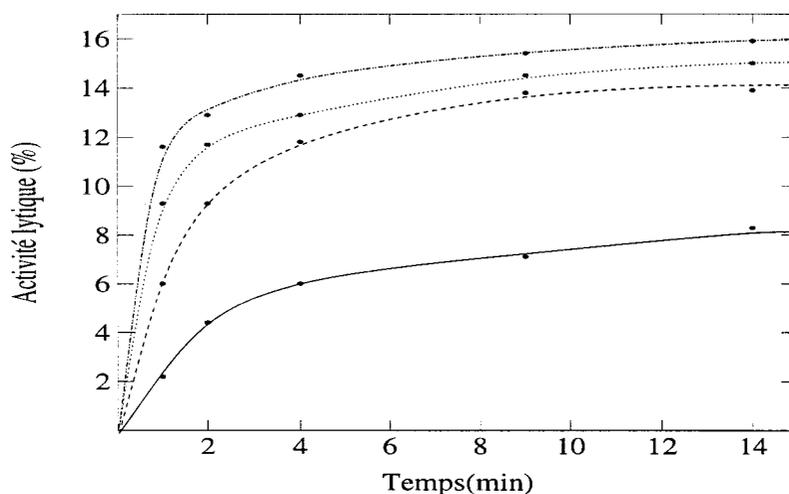


FIGURE 13 - Courbe représentant l'activité lytique maximale obtenue sur les liposomes pour différentes concentrations en peptides (—)25 $\mu$ M, (- - -)100 $\mu$ M, (....)37,5 $\mu$ M, (-.-.-)50 $\mu$ M.

immédiate puisqu'une évolution au cours du temps est observée. Cependant, d'après les courbes obtenues, l'action du peptide est maximale pour un temps de contact de 15 minutes. Dans un premier temps, l'activité lytique augmente avec la concentration du peptide, 8% de lyse pour 25  $\mu$ M, 15% pour 37,5  $\mu$ M et 16% pour 50  $\mu$ M, puis commence à baisser au delà de 50  $\mu$ M. En effet, l'activité lytique correspondant à une concentration de 100  $\mu$ M est plus faible que celles correspondant à 50 et 37,5  $\mu$ M. Ces activités lytiques ne sont pas très élevées par rapport à celles des peptides antibactériens naturels, qui provoquent au moins 80% de lyse. Par exemple, la melittine à 100  $\mu$ M lyse 93% d'une solution de liposomes [Sessa et coll. 69].

Cette activité lytique faible (16%) semble être en accord avec la prédiction effectuée à partir de la structure du peptide. En effet, le calcul du moment hydrophobe selon Eisenberg et coll. [Eisenberg et coll. 82] donne une valeur de 0,05 et l'hydrophobicité moyenne par résidu est de 0,14. Dans le diagramme représentant le moment hydrophobe en fonction de l'hydrophobicité (figure 14) le peptide se place dans la partie correspondant aux peptides globulaires, et non aux peptides membranaires. Cependant, il serait intéressant de faire l'expérience dans des conditions favorisant la structure en hélice d'un peptide. En effet, tous les peptides antibactériens sont structurés. Cette conformation peut être sous forme d'hélice  $\alpha$  ou sous forme de feuillets  $\beta$ , mais il semble qu'une structure secondaire ordonnée soit importante pour l'activité lytique et antibactérienne. Certains solvants comme le TFE ont la particularité de favoriser la conformation en hélice  $\alpha$ , et pourraient peut-être augmenter la proportion d'hélices dans le peptide 1-23  $\alpha$  qui n'est que de 60 %. Si cette action est obtenue sur le peptide et prouvée par spectroscopie infra-rouge, un test devrait être effectué pour déterminer à nouveau la capacité lytique sur des liposomes.

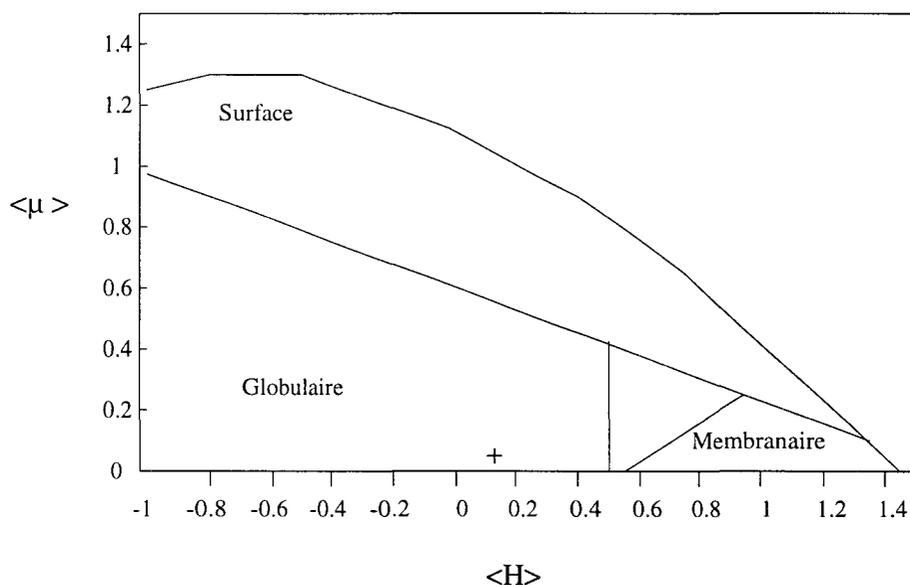


FIGURE 14 – Diagramme du moment hydrophobe d'un peptide en fonction de son hydrophobicité selon Eisenberg. (+) représente le peptide 1-23  $\alpha$ .

## 4 Obtention et caractérisation de solutions de protoporphyrine

Les porphyrines sont des molécules très étudiées. Selon les substituants du noyau tétrapyrrolique, certaines de leurs propriétés sont modifiées, telles que la solubilité ou encore la constante de dimérisation. Nous avons choisi de travailler avec la protoporphyrine IX (PPIX) qui est très peu soluble en milieu aqueux et qui a fait l'objet d'expérimentations au laboratoire. Dans une première partie, la solubilité

et l'équilibre d'association de la PPIX en milieu aqueux ont été étudiés. Dans une seconde partie, nous avons examiné la solubilité de la PPIX en milieu organique. L'influence de la nature du tampon sur sa solubilité a été testée et enfin, l'influence de la méthode de préparation des solutions sur l'état de polymérisation de la porphyrine a été étudiée.

#### 4.1 Solubilisation de la PPIX en milieu aqueux

La PPIX se présente sous deux formes, la forme acide et la forme basique. Nous avons toujours utilisé la forme acide (la moins soluble), sauf pour la mesure de la constante de dimérisation. La PPIX est une molécule très hydrophobe qui, lorsqu'elle est placée en milieu aqueux, reste sous forme agrégée. Une étape d'agitation et de sonication permet de dissocier les plus gros amas, mais il reste un précipité qu'il faut éliminer par centrifugation. De cette façon, la solubilité maximale de la PPIX acide dans le tampon acétate d'ammonium 10 mM à pH 7 est de  $53 \mu\text{M}$ . Afin de préparer une solution de PPIX à une concentration plus faible de  $10 \mu\text{M}$ , il est préférable d'employer une technique évitant la sonication et la centrifugation. La PPIX présente une bonne solubilité à pH basique, elle est donc d'abord dissoute dans un volume minimum d'ammoniaque 1M puis diluée par de l'eau. Le tampon acétate d'ammonium est alors ajouté et il ne reste qu'à ajuster le pH et le volume.

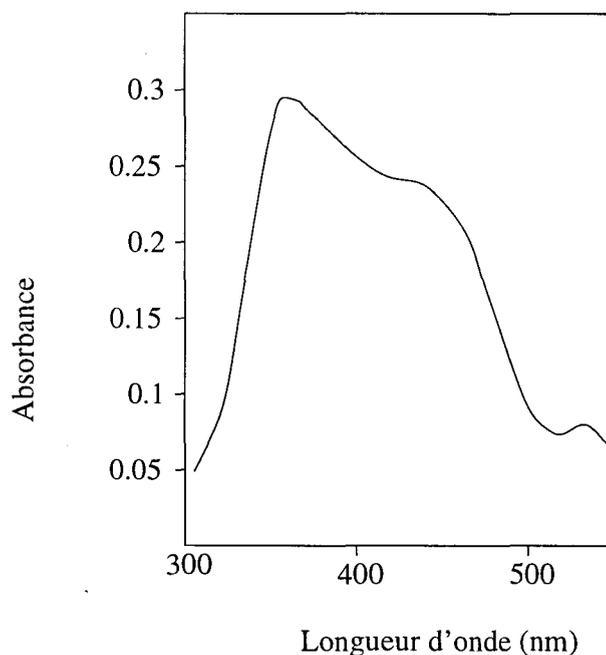


FIGURE 15 – Spectre UV-visible de la protoporphyrine IX à  $10 \mu\text{M}$  en tampon acétate d'ammonium 20 mM à pH 7.

Le spectre de la solution de PPIX à  $10 \mu\text{M}$  est enregistré entre 300 et 500 nm (figure 15), dans la région de la bande de Soret. Celle-ci ne présente pas de maximum à 400 nm comme c'est le cas lorsque la PPIX est sous forme de monomères. Le maximum peut être observé à 360 nm avec un épaulement à 440 nm. La bande de

Soret a une amplitude faible, elle est très aplatie et la longueur d'onde maximale est décalée vers l'UV. Toutes ces caractéristiques sont celles d'une PPIX sous forme de polymères [Brown et coll. 76]. Nous pouvons en conclure que la PPIX en milieu aqueux à une concentration de 10  $\mu\text{M}$  n'est pas sous forme de monomères, elle forme des associations en dimères et plus qui modifient son spectre.

La densité optique de cette porphyrine sous forme de polymères n'excède pas 0,3. Cela laisse une marge très faible pour réaliser une gamme de dilution afin d'accéder à la constante de dimérisation. C'est pourquoi une autre technique a été envisagée, basée sur le spectre de fluorescence de la PPIX. La sensibilité élevée de cette méthode permet la réalisation d'une gamme de concentration inférieure à 5  $\mu\text{M}$ .

### Calcul de la constante d'équilibre de dimérisation

L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration d'un composé si la densité optique à la longueur d'onde d'excitation est inférieure à 0,08, au delà, il n'y a plus linéarité [Margalit et coll. 83]. Une méthode de calcul de la constante de dimérisation de la PPIX a été mise au point par Margalit et coll [Margalit et coll. 83], et nécessite d'émettre deux hypothèses.

- a - A concentrations suffisamment faibles (comme celles utilisées ici), la dimérisation est le processus d'agrégation dominant. La fraction représentant des agrégats plus gros que les dimères est négligeable par rapport à la PPIX sous forme de monomères ou de dimères.
- b - Dans une solution de monomères et de dimères, seul le monomère émet un rayonnement de fluorescence.

Pour cette étude, nous avons choisi la PPIX sous forme basique. En effet, des essais effectués préalablement avec la PPIX sous forme acide n'ont pas permis d'obtenir des résultats reproductibles. Une solution mère à 2,5  $\mu\text{M}$  a été préparée, puis une dilution à 0,6  $\mu\text{M}$  a été effectuée. Lors de la préparation, il convient de réduire au maximum le contact de la solution de PPIX avec la lumière. De plus, des solutions de PPIX fraîches doivent être préparées pour chaque expérience. Nous avons réalisé une gamme de dilution de 0 à 0,4  $\mu\text{M}$ . Il a été vérifié que la densité optique à la longueur d'onde d'excitation est bien inférieure à 0,08 afin de rester dans la zone linéaire de la fluorescence. Le maximum de fluorescence a été relevé pour chaque concentration. Les résultats sont rassemblés dans la figure 16. La première partie de la courbe est linéaire pour les faibles concentrations en PPIX (<0,05  $\mu\text{M}$ ), puis une courbure est décelée. Dans cette première partie, la PPIX est sous forme de monomères et la totalité des molécules émettent un rayonnement de fluorescence. Dans la partie non linéaire, la PPIX se dimérise. Comme le dimère n'émet pas de rayonnement de fluorescence, l'intensité ne correspond plus à la concentration de PPIX monomères théorique, elle est plus faible. Afin d'obtenir la constante de dimérisation, nous avons tracé la courbe  $\frac{T}{F}$  en fonction de  $F$  (figure 17).

Le calcul de la constante de dimérisation de la PPIX donne la valeur de  $18.10^6\text{M}^{-1}$ , ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Brault [Brault 90] ( $19.10^6\text{M}^{-1}$ ).

Pour une concentration inférieure à 0,05  $\mu\text{M}$ , la PPIX est majoritairement sous forme de monomère en tampon acétate d'ammonium 10 mM à pH 7. Au delà, elle

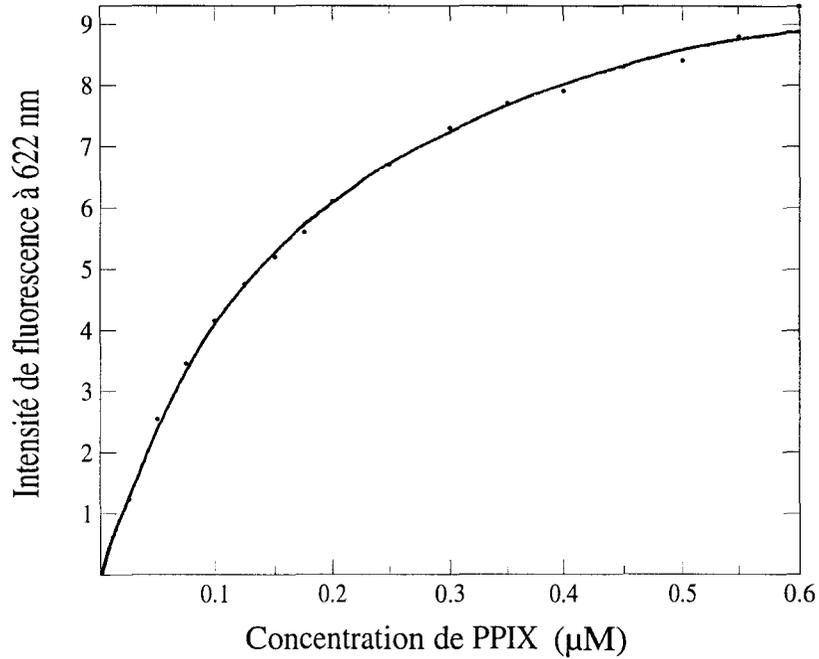


FIGURE 16 – Intensité de fluorescence à 622 nm en fonction de la concentration en PPIX.

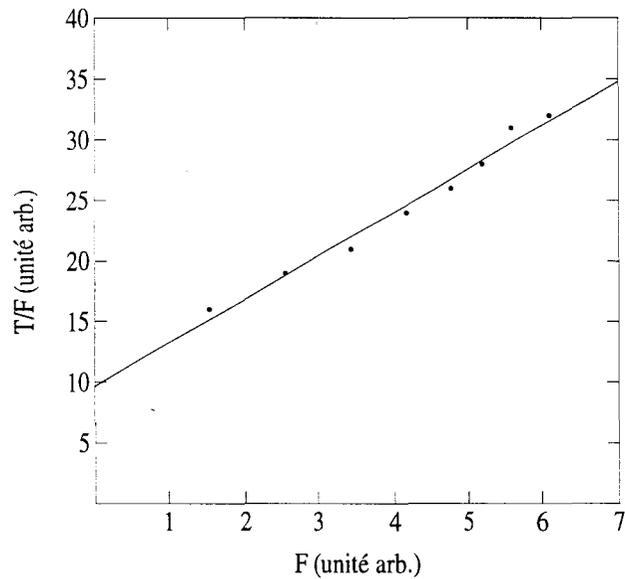


FIGURE 17 – Détermination de la constante de dimérisation de la PPIX. Rapport de la concentration totale de la porphyrine sur l'intensité de fluorescence en fonction de l'intensité de fluorescence à 622 nm. Les points représentent les valeurs expérimentales et la droite est obtenue par régression linéaire.

se dimérise avec une constante de  $18.10^6 \text{M}^{-1}$ . Lorsque la concentration augmente encore, le phénomène se poursuit avec la formation de polymères sans doute par formation de micelles à partir d'une concentration critique [Brown et coll. 76].

## 4.2 Solubilisation de la PPIX en milieu hydro-organique

La solubilité de la PPIX est très faible en milieu purement aqueux ( $53 \mu\text{M}$ ). Pour cette raison, nous recherchons des peptides capables de la transporter. Le peptide, par sa présence, augmente la solubilité de la PPIX, nous considérons alors que ces molécules forment un complexe. Pour que la formation de ce complexe soit possible, la solubilité de la PPIX est augmentée artificiellement en la plaçant dans un solvant hydro-organique. Le peptide est alors ajouté puis le solvant organique est éliminé par évaporation. Une fraction de la PPIX précipite puisqu'elle n'est pas soluble en milieu aqueux, et le reste forme un complexe soluble avec le peptide. Aussi, nous nous sommes intéressés à la solubilité de la PPIX dans différents tampons et milieux organiques afin d'optimiser la formation de ce complexe. Nous avons également étudié l'influence de la technique de préparation des solutions de PPIX sur son état de polymérisation.

### Influence du tampon et des solvants sur la solubilité de la PPIX

Les comparaisons ont été effectuées au maximum de solubilités dans les différents milieux. Une sonication pour dissocier les agrégats est nécessaire, puis une centrifugation permet d'éliminer la fraction non soluble. Un dosage de la PPIX à  $538 \text{ nm}$  est effectué sur le surnageant et permet de déterminer la quantité solubilisée. Ces tests ont été réalisés dans le tampon acétate d'ammonium  $10 \text{ mM}$  à  $\text{pH } 7$ , dans le tampon phosphate  $10 \text{ mM}$  à  $\text{pH } 7$ , l'acétone pur, le méthanol pur et également des mélanges tampons/solvants en proportion  $50/50 \text{ (V/V)}$ . Les résultats sont rassemblés dans le tableau 3.

milieu	acétate d'ammonium	phosphate	acétone	méthanol	phosphate/ acétone	acétate/ acétone
solubilité ( $\mu\text{M}$ )	36	21	125	100	535	90

TABLEAU 3 – Solubilité de la PPIX dans différents milieux.

La solubilité dans l'acétone ou le méthanol pur n'est pas très bonne, contrairement à ce que l'on pouvait penser puisqu'il s'agit de solvant protique dans le cas du méthanol et aprotique peu polaire dans le cas de l'acétone. Elle est seulement le triple de la solubilité en milieu aqueux. Cette solubilité étant très proche entre acétone et méthanol, nous avons choisi l'acétone qui possède un point d'ébullition très bas et peut être facilement évaporé. Le tampon phosphate était le tampon utilisé jusqu'à présent au laboratoire pour réaliser les complexes peptide-PPIX. Il présente toutefois le désavantage de n'être pas volatil. De plus, nous souhaitons réaliser des expériences en spectrométrie de masse avec ionisation par electrospray, et les sels

sont déconseillés car ils masquent les produits. Pour ces différentes raisons, nous avons retenu le tampon acétate d'ammonium à pH 7 qui est volatil, et peut être utilisé en spectrométrie de masse sans inconvénient. La solubilité en milieu purement aqueux est très proche en tampon acétate d'ammonium ou en tampon phosphate. En milieu hydro-organique, les solubilités sont fortement améliorées par rapport au milieu aqueux dans le même tampon. Ainsi, la solubilité en tampon phosphate/acétone 50/50 (V/V) est de  $535 \mu\text{M}$  soit 20 fois plus qu'en tampon phosphate. De même, la solubilité en tampon acétate d'ammonium/acétone 50/50 (V/V) est de  $90 \mu\text{M}$ , soit 3 fois plus que dans le tampon acétate d'ammonium. Si l'ajout de 50% d'acétone dans le tampon permet une meilleure solubilité de la PPIX, nous constatons néanmoins l'effet indéniable du tampon utilisé. Le milieu hydro-organique phosphate/acétone mène à une solution 6 fois plus concentrée que le milieu hydro-organique acétate d'ammonium/acétone.

L'influence du tampon sur la solubilité de l'hème a également été montrée par Waynes [Waynes 86]. Dans ce cas, l'hème est sept fois plus soluble en tampon phosphate qu'en tampon Tris. Il apparaît donc important de clarifier plusieurs points avant de choisir le tampon acétate d'ammonium pour les expériences futures. Premièrement, le tampon acétate d'ammonium ne diminue pas la capacité maximale de transport du peptide 1-23 $\alpha$  pour la PPIX par rapport au tampon phosphate comme nous le verrons plus loin. Deuxièmement, la perte de solubilité de la PPIX en tampon acétate d'ammonium est un inconvénient, mais le fait que ce soit un tampon volatil est un très gros avantage.

Pour ces tests de solubilité dans différents milieux et tampons, nous avons cherché à solubiliser le maximum de PPIX. Nous avons donc introduit dans chaque milieu une quantité de PPIX supérieure à la capacité maximale de solubilisation. Une centrifugation a ensuite permis d'éliminer la fraction non soluble. De nombreuses études ont montré que la PPIX avait une forte tendance à polymériser lorsqu'elle est en solution concentrée. Afin de réduire au maximum la polymérisation de la PPIX, nous avons donc envisagé une méthode de préparation différente, dans laquelle la PPIX n'est jamais en concentrations saturantes. Dans le paragraphe suivant, nous comparerons deux techniques de préparation des solutions de PPIX qui mènent à des états d'association différents.

### **Influence de la méthode de solubilisation sur l'état d'agrégation de la PPIX**

Nous avons cherché à produire deux solutions de PPIX de même concentration par deux méthodes différentes, afin de déterminer si les états d'association sont affectés. Dans le premier cas, la solution de PPIX est préparée en plusieurs étapes. Nous avons introduit dans un volume réduit (20 ml) de tampon acétate d'ammonium/acétone 20 mM à pH 7 une quantité de PPIX ne pouvant être totalement solubilisée (5,3 mg). Une centrifugation a permis d'obtenir un culot de PPIX insoluble, auquel a été additionné un nouveau volume de tampon hydro-organique (20 ml). Cette manipulation a été effectuée jusqu'à ce que la totalité de la PPIX introduite au départ soit soluble. Nous avons obtenu une solution de 100 ml à  $89 \mu\text{M}$  préparée en plusieurs étapes (voir annexe 5.2). Dans le deuxième cas, nous nous

sommes appuyés sur les résultats précédents pour préparer une solution de PPIX à 89  $\mu$ M mais en une seule étape. Ainsi, la quantité de PPIX nécessaire (5,3 mg) a été solubilisée directement dans le volume souhaité (100 ml). Une centrifugation de contrôle a confirmé que la solution ne comprend pas de PPIX insoluble. Quelle que soit la méthode de solubilisation de la PPIX, la solution est à une concentration de 89  $\mu$ M dans le mélange hydro-organique. Les méthodes de préparation étant différentes, l'étude de l'état de polymérisation de la PPIX solubilisée a été menée.

Un spectre UV-visible entre 350 et 750 nm a été enregistré pour chaque solution de PPIX (figure 18). De grandes différences sont visibles. La solution 1 préparée par la méthode en plusieurs étapes à partir d'une solution saturée de PPIX présente cinq bandes distinctes. La bande de Soret possède une intensité maximale à 400 nm, mais elle est très aplatie, ce qui est en général représentatif d'associations entre les molécules de PPIX. Nous sommes donc en présence d'une solution de PPIX sous forme de polymères. La solution 2, préparée en une seule étape, directement à la concentration de 89  $\mu$ M présente elle aussi cinq bandes, mais mieux résolues et d'intensités plus grandes. La bande de Soret particulièrement visible possède une intensité maximale à 400 nm et une densité optique au maximum du pic deux fois plus élevée que pour la solution 1. Une bande de Soret aussi élevée est en général représentative d'une solution de PPIX sous forme de monomères.

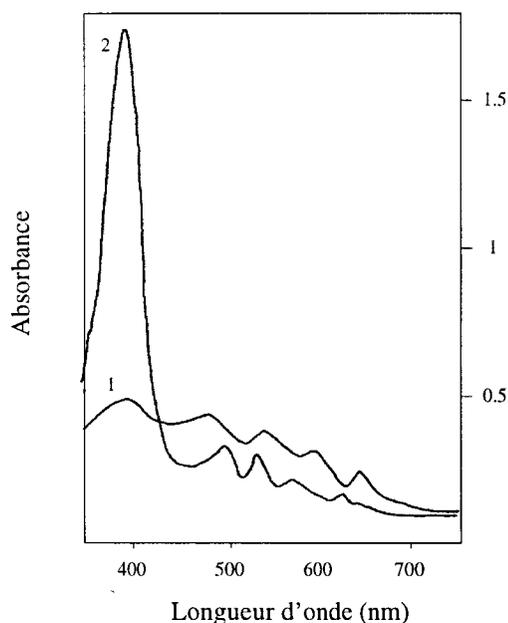


FIGURE 18 – Spectres UV-visibles de la PPIX en tampon acétate d'ammonium/acétone 50/50 (V/V) 20 mM pH 7, solution 1 préparée en plusieurs étapes avec un excès de PPIX, solution 2 préparée en une seule étape sans excès de PPIX.

L'allure de la bande de Soret n'est pas la seule différence visible entre ces deux spectres. Les quatre autres bandes ont des maxima déplacés lorsque l'on passe d'une solution à l'autre. Ainsi, la solution 2 préparée en une seule étape possède des maxima décalés vers le visible par rapport à la solution 1. Ce résultat montre clairement

que le dosage de la PPIX à 538 nm pratiqué jusqu'à présent est erroné, puisque pour une même concentration les densités optiques sont différentes. Ces spectres présentent tout de même un point isobestique pour lequel les deux solutions ont le même  $\epsilon$ . Il serait intéressant d'étudier cette zone plus en détail pour diverses solutions aqueuses mais également hydro-organiques. La présence dans chaque cas de ce point isobestique permettrait des dosages précis.

L'étude de ces spectres a montré que la PPIX n'est pas dans le même état de polymérisation selon le protocole employé pour préparer la solution. Afin de confirmer ce dernier point, le coefficient d'extinction molaire a été calculé pour chaque solution.

### Détermination des coefficients d'extinction molaire

Une gamme de concentration de 0 à 0,12 mM a été réalisée pour chaque solution et la densité optique a été mesurée à 538 nm (figure 19).

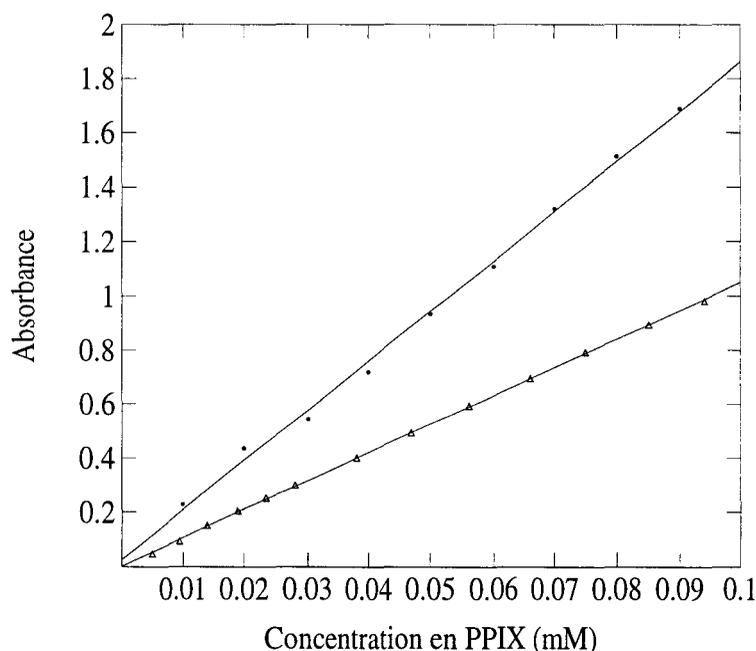


FIGURE 19 – Absorbance à 538 nm en fonction de la concentration de PPIX en tampon acétate d'ammonium 20 mM pH 7/acétone 50/50 (V/V), (●) solution 1 (△) solution 2.

Les deux gammes de concentrations conduisent à des droites bien distinctes. La solution de PPIX 1 (préparée en plusieurs étapes et dans laquelle la PPIX semble être sous forme de polymères) possède le coefficient d'extinction molaire le plus élevé ( $18\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). La solution de PPIX 2 (préparée en une seule étape) présente un coefficient d'extinction molaire presque deux fois plus faible de  $10\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Alors que le polymère absorbe beaucoup moins dans la bande de Soret, l'inverse se produit à 538 nm car il absorbe plus que le monomère.

En milieu hydro-organique, la solubilité de la PPIX est fortement améliorée. Nous avons utilisé deux méthodes de préparation de ces solutions de PPIX qui mènent soit à une PPIX majoritairement sous forme de monomères soit à une PPIX majoritairement sous forme de polymères. Le dosage à 538 nm en est affecté puisque le coefficient d'extinction molaire est différent dans ces deux solutions. Il est conseillé d'utiliser le coefficient d'extinction molaire correspondant au "polymère" si le spectre est aplati au niveau de la bande de Soret et inversement. En ce qui concerne la formation des complexes, il est préférable de toujours utiliser la même méthode de préparation de la solution de PPIX.

## 5 Formation et caractérisation du complexe peptide 1-23 $\alpha$ -porphyrine

Dans un premier temps, nous avons déterminé quel système de solubilisation de la PPIX conviendrait le mieux à la formation d'un complexe avec le peptide. Ensuite, nous avons déterminé la capacité maximale de fixation de la PPIX par le peptide 1-23 $\alpha$  et enfin, nous avons étudié les spectres de ce complexe.

### 5.1 Détermination de la capacité de fixation de la PPIX par le peptide 1-23 $\alpha$

Les complexes étaient précédemment réalisés au laboratoire en tampon phosphate 20 mM pH 7 à partir d'une solution de PPIX saturée et centrifugée (première méthode). Nous venons de déterminer que ce type de solution contient en grande partie des polymères de PPIX. Il semble difficile, à partir d'une solution de PPIX à l'état de polymères, d'obtenir un complexe ou elle serait à l'état de monomère. La deuxième méthode de solubilisation de la PPIX (préparée en une seule étape sans saturer la solution) semble être une bien meilleure candidate puisque le spectre de la PPIX révèle qu'elle se présente majoritairement sous forme de monomères. C'est donc la deuxième méthode de solubilisation de la PPIX que nous avons retenue pour former le complexe.

La capacité maximale du peptide 1-23 $\alpha$  a été déterminée en tampon phosphate 20 mM pH 7 et en tampon acétate d'ammonium 20 mM pH 7 par lequel nous espérons le remplacer pour des raisons pratiques (tampon volatil). Dans un premier temps, des solutions de PPIX en mélanges hydro-organiques ont été réalisées selon la méthode précédemment choisie. Une solution concentrée de peptide 1-23 $\alpha$  a été ajoutée, puis l'acétone a été évaporé sous vide. Une étape de centrifugation a été appliquée afin d'éliminer la porphyrine précipitée puis le surnageant a été dosé par spectrométrie, avec le coefficient d'extinction molaire obtenue sur la solution sous forme de polymères, afin de déterminer la quantité de PPIX solubilisée. Les courbes de saturation sont représentées dans la figure 20. Le tampon semble avoir une influence sur la formation du complexe puisque les courbes ne se chevauchent pas. Dans le tampon phosphate, l'affinité du peptide pour la PPIX est plus élevée que dans le tampon acétate d'ammonium (puisque'il faut moins de PPIX introduite en tampon phosphate pour solubiliser la même quantité de PPIX en tampon acétate

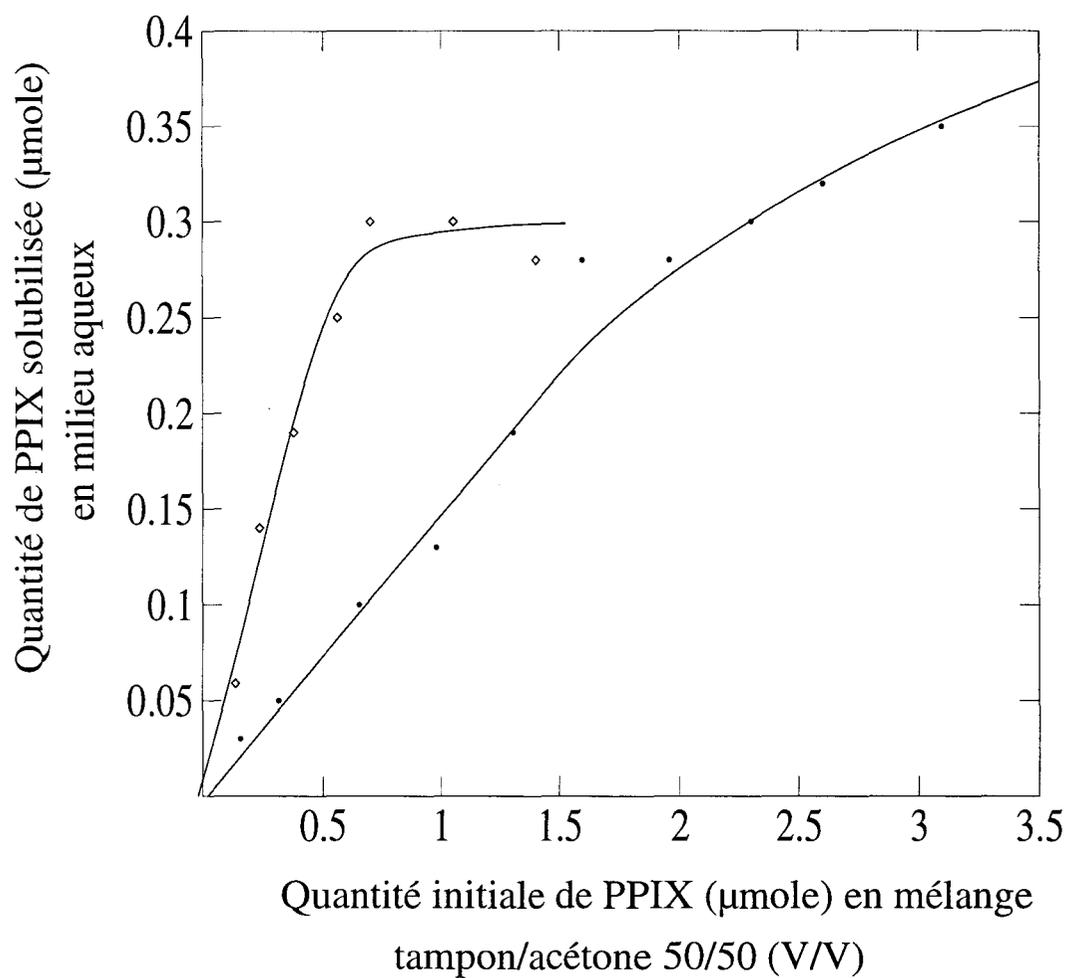


FIGURE 20 – Solubilisation de la PPIX ( $\mu\text{mole}$ ) en fonction de la quantité de PPIX pour une quantité en peptide de 0,45  $\mu\text{mole}$  en tampon acétate d'ammonium/acétone (●) ou phosphate/acétone (◇).

d'ammonium). En tampon phosphate, la capacité maximale est de 180  $\mu\text{g}$  de PPIX solubilisée pour 1 mg de peptide, soit un rapport molaire PPIX-peptide de 0,7. Ce rapport correspondrait à 3 molécules de peptide associées à 2 molécules de PPIX. La capacité maximale de transport en tampon acétate d'ammonium n'a pas été atteinte avec la gamme de concentration en PPIX réalisée. Ceci est dû à la plus faible solubilité de la PPIX dans le tampon acétate d'ammonium/acétone (90  $\mu\text{M}$ ) que dans le tampon phosphate/acétone (535  $\mu\text{M}$ ). La capacité de transport apparente du peptide en tampon acétate d'ammonium/acétone déterminée à 90  $\mu\text{M}$  en porphyrine est de 215  $\mu\text{g}$  de PPIX par mg de peptide soit une capacité de fixation de la PPIX qui se rapproche de 1 mole de PPIX pour 1 mole de peptide. Diminuer la quantité de peptide dans la gamme pourrait éventuellement permettre d'être plus proche de la capacité maximale réelle.

Dans le tampon acétate d'ammonium, le peptide transporte une quantité plus élevée de PPIX que dans le tampon phosphate, par contre, son affinité pour la PPIX serait plus faible.

## 5.2 Etat de la porphyrine dans le complexe

Au cours des différentes étapes de la formation du complexe dans le tampon acétate d'ammonium, nous avons enregistré les spectres UV-visible afin de suivre l'état de la PPIX. Bien que les spectres aient été enregistrés pour toutes les concentrations en PPIX, seuls ceux correspondant à deux concentrations (14,2  $\mu\text{M}$  et 142  $\mu\text{M}$ ) sont rassemblés dans la figure 21. Les spectres de la PPIX seule en solution dans le tampon acétate d'ammonium/acétone 20 mM pH 7 (figure 21a et 21d) présentent une bande de Soret bien définie avec une absorbance élevée à 400 nm. Nous pouvons donc en déduire qu'en solution dans le mélange hydro-organique, la PPIX est sous forme de monomères.

Les spectres de la PPIX dans le même solvant additionné de peptide 1-23 $\alpha$  (17,9  $\mu\text{M}$ ) sont représentés dans la figure 21b et 21e. Quelle que soit la concentration de PPIX, une modification du spectre de la porphyrine est provoquée par la présence du peptide. La densité optique à 400 nm du mélange hydro-organique PPIX-peptide baisse pratiquement de moitié par rapport à la densité optique de la PPIX seule à cette même longueur d'onde pour la plus faible concentration de PPIX (14,2  $\mu\text{M}$ ). En ce qui concerne la concentration de PPIX la plus élevée (142  $\mu\text{M}$ ), la densité optique du mélange PPIX-peptide à 400 nm en milieu organique est presque divisée par 3. Dans les deux cas, le spectre du mélange se rapproche du spectre de la PPIX sous forme de polymères. Nous pouvons interpréter ce changement de spectre de deux façons différentes. La présence du peptide favoriserait la polymérisation de la PPIX, ou les interactions provoqueraient un changement du spectre de la PPIX similaire aux changements dus aux interactions PPIX-PPIX impliquées dans le phénomène de polymérisation. Il est également possible que ces deux phénomènes cohabitent. L'acétone est un solvant aprotique peu polaire, et sa présence en proportions élevées dans la solution devrait empêcher les interactions hydrophobes. Il serait intéressant de vérifier par une technique appropriée si des interactions peptide-PPIX ont lieu en milieu organique.

Les spectres de la PPIX après évaporation de l'acétone (le complexe est alors

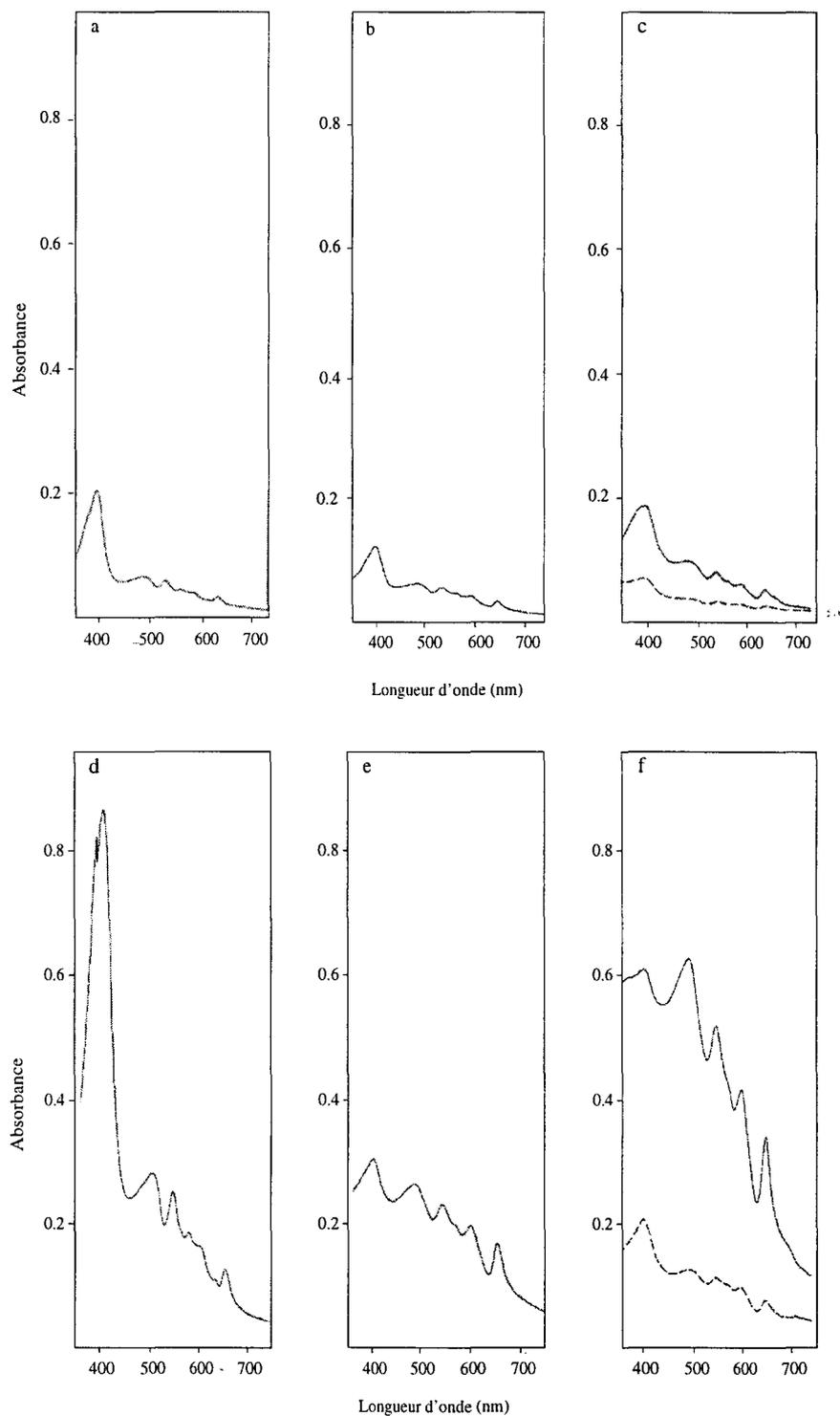


FIGURE 21 – Spectres UV-visible obtenus lors des différentes étapes de la formation du complexe. (a) PPIX seule à  $14,2 \mu\text{M}$  en milieu hydro-organique avant évaporation. (b) PPIX à  $14,2 \mu\text{M}$  + peptide  $17,9 \mu\text{M}$  en milieu hydro-organique avant évaporation, (c) complexe et témoin PPIX seule obtenus après évaporation du solvant, (d), (e), (f), respectivement identiques à (a), (b), (c) avec une concentration en PPIX de  $142,10 \mu\text{M}$ .

formé) sont représentés dans les figures 21 c et 21 f. Le spectre du complexe présente toujours une densité optique plus élevée que le spectre du témoin, confirmant ainsi la solubilisation de la PPIX par le peptide. Pour la solution de PPIX témoin à 142  $\mu\text{M}$  il semble que l'évaporation de l'acétone ait provoqué la précipitation d'une partie de la population de PPIX et la polymérisation de l'autre partie restant en solution. Le phénomène est identique pour la concentration la plus faible de PPIX à 14,2  $\mu\text{M}$ . En ce qui concerne la solution de PPIX à 142  $\mu\text{M}$  additionnée de peptide, l'évaporation de l'acétone a également provoqué la précipitation d'une proportion de PPIX (plus faible que pour le témoin), alors que l'autre partie associée au peptide semble se trouver sous forme de polymères. Le phénomène est par contre moins marqué pour la solution de PPIX à 14,2  $\mu\text{M}$  additionnée de peptide. Dans ce cas, l'évaporation de l'acétone provoque un élargissement de la bande de Soret qui perd dans le même temps un peu d'amplitude, mais le spectre est assez proche d'une PPIX sous forme de monomères. La solution de PPIX à 14,2  $\mu\text{M}$  additionnée de peptide correspond à une solution complexe composée en rapport molaire de 7 peptides pour 1 porphyrine. Pour la concentration de 142  $\mu\text{M}$  ce rapport est proche de 1. A concentration en PPIX élevées, lorsque le rapport molaire du complexe est proche de 1, le complexe présenterait donc la PPIX sous forme de polymères. Par contre, lorsque la concentration en PPIX est faible, et que le rapport molaire est de 7 peptides pour 1 PPIX, la PPIX dans le complexe semblerait être moins polymérisée. Des études de transport avec une concentration constante de porphyrine et une concentration croissante de peptide permettrait de déterminer si l'état polymérisé de la PPIX dans le complexe est dû à la forte concentration en PPIX ou à un rapport molaire faible entre les deux composants.

### 5.3 Etudes des interactions dans le complexe

Nous avons dans un premier temps, déterminé si la présence du peptide modifie la constante de dimérisation de la PPIX calculée au paragraphe 4.1. Des interactions avec le peptide modifient le spectre de la PPIX de façon nette, aussi, dans un deuxième temps, nous avons calculé la constante d'affinité du peptide pour la PPIX.

#### Etude des interactions entre le peptide 1-23 $\alpha$ et la protoporphyrine

La technique la plus sensible pour étudier les interactions entre la PPIX et le peptide est la spectrofluorimétrie. Grâce à elle, nous pouvons nous placer à faibles concentrations en PPIX ou celle-ci est majoritairement sous forme de monomères. Comme nous l'avons vu précédemment, le monomère de PPIX émet un rayonnement de fluorescence, ce qui n'est pas le cas du dimère. Dans ces conditions, la constante de dimérisation de la PPIX en tampon acétate d'ammonium à pH 7 a pu être déterminée ( $18.10^6\text{M}^{-1}$ ). Si le peptide s'associe préférentiellement à l'une des deux formes de la PPIX (monomère ou dimère) cette constante de dimérisation devrait être modifiée puisqu'elle est le résultat d'un équilibre. Une gamme de concentration de PPIX de 0 à 0,6  $\mu\text{M}$  a été réalisée dans le tampon acétate d'ammonium 20 mM à pH 7. Chaque tube contient une quantité de peptide 10 fois supérieure à la PPIX en nombre de moles. L'intensité maximale de fluorescence est mesurée pour chaque

concentration et une courbe est réalisée (figure 22). Pour une raison de clarté, la fluorescence de la PPIX seule est reportée également.

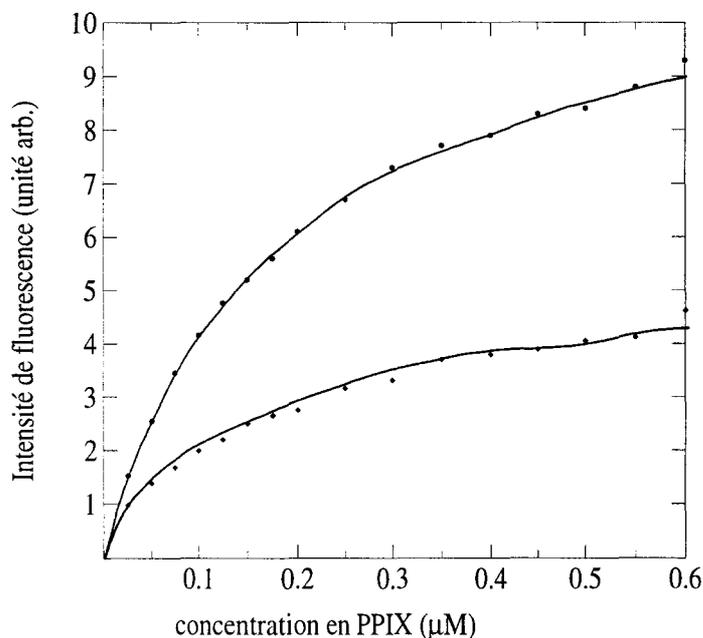


FIGURE 22 – Fluorescence à 622 nm de la PPIX en tampon acétate d'ammonium 20 mM à pH 7 en fonction de sa concentration. Le peptide est à une concentration 10 fois supérieure à celle de la porphyrine. (●) PPIX seule (◆) PPIX + peptide.

Dès les faibles concentrations en porphyrine, l'intensité de fluorescence est réduite en présence de peptide. Plus la concentration de PPIX augmente, plus cette différence s'accroît. Pour une concentration de 0,6  $\mu\text{M}$ , l'intensité de fluorescence est réduite de moitié en présence du peptide. La méthode de calcul de la constante de dimérisation mise au point par Margalit et coll. [Margalit et coll. 83] a été décrite précédemment au paragraphe 4.1. Afin de calculer la constante de dimérisation de la PPIX en présence de peptide, nous avons tracé la courbe  $\frac{T}{F} = f(F)$  (figure 23). Une constante de dimérisation apparente de  $58,9 \cdot 10^8 \text{M}^{-1}$  a été obtenue en présence du peptide contre  $18 \cdot 10^6 \text{M}^{-1}$  en son absence. Le peptide peut s'associer soit avec la forme monomère, soit avec la forme dimère, soit avec les deux. L'équilibre sera déplacé si une espèce est liée préférentiellement. Ici, l'intensité de fluorescence baisse. Seul le monomère émet un rayonnement de fluorescence. En considérant que la forme liée peptide-monomère n'émet pas de rayonnement de fluorescence, il semble que le peptide déplace l'équilibre vers une PPIX sous forme de dimère comme l'indique l'augmentation de la constante apparente de dimérisation.

#### Détermination de la constante d'affinité du peptide pour la porphyrine

La mesure de la constante de dissociation a été réalisé par spectrométrie UV-visible de différence. Les spectres UV-visible de la PPIX seule et en présence de peptide ont été enregistrés en tampon acétate d'ammonium 20 mM à pH 7. Ils sont

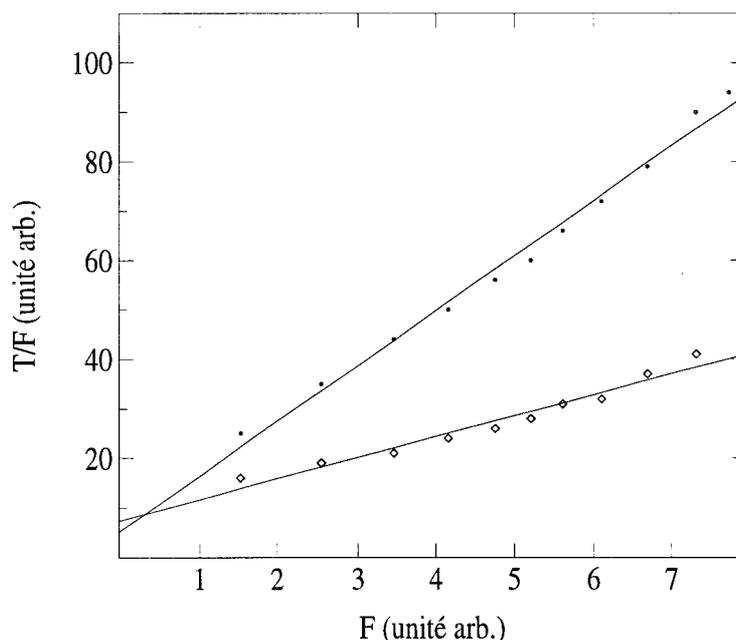
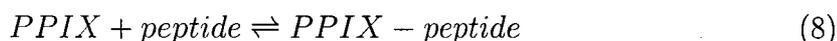


FIGURE 23 – Détermination de la constante de dimérisation de la PPIX en présence de peptide. Rapport de la concentration totale en PPIX sur l'intensité de fluorescence à 622 nm en fonction de l'intensité de fluorescence à 622 nm. Les points représentent les résultats expérimentaux et les droites sont obtenus par régression linéaire. (●) PPIX seule, (◇) PPIX additionnée du peptide 1-23  $\alpha$ .

regroupés dans la figure 24. Le spectre de la PPIX présente une bande de Soret très aplatie avec un maximum à 370 nm. Un épaulement marqué de cette bande est visible à 450 nm. Le spectre de PPIX en présence de peptide est sensiblement différent. La bande de Soret est déplacée vers l'UV avec un maximum à 390 nm et l'absorbance augmente légèrement par rapport à la PPIX seule. De plus, l'épaulement à 450 nm a tendance à disparaître. Ces modifications devraient permettre d'obtenir un spectre de différence interprétable.

Les spectres de différence ont été réalisés avec une concentration constante de 10  $\mu\text{M}$  de PPIX et une quantité croissante de peptide entre 0 et 57  $\mu\text{M}$  (figure 25).

Un premier pic avec une longueur d'onde maximale à 390 nm peut être visualisé, ainsi qu'un second plus faible en amplitude à 500 nm. Des points isobestiques sont également visibles permettant de conclure que nous nous trouvons en présence d'un équilibre simple entre les molécules dissociées et associées sous forme de complexe. L'équilibre en question peut se schématiser ainsi :



A la concentration utilisée pour réaliser les spectres de différence en UV-visible, la PPIX n'est pas uniquement sous forme de monomères. Nous avons montré grâce aux études de fluorescence que le processus de dimérisation de la PPIX commence pour une concentration inférieure à 0,05  $\mu\text{M}$  avec une constante de  $18 \cdot 10^6 \text{M}^{-1}$ . Nous

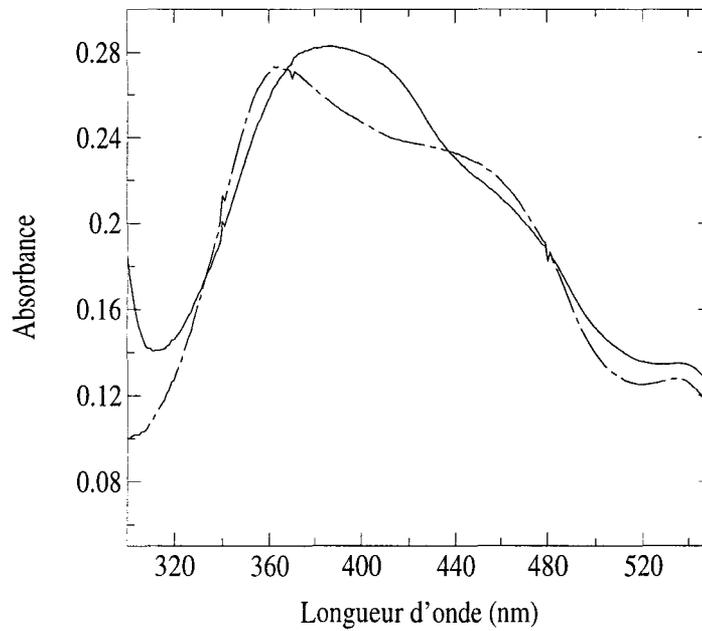


FIGURE 24 – Spectres UV-visibles de la PPIX seule à 10  $\mu\text{M}$  en tampon acétate d'ammonium 20 mM pH 7 (---) et après addition de peptide à 57  $\mu\text{M}$  finale (—).

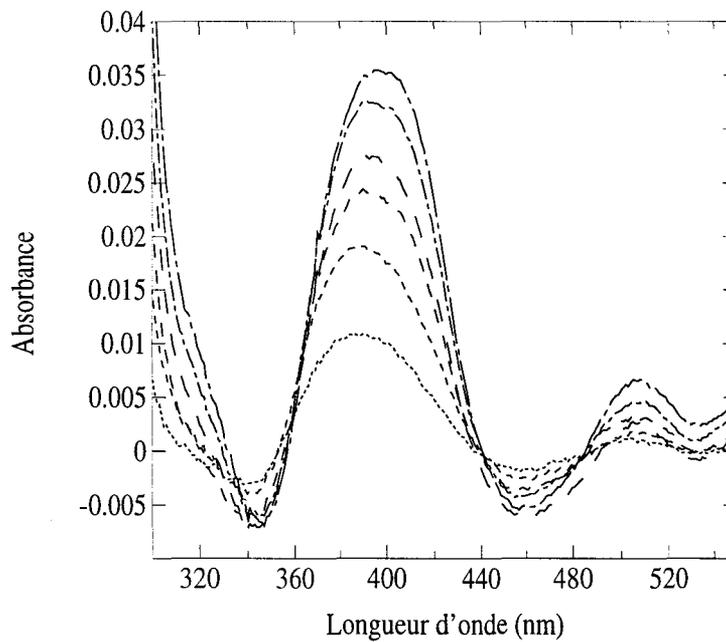


FIGURE 25 – Spectres de différence en UV-visible résultant des interactions peptide-PPIX. Les cuves contiennent 3 ml de PPIX à 10  $\mu\text{M}$  en tampon acétate d'ammonium 20 mM pH 7 auxquels sont ajoutés par incrément de 1,5 puis 3  $\mu\text{l}$  le peptide à 2,23 mM. Les concentrations finales de peptides varient de 0 à 57  $\mu\text{M}$ .

avons calculé le pourcentage de dimères de PPIX dans une solution à 10  $\mu\text{M}$ , afin de déterminer si les interactions avec le peptide ont lieu sous forme de dimères ou de monomères. La concentration en dimères obtenue est de  $4,7 \cdot 10^{-6} \text{M}$ . 6% seulement de la PPIX se trouvent donc sous forme de monomères dans la solution étudiée. De plus, nous avons vu précédemment en fluorescence que le peptide semblait s'associer à la PPIX sous forme de dimères. La réaction se produisant dans la cuve peut donc être décrite par l'équilibre suivant :



$$\text{à } t = 0: \quad D = D_0 \quad P = P_0$$

$$\text{à l'équilibre: } D = D_0 - DP \quad P = P_0 - DP$$

où  $D$  et  $P$  sont respectivement les concentrations à l'équilibre de la PPIX et du peptide.  $D_0$  est la concentration initiale de la solution de PPIX,  $P_0$  la concentration initiale du peptide. La constante de dissociation peut alors s'écrire de la façon suivante :

$$K_D = \frac{D \cdot P}{DP} = \frac{(D_0 - DP)(P_0 - DP)}{(DP)} \quad (10)$$

Dans nos conditions expérimentales,  $P_0$  n'est pas très différent de  $D_0$ , donc la représentation d'Eadie Scatchard n'est pas appropriée. Il faut calculer la concentration du complexe  $DP$  en fonction de  $D_0$  et  $P_0$ , ce qui mène à l'équation suivante :

$$DP = \frac{(K_D + D_0 + P_0) - \sqrt{((K_D + D_0 + P_0)^2 - 4D_0P_0)}}{2} \quad (11)$$

En mesurant les changements d'absorbance  $\Delta A$  des spectres de différence à 389 nm, correspondant à des concentrations variables de peptides (de 9,6 à 57  $\mu\text{M}$ ) pour une concentration en PPIX de 10  $\mu\text{M}$ ,  $\frac{\Delta A}{\Delta A_{max}}$  peut être déterminée.  $\Delta A_{max}$  est le changement maximal de l'absorbance correspondant à la saturation de la PPIX. A ce moment là :

$$\frac{\Delta A}{\Delta A_{max}} = \frac{DP}{D_0} \quad (12)$$

Nous déduisons alors l'expression suivante :

$$\Delta A = \Delta A_{max} \frac{(K_D + D_0 + P_0) - \sqrt{((K_D + D_0 + P_0)^2 - 4D_0P_0)}}{2D_0} \quad (13)$$

Il est nécessaire pour ce calcul de connaître les changements d'absorbance au maximum du spectre de différence, ici 389 nm. Les valeurs sont reportées dans une courbe en fonction de la concentration en peptide (figure 26). Le plateau représentant l'équilibre du système n'est pas atteint. Des points supplémentaires obtenus pour

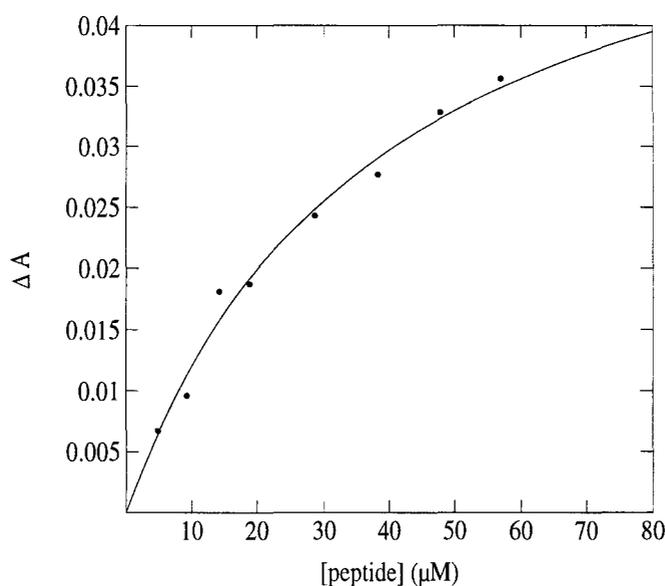


FIGURE 26 – Variations de l'absorbance à 389 nm des spectres de différence résultant des interactions peptide-PPIX. La PPIX est à une concentration de 10  $\mu\text{M}$  en tampon acétate d'ammonium 20 mM à pH . Les concentrations de peptides varient de 0 à 57  $\mu\text{M}$ . les points représentent les valeurs expérimentales et la courbe est obtenue par régression non linéaire à partir de l'équation (13).

des concentrations de peptides plus élevées n'apportent rien car les courbes ne passent plus par les points isobestiques. Ceci signifie que pour des concentrations plus élevées en peptide, un phénomène plus complexe que l'équilibre décrit ici se produit. Par conséquent, la valeur  $\Delta A_{max}$  est inaccessible expérimentalement. L'équation à résoudre devient donc une équation du second degré comprenant deux inconnues. A partir des points expérimentaux en notre possession et de l'équation (13), un logiciel d'approximation va estimer ces deux inconnues. La concentration initiale en PPIX est égale à la concentration initiale en dimères obtenue précédemment par calcul (4,7  $\mu\text{M}$ ). L'absorbance maximale calculée est de 0,059 et la constante de dissociation entre le peptide et le dimère de PPIX est de  $3,9 \cdot 10^{-5} \text{M}$ .

## 6 Etude des interactions de la PPIX avec des liposomes

La porphyrine est utilisée en photochimiothérapie des cancers. Par irradiation avec un laser, cette molécule produit des réactifs très toxiques tels que l'oxygène singulet qui vont provoquer de nombreux dommages dans la cellule et mèneront à sa mort. Afin d'agir, la PPIX doit parvenir à pénétrer à l'intérieur de la cellule. La PPIX peut traverser une membrane lipidique et entrer dans la cellule, mais uniquement sous sa forme monomère. Lorsque la PPIX est à une concentration menant à sa dimérisation en milieu aqueux, l'incorporation dans des liposomes se fait par un déplacement de l'équilibre vers le monomère [Margalit et coll. 83]. Afin d'apporter

la PPIX jusqu'aux cellules, il est nécessaire de la transporter car elle est insoluble en milieu aqueux à fortes concentrations. De nombreux transporteurs naturels existent dans notre organisme, des protéines du sérum telles que l'albumine [Fairley 38] ou l'hémopexine [Heide et coll. 64] et même les "low density lipoproteins" (LDL) [Mazière et coll. 91]. Cependant, pour injecter une dose thérapeutique massive de porphyrine à un patient, les recherches se sont orientées vers des transporteurs de taille plus réduite. L'un des objectifs de ce chapitre a été de prouver le transport de la porphyrine par un peptide issu de l'hémoglobine bovine. Nous avons déjà calculé la constante d'association entre le peptide 1-23 $\alpha$  et la porphyrine. L'inconnue restante à élucider est le passage éventuel de la PPIX du peptide à la membrane plasmique d'une cellule. Il devient donc nécessaire de définir l'association entre la PPIX et les lipides d'une membrane plasmique afin de comparer la force des deux liaisons (PPIX-peptide et PPIX-membrane). Nous avons dans un premier temps mis en évidence les interactions entre les lipides de liposomes et la PPIX. Dans un deuxième temps, nous avons déterminé la constante d'affinité de la PPIX pour les liposomes.

## 6.1 Mise en évidence des interactions de la porphyrine avec les liposomes

Ces interactions ont été mises en évidence par spectrofluorimétrie. La PPIX en solution aqueuse ne présente pas le même spectre de fluorescence que dans un environnement hydrophobe. L'allure générale est la même, mais la longueur d'onde maximale de fluorescence est décalée vers le visible et l'intensité de fluorescence est modifiée. Cette particularité nous a permis de suivre l'incorporation de la PPIX dans une membrane lipidique (hydrophobe) et de calculer la constante d'association correspondante.

La PPIX a été solubilisée en tampon Tris/HCl 50 mM à pH 7 à une concentration constante de 0,2  $\mu$ M. Les lipides sous forme de liposomes (LUV = large unilamellar vesicles), composés d'une bicouche lipidique simple ont été ajoutés en quantité croissante. Il ne s'agissait pas d'ajouts successifs de liposomes à une solution de PPIX initiale, mais d'une gamme comprenant une concentration de PPIX constante dans chaque tube et une concentration en liposomes variable. Cette précaution a été prise car la PPIX est très sensible à la lumière et ne peut être excitée de façon répétée sans réaction photochimique. Les spectres obtenus pour chaque concentration de liposomes testée sont rassemblés dans la figure 27. Le spectre de la PPIX en milieu aqueux présente deux maxima de fluorescence à des longueurs d'onde de 623 et 687 nm. L'intensité maximale de fluorescence est faible puisqu'elle est de 5,8. Le spectre de la PPIX en milieu lipidique présente lui aussi deux maxima de fluorescence mais à des longueurs d'onde de 636 et 707 nm. L'intensité maximale de fluorescence est quant à elle beaucoup plus élevée que dans le cas de la PPIX en milieu aqueux puisqu'elle est ici de 30,3 soit 5 fois plus. L'évolution d'un spectre à l'autre est observée grâce à plusieurs concentrations intermédiaires de liposomes. Nous pouvons remarquer, pour les faibles concentrations en liposomes, un épaulement du pic à 623 nm puis un dédoublement avec un nouveau sommet à 636 nm. Pour des concentrations plus élevées en liposomes, c'est le pic à 636 nm qui domine avec un épaulement à 623 nm. L'intensité maximale de fluorescence beaucoup plus élevée

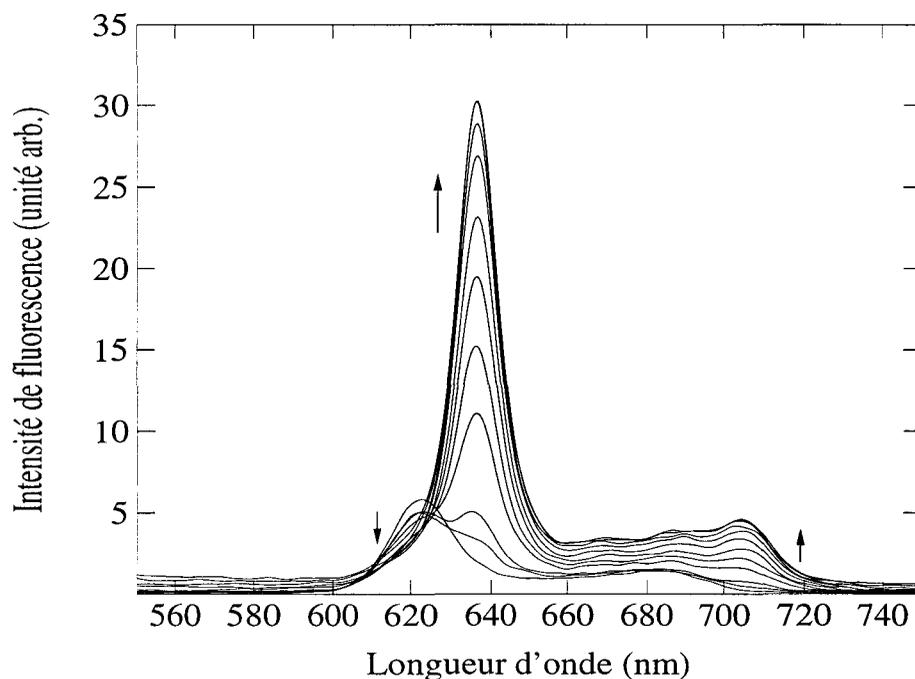


FIGURE 27 – Spectres de fluorescence de la PPIX  $0,2 \mu\text{M}$  dans le tampon Tris/HCl  $50 \text{ mM}$  à pH 7 en présence de quantités différentes de liposomes. La longueur d'excitation est de  $394 \text{ nm}$ . Les flèches indiquent la direction des changements spectraux lorsque la concentration en liposomes augmente. La concentration en liposomes est exprimée par rapport aux lipides apportés. Les concentrations en lipides varient de 0 à  $43,7 \mu\text{M}$ .

en milieu lipidique peut être expliquée par le fait que seules les molécules de PPIX sous forme de monomères sont incorporées dans la membrane. La concentration de la solution initiale de PPIX en milieu aqueux étant de  $0,2 \mu\text{M}$  la porphyrine est à 70% sous forme de dimères. Or, ces dimères n'émettent pas de rayonnement de fluorescence. L'intensité de fluorescence en milieu aqueux n'est donc pas représentative de la concentration en PPIX. Par contre, comme la PPIX est uniquement sous forme de monomères dans la membrane, l'intensité de fluorescence n'est pas sous estimée.

## 6.2 Calcul de la constante d'association

A partir de ces courbes qui représentent la saturation de la PPIX par les liposomes, nous avons pu calculer une constante d'association. Kuzelova et coll. [Kuzelova et Brault 94] ont étudié un système similaire (deuteroporphyrine et liposomes de dimyristoyl phosphatidyl choline DMPC) et ont établi de la façon décrite ci-dessous l'équation permettant de déterminer la constante d'association. Selon eux, l'incorporation dans les liposomes se fait en deux étapes distinctes. La première est l'incorporation à l'extérieur de la membrane et la seconde, l'incorporation à l'intérieur de la membrane. Le schéma de réaction peut s'écrire comme ceci :

$$P_f \rightleftharpoons P_0 \rightleftharpoons P_i \quad (14)$$

ou  $P_f$  est la concentration en PPIX libre aqueuse,  $P_0$  la concentration en PPIX incorporée à l'extérieur de la membrane, et  $P_i$  la concentration en PPIX à l'intérieur de la membrane. A l'équilibre, nous obtenons les relations suivantes :

$$P_i = \frac{k_{ti}}{k_{t0}} P_0 \quad (15)$$

$$P_f = \frac{k_{off}}{k'_{on}} P_0 \quad (16)$$

$$k'_{on} = k_{on} C_{lip} \quad (17)$$

$k_{ti}$ ,  $k_{t0}$ ,  $k_{off}$  et  $k'_{on}$  représentent les constantes de vitesse du schéma réactionnel (14). Lorsque les molécules de PPIX incorporées dans la membrane externe et dans la membrane interne sont considérées dans leur ensemble, une constante d'association générale est définie comme ceci :

$$K_l = \frac{P_i + P_0}{P_f C_{lip}} \quad (18)$$

ou  $K_l$  est égal à :

$$K_l = \left( 1 + \frac{k_{ti}}{k_{t0}} \right) \frac{k_{on}}{k_{off}} \quad (19)$$

Pour une longueur d'onde donnée et une concentration de PPIX fixe, la constante d'équilibre peut être tirée de l'équation :

$$F = F_0 + (F_{max} - F_0) \frac{K_l C_{lip}}{1 + K_l C_{lip}} \quad (20)$$

ou  $F$  est l'intensité de fluorescence à 636 nm,  $F_0$  la fluorescence initiale de la PPIX à 636 nm sans liposomes,  $F_{max}$  la fluorescence maximale obtenue à 636 nm dans le milieu uniquement lipidique et  $C_{lip}$  la concentration en lipides des liposomes.  $K_l$  est la constante d'association que nous cherchons à déterminer et  $F_{max}$  est inconnue car nous ne sommes pas sûrs d'atteindre la saturation. Cette équation présentant deux inconnues,  $K_l$  ne pourra être déterminée que par un ajustement des résultats expérimentaux par régression non linéaire.

La courbe représentant l'intensité de fluorescence à 636 nm en fonction de la concentration a été tracée (figure 28). Les points représentent les valeurs expérimentales, et la courbe, l'ajustement obtenu à partir de l'équation (20). Nous avons

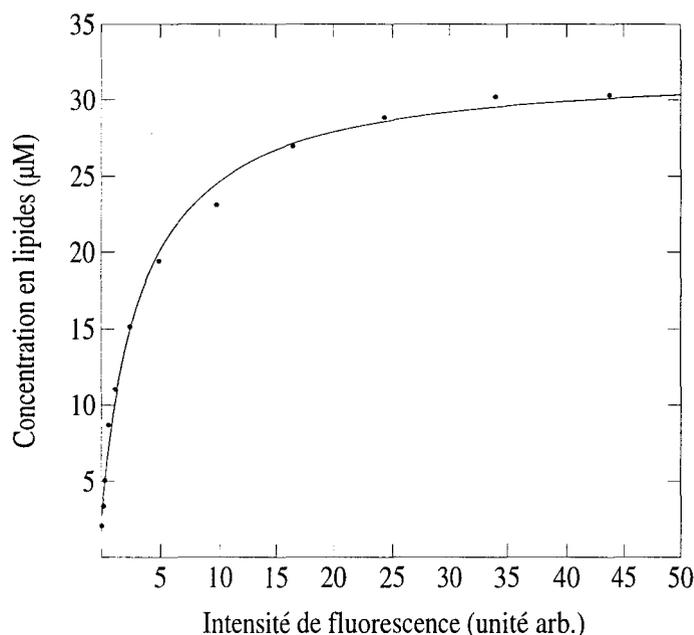


FIGURE 28 – Intensité de fluorescence à 636nm en fonction de la concentration en liposomes. La courbe est obtenue grâce à l'équation (20) par analyse régressive non linéaire.

déterminé une valeur de  $F_{max}$  de 35,26 et une constante  $K_l$  de  $2,87 \cdot 10^5 M^{-1}$ . Cette constante est très proche de la valeur obtenue par Kuzelova et coll. [Kuzelova et Brault 94] ( $1,4 \cdot 10^5 M^{-1}$ ) pour la deuteroporphyrine et des liposomes de DMPC. Dans ces deux exemples, la composition en lipides des liposomes et le type de porphyrine ne semblent pas avoir une grande influence sur la force de la liaison.

Nous venons de déterminer une constante d'association entre la PPIX et les lipides des liposomes. Auparavant, nous avons calculé la constante d'association entre la PPIX et le peptide transporteur 1-23 $\alpha$ . Le système dans son ensemble peut être traité afin de prévoir le devenir d'une molécule de PPIX injectée sous forme de complexe avec un peptide. La PPIX est capable de s'associer avec deux composés par l'intermédiaire d'une réaction d'équilibre.  $K_p$  la constante d'association entre le peptide et le dimère de PPIX est de ( $2,57^4 M^{-1}$ ) et  $K_l$  la constante d'association entre la PPIX et les liposomes est de  $2,87 \cdot 10^5 M^{-1}$ . La constante d'affinité est plus élevée pour les liposomes, la PPIX devrait donc être transférée du peptide aux liposomes. Cependant, il manque l'étude des interactions de la PPIX avec les liposomes en présence de peptide car le peptide transporte un dimère et la PPIX s'incorpore aux liposomes sous forme de monomères. Pour conclure, il est donc nécessaire de savoir si la PPIX apportée par le peptide sous forme de dimères peut être transférée aux liposomes.

## Conclusion

Nous avons présenté dans la première partie de ce chapitre une nouvelle méthode utilisable pour la préparation d'un peptide pur à partir d'un hydrolysate complexe d'hémoglobine bovine comprenant plus de 100 peptides. Cette méthode est composée d'une première étape de chromatographie d'échange d'ions à l'échelle pilote couplée à une électrodialyse elle aussi à l'échelle pilote afin d'éliminer les sels. La deuxième étape de CLHP de phase inverse n'est pas modifiée.

Grâce à ce nouveau procédé, nous avons isolé le peptide 1-23 $\alpha$ , basique et hydrophobe. Diverses études ont permis de montrer que ce peptide se présente sous forme de monomère en solution aqueuse, mais également qu'il semble avoir conservé la structure en hélice  $\alpha$  majoritaire qui était la sienne dans l'hémoglobine.

En vue d'études ultérieures sur les capacités anti-bactériennes des peptides amphiphiles, nous avons déterminé le pourcentage de lyse qu'induit ce peptide sur des liposomes. La composition de ces liposomes n'a pas été choisie au hasard, elle est strictement identique, en lipides mais également en proportions de ces lipides à ceux de la membrane plasmique d'*Escherichia coli*. Le peptide 1-23 $\alpha$  ne possède qu'une faible activité sur ces liposomes puisqu'un maximum de 16% de lyse est obtenu. L'expérience devra néanmoins être poursuivie en vérifiant que ce même peptide en présence d'un solvant augmentant la proportion en hélice  $\alpha$  (TFE) n'a pas plus d'action.

Les peptides amphiphiles sont principalement recherchés pour leur action solubilisante sur des molécules hydrophobes insolubles telles que la porphyrine. Nous avons souhaité mieux comprendre et caractériser les complexes formés entre le peptide 1-23 $\alpha$  et la PPIX. La PPIX en solution a une forte tendance à polymériser, aussi nous avons dû déterminer comment obtenir une solution moins polymérisée en milieu hydro-organique.

Le complexe formé avec le peptide 1-23 $\alpha$  a été caractérisé. D'une part, nous avons calculé sa capacité maximale qui est de 215  $\mu\text{g}$  de PPIX solubilisée pour 1 mg de peptide en tampon acétate d'ammonium 20 mM à pH7. Cela correspond à une stoechiométrie proche de 1/1 soit 10 fois meilleure que le peptide 110-125 $\alpha$  précédemment isolé au laboratoire [Cempel et coll. 95]. L'amélioration est donc nette. Nous avons déterminé que la capacité maximale mais également l'affinité sont affectées par le choix du tampon. L'étude des spectres du complexe à quant à elle permis de montrer que, même en partant d'une solution de PPIX sous forme de monomères, le complexe formé présente une PPIX sous forme de polymères.

Enfin, l'étude des interactions a permis le calcul d'une constante d'affinité de  $2,57 \cdot 10^4 \text{M}^{-1}$  entre la PPIX et le peptide. Par comparaison avec celle obtenue entre la PPIX et les lipides de liposomes ( $2,87 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$ ), nous pouvons penser que le transport de la PPIX par un peptide ne nuit pas à son action thérapeutique. L'affinité plus forte de la PPIX pour les lipides que pour le peptide devrait lui permettre de passer du peptide à une membrane. Toutefois, il serait nécessaire de vérifier cette hypothèse avec la PPIX sous forme de complexe avec le peptide.

## Deuxième partie

# Modification de la sélectivité de la réaction protéolytique en phase hétérogène



## Introduction

Cette deuxième partie est consacrée à des études sur la modification de la sélectivité de la réaction protéolytique par hydrolyse de l'hémoglobine en phase hétérogène. Nous avons décidé d'expérimenter une méthode qui impose des contraintes sur la protéolyse afin de protéger certains sites peptidiques de la protéine substrat. Pour cela, nous avons choisi un support en fonction des propriétés des séquences peptidiques que nous souhaitons préserver. Les peptides transporteurs de la PPIX doivent être amphiphiles et chargés positivement, le support choisi est donc une résine hydrophobe et chargée négativement. Afin d'évaluer cette approche et ses limites, nous avons étudié la modification de la réaction protéolytique avec une protéase très spécifique, l'endoprotéinase Glu-C et une protéase qui reconnaît un plus grand nombre de liaisons peptidiques, la chymotrypsine. Ces deux protéases sont d'autre part, à priori, capable de donner à partir de l'hémoglobine des peptides amphiphiles. Le support retenu est l'amberlyst 15 WET, une résine de polystyrène sur laquelle sont greffés des groupements  $\text{SO}_3^-$ . La taille des billes est de 0,8 mm et le diamètre moyen des pores est de 200 Å.

Dans un chapitre préliminaire, nous avons déterminé les conditions de mise en oeuvre des réactions enzymatiques en phase homogène et hétérogène. Nous avons défini d'autre part les critères de mise en évidence du changement de la sélectivité des hydrolyses enzymatiques.

Dans le deuxième chapitre, nous avons étudié la modification de la sélectivité de l'hydrolyse de l'hémoglobine par l'endoprotéinase Glu-C en phase hétérogène. Cette enzyme est très spécifique et n'hydrolyse ni au niveau des acides aminés hydrophobes ni au niveau des acides aminés positifs. Sa spécificité est restreinte aux acides glutamiques et aspartiques. Nous avons identifié tous les peptides présents en quantité suffisante pour être détectés dans les hydrolysats. Les coupures ont été étudiées et comparées à celles obtenues lors de l'hydrolyse en phase homogène, afin de déterminer l'influence du support sur la modification de la sélectivité de l'hydrolyse.

Dans le troisième chapitre, les hydrolyses ont été menées avec la chymotrypsine. Cette enzyme est peu spécifique et hydrolyse au niveau des acides aminés aromatiques et hydrophobes normalement adsorbés sur le support. Nous avons pu ainsi vérifier si l'adsorption de sites hydrophobes sur le support perturbait la sélectivité de l'hydrolyse chymotrypsique d'une liaison incluse. Ce chapitre n'a pas donné lieu à une étude systématique comme dans le cas de l'endoprotéinase Glu-C. Nous avons surtout étudié la cinétique et les hydrolysats finaux obtenus par chromatographie en CLHP de phase inverse. Un peptide marqueur de la réaction a été identifié et suivi. Enfin, un test de transport de la porphyrine a été effectué avec les deux hydrolysats permettant de déterminer si l'adsorption de l'hémoglobine sur le support a enrichi l'hydrolysats en peptide transporteur de porphyrine.



# Chapitre 1

## Matériels et Méthodes



## 1.1 L'hémoglobine

La protéine choisie comme substrat est l'hémoglobine bovine sous sa forme purifiée à 99% et lyophilisée (SIGMA), ainsi que sous sa forme purifiée à 99,9% et lyophilisée (SIGMA ref H-2500). L'hémoglobine la plus pure est réservée à l'étude systématique de l'hydrolysate (obtenu avec l'endoprotéinase Glu-C) afin de réduire au maximum les contaminants.

### 1.1.1 Préparation

Une solution mère à environ 15 % d'hémoglobine (P/V) est préparée en tampon phosphate 50 mM ou Tris/HCl 50 mM à pH 6, puis centrifugée 15 min à 3000 trs/min afin d'éliminer toutes traces de protéines non solubles. Un dosage précis est alors effectué par la méthode de Drabkin [Crosby et coll. 54].

### 1.1.2 Dosage par la méthode de Drabkin

#### *Principe:*

Le réactif de dosage comprend des ions cyanure qui se complexent au fer de l'hémoglobine oxydé à l'état ferrique. Lors de la réaction, la cyanométhémoglobine formée va être dosée par une lecture de la densité optique.

#### *Mode opératoire:*

50  $\mu$ l de la solution d'hémoglobine concentrée à doser sont ajoutés à 12,5 ml de réactif (phosphate monopotassique 1 mM, cyanure de potassium 0,75 mM, ferricyanure de potassium 0,6 mM en solution aqueuse). La lecture de la densité optique se fait à 546 nm, après 10 minutes de réaction, contre le réactif seul. Sachant qu'une solution standard d'hémoglobine à 14,7% (P/V) donne une D.O. de 0,4 par cette méthode, la concentration en hémoglobine peut alors être calculée à partir de la formule suivante :

$$X = \frac{14,7Y}{0,4} \quad (21)$$

ou  $Y$  correspond à la densité optique à 546 nm, et  $X$  à la concentration en g pour 100 ml d'hémoglobine.

## 1.2 Les protéases

Deux enzymes ont été choisies en fonction de leur spécificité. L' $\alpha$ -chymotrypsine bovine (3.4.21.1) (SIGMA ref C-3142) est une enzyme peu spécifique; elle est traitée par le TLCK (Tosyl-L-Lysyl-Chlorométhylcétone) afin d'inhiber la trypsine résiduelle non éliminée lors de la purification. L'endoprotéinase Glu-C (3.4.21.19) (SIGMA ref P-8400) très spécifique, est produite par la souche V8 de *Staphylococcus aureus*.

Chaque hydrolyse est précédée par un dosage de l'activité enzymatique afin de s'assurer que la solution mère n'a pas évolué, ou que les lots suivants d'enzyme sont équivalents. Une dérive de l'activité enzymatique est alors corrigée par un ajustement du volume d'enzyme incorporé à la solution d'hydrolyse.

### 1.2.1 Dosage de l'activité de la chymotrypsine avec un substrat synthétique

Le substrat synthétique utilisé pour le dosage de l'activité enzymatique de la chymotrypsine est le suc-Ala<sup>2</sup>-Pro-Phe-paranitroanilide (SIGMA ref S-7388). La solution mère de substrat synthétique est à 10 mM dans un tampon Tris/HCl 0,1 M pH 7,4 contenant 0,5 M NaCl et 9% de DMSO. La solution mère d'enzyme est à  $3,8 \cdot 10^{-4}$  M dans une solution d'HCl  $10^{-3}$  M. Le tampon de réaction est le suivant : Tris 0,1 M pH 7,4; NaCl 0,5 M; DMSO 9%. La concentration finale de la chymotrypsine et du substrat synthétique dans la cuve de lecture sont respectivement de  $3,2 \cdot 10^{-8}$  M et  $0,2 \cdot 10^{-3}$  M. Le suivi de la cinétique est effectué à 410 nm et l'activité est exprimée en  $\Delta$ D.O./nmole d'enz/min. Le rapport *E/S* choisi est de 1/50 (mole/mole) pour l'hydrolyse de l'hémoglobine. Dans ce cas l'activité enzymatique introduite doit toujours être égale à 1,9  $\Delta$ D.O./min pour 1 mg d'hémoglobine.

### 1.2.2 Dosage de l'activité de l'endoprotéinase Glu-C avec un substrat synthétique

Il est réalisé sur un substrat synthétique Nt-Boc-Glu- $\alpha$ -phenyl ester (SIGMA ref B-3016). Les concentrations des solutions mères de substrat synthétique et d'enzyme sont respectivement à des concentrations de  $2,57 \cdot 10^{-2}$  M et  $1,85 \cdot 10^{-4}$  M. Le tampon de réaction est le tampon phosphate 50 mM à pH 7,8. La concentration finale de l'enzyme dans la cuve de lecture est de  $3,08 \cdot 10^{-8}$  M et celle du substrat est de  $4,3 \cdot 10^{-4}$  M. Le suivi de la cinétique se fait à 270 nm et l'activité est exprimée en  $\Delta$ D.O./nmole d'enz/min. Dans ce cas, l'activité enzymatique introduite doit toujours être égale à 1,08  $\Delta$ D.O./min pour 1 mg d'hémoglobine.

## 1.3 Le support

C'est une résine polystyrénique fournie par la société Rohm et Haas France (Amberlyst 15 WET). Sa structure est de type macroréticulée. Le diamètre moyen des billes est de 600 à 850  $\mu$ m avec un diamètre moyen des pores de 240 Å. Elle supporte des températures élevées et les solvants organiques. Cette résine sulfonique (donc chargée négativement) est très hydrophobe. Elle est conditionnée et fournie sous forme acide ( $H^+$  comme contre-ion). L'utilisation comme support de protéines nécessite le changement de conditionnement. Le contre-ion  $H^+$  est remplacé par un contre-ion  $Na^+$ . La forme sodium neutre est obtenue en plaçant la résine dans une solution saline 1M. Cette dernière est remplacée régulièrement jusqu'à obtention d'un pH neutre stable, ce qui signifie que tous les protons ont été échangés.

## 1.4 Conditions d'hydrolyse

Les conditions d'hydrolyses sont les mêmes quelle que soit l'enzyme considérée. La seule différence résulte dans le tampon utilisé lors de l'hydrolyse. L'hydrolyse chymotrypsique est réalisée en tampon Tris 50 mM à pH 6, alors que l'hydrolyse par l'endoprotéinase Glu-C est réalisée dans un tampon Phosphate 50 mM à pH 6.

### 1.4.1 Hydrolyse de l'hémoglobine en phase homogène

Une solution d'hémoglobine à 2% est préparée par dilution de la solution mère préalablement dosée selon la méthode décrite au paragraphe 1.1.2. Pour cela, un tampon Tris/HCl 50 mM à pH 6 ou phosphate 50 mM à pH 6 est utilisé selon l'enzyme. Les hydrolyses sont effectuées à 37°C.

L'hydrolyse de l'hémoglobine dénaturée s'effectue en ajoutant 0,1% de SDS à la solution d'hémoglobine à 2%. Lors des cinétiques réalisées avec la chymotrypsine, des prélèvements de 500  $\mu$ l sont effectués. La réaction enzymatique est stoppée par l'ajout de PMSF en solution dans l'isopropanol (40  $\mu$ l à 0,2 M) dans les proportions 1/1000 (mole/mole).

### 1.4.2 Hydrolyse de l'hémoglobine en phase hétérogène

*Adsorption de l'hémoglobine sur la résine.*

- 2 ml d'une solution d'hémoglobine à 7,15% dans du tampon phosphate 50 mM à pH 6 (contenant éventuellement 0,1% de SDS pour l'obtention d'hémoglobine dénaturée) sont mis en contact avec 2,5 ml de résine.
- L'ensemble est soumis à une agitation magnétique faible pendant une nuit pour obtenir une fixation maximale.
- La résine est lavée avec du tampon phosphate 50 mM à pH 6 ou du tampon Tris/HCl 50 mM à pH 6, afin d'éliminer l'hémoglobine non adsorbée. Celle-ci est dosée par spectrophotométrie à 226 nm afin de déterminer la quantité adsorbée. La quantité d'hémoglobine adsorbée est calculée par différence. Dans ces conditions, nous obtenons toujours une valeur proche de 20 mg d'hémoglobine/ml de résine.

*Hydrolyse.*

L'hémoglobine adsorbée sur la résine est placée dans un tampon Tris/HCl ou phosphate 50 mM à pH 6 additionné de SDS (0,1% final) dans le cas de l'hydrolyse de l'hémoglobine dénaturée (200  $\mu$ l de tampon pour 1 ml de résine). L'enzyme est ajoutée selon un rapport *E/S* de 1/50 (mole/mole). Les hydrolyses sont menées à 37°C. Pour la réalisation des cinétiques avec la chymotrypsine, des hydrolysats distincts sont effectués pour chaque temps à partir du même lot d'hémoglobine adsorbée.

*Arrêt des hydrolyses.*

L'arrêt des réactions d'hydrolyse est réalisé par un protocole distinct selon l'enzyme utilisée.

- La chymotrypsine est inhibée par l'ajout de PMSF en quantité 1000 fois supérieure à l'enzyme en nombre de mole, soit 80  $\mu$ l de PMSF à 0,2 M dans l'isopropanol pour 1 ml de résine. Une incubation de 15 minutes permet à l'inhibiteur d'agir.
- L'endoprotéinase Glu-C est stoppée par dénaturation grâce à un solvant organique, l'acétonitrile (à 50% final). 200 $\mu$ l d'acétonitrile sont ajoutés dans le milieu, et une incubation de 15 minutes est effectuée.

*Elution de l'hydrolysate peptidique.*

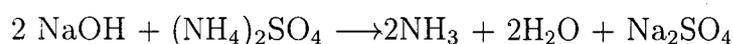
Le surnageant de la résine est prélevé, puis 3 bains d'élution sont appliqués.

- Deux bains d'une durée de 2h contenant un tampon borate 50 mM à pH 9,5 et 0,1% de SDS (2ml pour le premier bain et 1ml pour le second). 80  $\mu$ l de PMSF sont ajoutés dans chaque bain dans le cas de la chymotrypsine.
- Un bain d'une nuit (1 ml) contenant du tampon borate 50 mM à pH 9,5 et de l'acétonitrile en proportion 50/50 (V/V).

**1.5 Dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl.***Principe :*

- L'échantillon est minéralisé à chaud par l'acide sulfurique concentré en présence d'un catalyseur approprié. Tout l'azote organique est alors transformé en azote minéral sous forme de sulfate d'ammonium.

- Le sulfate d'ammonium obtenu est déplacé par de la soude concentrée :



- L'ammoniac formé est entraîné sous un courant de vapeur d'eau, recueilli dans un volume connu d'une solution d'acide sulfurique exactement titrée:



- L'acide sulfurique en excès est dosé par la soude en présence de rouge de méthyle.



*Réactifs :*

- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré à 98%
- catalyseur de Kjeldahl
- NaOH 10 M
- NaOH 0,1 M titrée

*Protocole :*

100mg d'échantillon, 1 pastille de catalyseur et 15 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré sont introduits dans un matra. Le matra est placé dans un bain sec et relié à un aspirateur de vapeurs relié à une pompe à vide. La minéralisation est effectuée en deux temps. On chauffe à 250°C pendant 20 min, puis à 380°C pendant 45 min. Le chauffage doit être poursuivi jusqu'à obtention d'une solution de couleur vert limpide. Le matra est alors placé dans le distillateur (Gerhardt, vapodest 3). La distillation commence après introduction automatique de 12 ml d'eau distillée et de 60 ml d'une solution concentrée de soude 12 M, et dure 8 minutes. Le distillat est recueilli dans 40 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 M. L'excès de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> est dosé par une solution de soude à 0,1 M.

Analyse des résultats :

- N<sub>2</sub> le titre d'acide sulfurique
- V<sub>2</sub> le volume d'acide sulfurique
- N<sub>3</sub> le titre de la soude
- V<sub>3</sub> le volume de soude
- N le nombre de moles d'azote

$$N = 2N_2V_2 - N_3V_3$$

## 1.6 Dosage du SDS.

*Principe :*

Le SDS est dosé par réaction colorimétrique avec le chlorhydrate de pararosaniline (0,4 mM) en utilisant le phénomène de partage entre la phase aqueuse et la phase organique (chloroforme/acétate d'éthyle, V/V). La pararosaniline restera dans la phase aqueuse en absence de SDS et sera extraite dans la phase organique en présence de SDS, en quantité proportionnelle à la concentration de SDS. Une gamme étalon de 0 à 0,1% de SDS en milieu aqueux permet de déterminer la quantité de SDS dans les échantillons inconnus.

*Mode opératoire :*

10 µl d'échantillon à doser sont ajoutés à 200 µl de chlorhydrate de pararosaniline, 800 µl d'eau et 1 ml du mélange chloroforme/acétate d'éthyle (V/V). Une agitation au vortex de trente secondes est appliquée afin de permettre le partage entre la phase organique et la phase aqueuse, puis une centrifugation de 5 minutes à 3000 trs/min permet de séparer les phases. La densité optique de la phase inférieure organique est lue à 545 nm.

## 1.7 CLHP analytique

Les hydrolysats obtenus avec la chymotrypsine sont étudiés par CLHP de phase inverse en gradient. Cette technique permet un fractionnement de l'hydrolysat, représenté sous forme de chromatogramme qui sert de base à une analyse comparée des deux systèmes (homogène et hétérogène). Dans le cas de l'endoprotéinase Glu-C, la CLHP ne sert pas vraiment d'outil d'étude, mais plutôt d'outil de séparation et de purification de tous les peptides présents dans les hydrolysats. La technique consiste à injecter l'hydrolysat total en CLHP de phase inverse en gradient d'acétonitrile. Cela permet une séparation en plusieurs fractions qui sont récoltées. Ces fractions sont réinjectées en CLHP de phase inverse, mais cette fois en conditions isocratiques, c'est à dire à un pourcentage donné de tampon B. Grâce à cette deuxième étape, nous vérifions la pureté d'une fraction et séparons les différentes peptides si celle-ci en contient plusieurs. Les fractions majoritaires sont récoltés en vue d'une analyse d'acides aminés.

### 1.7.1 CLHP analytique en gradient de solvants

Le gradient utilisé le plus couramment au laboratoire pour la séparation des hydrolysats d'hémoglobine bovine est le suivant :

Le tampon A est composé d'eau de qualité milli-Q et de TFA à 0,1%. Le tampon B est composé d'un mélange eau/acétonitrile 40/60 (V/V) et de TFA 0,1%. Des échantillons de 100  $\mu$ l contenant 0,2 mg d'hydrolysats sont injectés sur la colonne. Le gradient généralement utilisé est résumé dans le tableau 4 et comprend deux phases distinctes. La première phase de ce gradient est très rapide avec une pente de 2,23% de tampon B par minutes pendant trente minutes. La deuxième phase est beaucoup plus lente et proche de ce qui se fait habituellement avec 0,57% par minutes pendant 35 minutes.

temps(min)	A(%)	B(%)	Débit(ml/min)
0	100	0	1
30	33	67	1
65	13	83	1
70	100	0	1
75	100	0	1
75.1	100	0	0

TABLEAU 4 – Gradient de chromatographie utilisé pour les hydrolysats d'hémoglobine.

Ce gradient n'est pas le seul utilisé. La caractérisation du peptide marqueur 1-14 $\alpha$  dans le cas de l'étude de l'hydrolyse chymotrypsique a nécessité quelques adaptations. En effet, le gradient classique ne permet pas d'obtenir le peptide marqueur pur, ce qui empêche une quantification directe. Une modification a donc été effectuée afin de séparer les différentes espèces présentes dans cette fraction. Pour cela la première

phase du gradient a été interrompue par une phase de quinze minutes pendant laquelle le pourcentage de tampon B reste constant à 23,5%. Ce gradient est résumé dans le tableau 5.

temps(min)	A(%)	B(%)	Débit(ml/min)
0	100	0	1
11	76.5	23.5	1
26	76.5	23.5	1
41	33	67	1
76	13	83	1
81	100	0	1
86	100	0	1
86.1	100	0	0

TABLEAU 5 – Gradient de chromatographie modifié utilisé pour les hydrolysats chymotrypsiques d'hémoglobine.

Pour les hydrolysats chymotrypsiques, le matériel utilisé est le suivant :

- un contrôleur Waters 600
- une pompe Waters 626
- un détecteur Waters équipé de photodiodes
- un pentium 164 Digital
- un logiciel Waters Millenium pour l'acquisition et le traitement des chromatogrammes
- une colonne Vydac (4,6mmx20mm) de type C<sub>4</sub> (200 µg injecté)

Le détecteur à barrettes de diodes permet d'obtenir des chromatogrammes sur une gamme de diverses longueurs d'ondes. Dans notre cas, les spectres sont enregistrés entre 200 et 600 nm, avec une bande passante de 1,2 nm et une résolution de 0,2 nm. Les spectres sont saisis à raison de 1 spectre par seconde. Le logiciel Millenium permet d'extraire un chromatogramme à une longueur d'onde voulue (226nm) et de calculer la pureté d'une fraction donnée. Il calcule également les dérivées premières  $\frac{dA}{d\lambda}$  et secondes  $\frac{d^2A}{d\lambda^2}$  permettant de déterminer si le peptide possède des acides aminés aromatiques.

Pour les hydrolysats obtenus avec l'endoprotéinase Glu-C, le matériel utilisé est le suivant :

- Un contrôleur Waters 600E
- Une pompe Waters
- Un détecteur LKB 2510 Uvicord SD
- Un intégrateur Waters 746

- Une colonne Vydac (4.6 mm x 20mm) de type C4 (injection de 100  $\mu$ l)

### 1.7.2 CLHP analytique en conditions isocratiques

Toutes les fractions récoltées après la première séparation obtenue en gradient d'acétonitrile sont lyophilisées et remises en solution dans un mélange eau/acétonitrile équivalent, en proportion à celui auquel elles vont être réinjectés en mode isocratique pour une deuxième étape de purification. La technique habituellement appliquée consiste à déterminer le pourcentage de tampon B auquel une fraction est éluée en mode gradient (grâce au temps de rétention). Ce pourcentage est diminué de 2% et est appliqué pour la deuxième chromatographie. En règle générale, les espèces se séparent et sont éluées à des temps de rétention différents. Ces conditions ont été appliquées à nos échantillons, mais les espèces coexistantes dans un même pic n'ont pas été séparées. Pour y parvenir, il a été nécessaire d'appliquer un pourcentage de tampon B inférieur de 20% au pourcentage théorique pour les pics récoltés lors de la première phase du gradient. La différence est très élevée par rapport à ce qui se fait habituellement, mais cette phase est très rapide (2,23% par minute). Dans ces conditions, le pourcentage de tampon B calculé est très approximatif, ce qui explique les différences observées entre le pourcentage de tampon B calculé et celui utilisé. Lors de la deuxième phase du gradient, les conditions appliquées en chromatographie isocratique sont beaucoup plus proches de la normale. Nous appliquons un pourcentage de tampon B inférieur de 4% seulement au pourcentage calculé. Cette partie du gradient est beaucoup plus lente (0,57% par minute) ce qui explique les résultats.

Le matériel utilisé lors de cette étape de chromatographie isocratique est la chaîne Waters décrite plus tôt.

### 1.7.3 Détection des acides aminés aromatiques, et calcul des rapports molaires

Les proportions relatives en acides aminés aromatiques dans un peptide peuvent être déterminées par l'analyse des spectres dérivés, selon la méthode mise au point par Miclo et coll. [Miclo et coll. 95]. La phénylalanine se distingue par une absorption caractéristique dans la zone 240-275 nm. Son absorption à 280 nm est nulle. Le maximum d'absorption se situe à 257,7 nm et avec un coefficient d'extinction molaire estimé à  $195,1 \pm 1.5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

La tyrosine absorbe dans l'UV proche, entre 250 et 295 nm, avec un maximum d'absorption à 275 nm et un coefficient d'extinction moléculaire de  $1405 \pm 7 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Le tryptophane absorbe dans la même zone que la tyrosine avec néanmoins une bande spectrale plus large: entre 245 et 310 nm. Son Maximum d'absorption dans cette zone se situe à 278,7 nm avec un coefficient d'extinction molaire de  $5579 \pm 14 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Un second maximum est visualisé à 271,9 nm avec un coefficient d'extinction molaire de  $5344 \pm 5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Mais c'est surtout l'épaulement situé à 287,6

nm (coefficient d'extinction molaire  $4650 \pm 12 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) qui caractérise cet acide aminé.

Si les caractéristiques propres à chaque acide aminé permettent de les différencier uniquement par leur spectre UV, un mélange d'acides aminés aromatiques ne peut pas être identifié par son spectre. C'est là qu'intervient la spectrométrie dérivée. Elle met plus clairement en évidence les épaulements et points d'inflexions, ce qui permet de discerner la présence de chaque acide aminé aromatique dans un mélange. Il existe une relation directe entre la hauteur des bandes spectrales en dérivée et la concentration des composés [Miclo et coll. 95]. Les spectres de ces trois acides aminés, ainsi que les dérivées premières et secondes de leurs spectres sont rassemblés dans la figure 29.

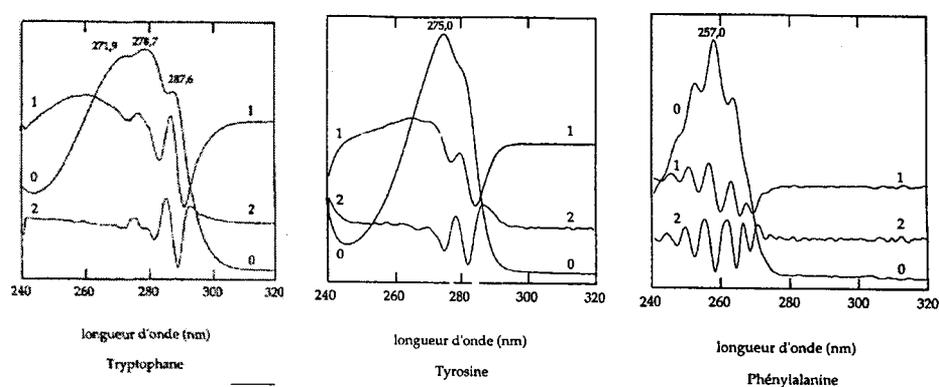


FIGURE 29 – Spectres, dérivée première et seconde des spectres des acides aminés aromatiques. 0 correspond au spectre, 1 à la dérivée première du spectre et 2 à la dérivée seconde du spectre.

### Détermination du rapport Tyr - Trp

La présence d'un point d'inflexion à 287,4 nm sur le spectre non dérivé est caractéristique de la présence de Trp dans le peptide. Le rapport Trp/Tyr est accessible à partir des profondeurs des puits à 284 nm et 290 nm observés sur la dérivée première du spectre (fig. 30), et est déterminé à partir de la relation suivante :

$$\frac{\Delta B_1}{\Delta A_1} = 1,097 \log \frac{Tyr}{Trp} - 0,542 \quad (22)$$

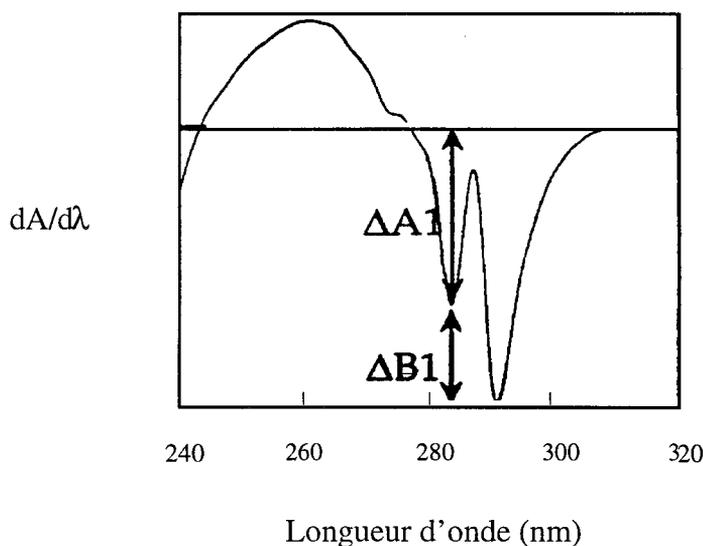


FIGURE 30 – Dérivée première du spectre d'un mélange contenant les acides aminés tryptophane et tyrosine en quantité égales.

### Détermination du rapport Trp - Phe

Le rapport Trp/Phe est déterminé à l'aide de la dérivée seconde du spectre (fig. 31) d'après les profondeurs du puits à 292,7 nm caractéristique du Trp, et du puits à 257,6 nm caractéristique de Phe, à partir de la relation suivante :

$$\frac{\Delta B_2}{\Delta A_2} = 0,885 \log \frac{Trp}{Phe} + 0,990 \quad (23)$$

### Détermination du rapport Tyr -Phe

Le rapport Tyr/Phe est déterminé à l'aide de la dérivée seconde du spectre figure 32 d'après les profondeurs du puits à 282,5 nm caractéristique de Tyr, et du puits à 257,6 nm caractéristique de Phe à partir de l'expression suivante :

$$\frac{\Delta B_3}{\Delta A_3} = 0,953 \log \frac{Tyr}{Phe} + 0,321 \quad (24)$$

Pour un peptide inconnu, la présence d'acides aminés aromatiques est déterminée comme suit :

La présence de tryptophane est vérifiée sur le spectre peptidique (épaulement à

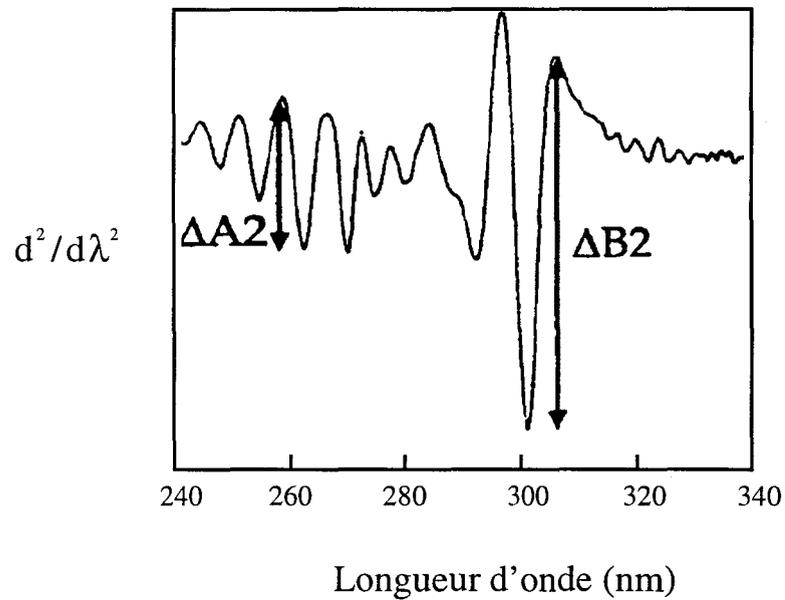


FIGURE 31 – Dérivée seconde du spectre d'un mélange contenant les acides aminés tryptophane et phenylalanine en quantités 1/5.

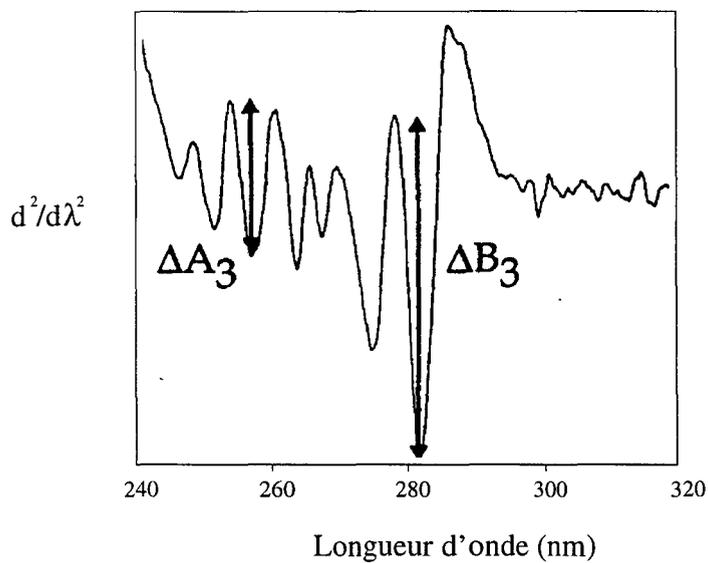


FIGURE 32 – Dérivée seconde du spectre d'un mélange contenant les acides aminés phenylalanine et tyrosine en quantités 2/1.

287,4 nm) ou sur la dérivée I du spectre (vallée aux environs de 290 nm). Si le peptide contient du tryptophane, il faut ensuite vérifier la présence de tyrosine (calcul à partir des vallées aux environs de 280 et 290 nm en dérivée I). Dans le cas où le rapport des amplitudes est identique à celui obtenu avec le tryptophane seul (-1,2), alors le peptide ne contient que du tryptophane. En dérivée II, la présence de phénylalanine est ensuite vérifiée (présence de pics et de vallées entre 250 et 275 nm) et le rapport Trp/Phe peut être calculé. Pour un peptide ne contenant pas de tryptophane, il faut alors vérifier la présence de tyrosine (vallée à 280 nm sur le spectre de dérivée I). La présence de phénylalanine peut ensuite être vérifiée en dérivée II et le rapport Tyr/Phe calculé.

## 1.8 Analyse des acides aminés par dérivation au PITC

### *Principe.*

L'hydrolyse des peptides est réalisée en utilisant une station PICOTAG (Waters). Elle est effectuée en présence de vapeurs d'acide chlorhydrique (6N) et 1% de phénol pendant 24h à 110°C. Les acides aminés sont ensuite dérivés par le phénylisothiocyanate (PITC) sous forme de phénylthiocarbamate d'aminoacides (PTC) qui sont ensuite analysés par CLHP sur une colonne Picotag de phase inverse du type C18 (3,9 mmx150 mm, Waters) dans un four à 38 °C selon la méthode de Bidlingmeyer et coll [Bidlingmeyer et coll. 84]. La détection est effectuée à 254 nm.

### *Hydrolyse acide du peptide*

Les fractions récoltées lors de la chromatographie en gradient sont lyophilisées puis remises en solution dans 50  $\mu\text{l}$  d'un mélange eau-acétonitrile 4/1. Le volume ne doit pas excéder 50  $\mu\text{l}$ . Les tubes sont séchés sous vide (65 mtorr pendant 15 min). Un volume de 200  $\mu\text{l}$  du mélange HCL/phénol (1 ml HCl + 10  $\mu\text{l}$  de phénol) est alors ajouté à chaque flacon contenant 12 tubes. Le vide est fait dans les tubes, mais ceux-ci ne doivent pas être séchés, puis ils sont introduits dans le four à 109 °C pendant 20 à 24 h.

### *Séchage*

Les tubes sont ôtés des flacons avec des pinces. Les flacons sont rincés avec un mélange eau/méthanol puis les tubes sont replacés à l'intérieur. Le témoin est réalisé à ce moment avec l'introduction de 5  $\mu\text{l}$  de standard dans un tube vide.

### *Resséchage*

Un mélange éthanol/eau/TEA (200  $\mu\text{l}$ /200  $\mu\text{l}$ /200  $\mu\text{l}$ ) est préparé extemporanément et 10  $\mu\text{l}$  sont ajoutés dans chaque tube. Après une agitation au vortex, les tubes sont réintroduits dans les flacons pour être séchés sous vide.

### *Dérivation*

La quantité nécessaire de mélange éthanol/TEA/eau/PITC (350  $\mu$ l/50  $\mu$ l/50  $\mu$ l/50  $\mu$ l) est préparée juste avant l'emploi. Dans chaque tube sont introduits 20  $\mu$ l de ce mélange. Un temps de 20 minutes à température ambiante est appliqué, avant de sécher sous vide pendant 45 minutes ou plus afin d'évaporer tout le PITC.

### *Dilution et injection*

Le standard est dilué dans 600  $\mu$ l de diluant, et 8  $\mu$ l de standard correspondant à 250 pmoles d'acides aminés sont injectés. Les échantillons sont stables 2 mois au congélateurs pour les tubes secs et 60 h au réfrigérateur pour les tubes contenant du diluant. 50  $\mu$ l de diluant sont ajoutés aux tubes secs, et les échantillon sont injectés.

### *Analyse par CLHP de phase inverse*

L'éluant A est préparé de la façon suivante :

1. Peser 10 g d'acétate de sodium trihydraté
2. Ajouter 1 l d'eau
3. Ajouter 0,5 ml de TEA
4. Titrer jusqu'à pH 6,4 avec l'acide acétique glacial
5. Filtrer la solution
6. Prendre 940 ml de la solution et ajouter 60 ml d'acétonitrile

L'éluant B est préparé de la façon suivante :

1. Mesurer 600 ml d'acétonitrile dans une éprouvette graduée
2. Mesurer 400 ml d'eau de qualité milli-Q dans une autre éprouvette graduée
3. Mélanger les deux
4. Dégazer par sonication sous vide pendant 20 secondes

Le diluant échantillon est préparé de la façon suivante :

1. Peser 710 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
2. Ajouter 1 l d'eau
3. Titrer à pH 7,4 avec de l'acide phosphorique à 10 %
4. Mélanger cette solution avec de l'acétonitrile afin d'obtenir une solution à 5 % en volume d'acétonitrile

Le gradient utilisé pour la séparation est présenté sur le tableau suivant:

temps(min)	Débit(ml/min)	(%)A	(%)B
0	1	100	0
10	1	54	46
10,5	1	0	100
11,5	1	0	100
12	1,5	0	100
12,5	1,5	100	0
20	1,5	100	0
20,5	1	100	0

L'injection du standard permet d'obtenir un chromatogramme de référence (figure 33). Les profils chromatographiques des différents échantillons sont déterminés et les proportions relatives de chaque acide aminé sont obtenues par comparaison avec le standard.

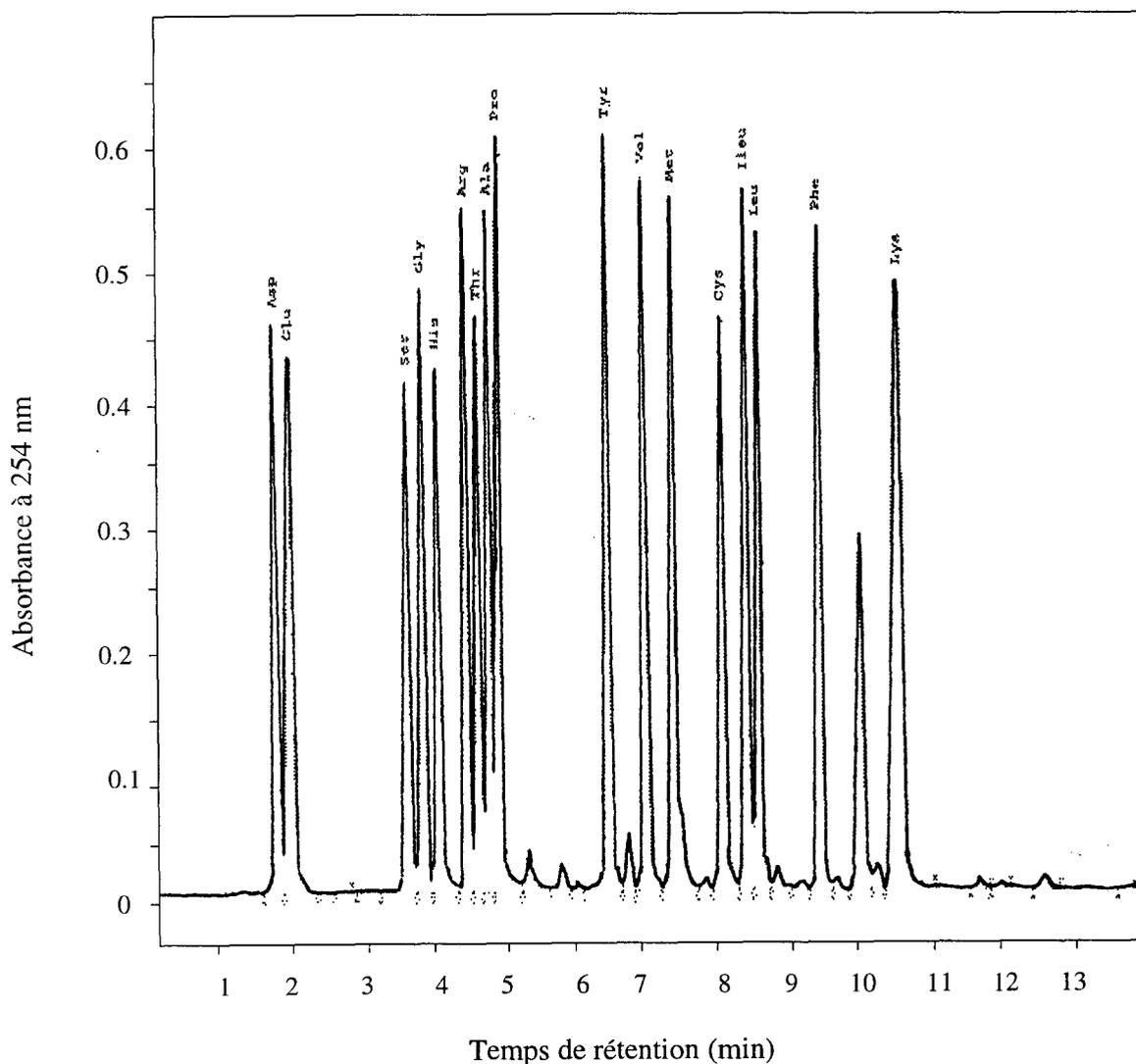


FIGURE 33 – Profil chromatographique obtenu pour 250 pmol de mélange standard Pierce (mélange contenant les acides aminés Asp, Glu, Ser, Gly, His, Arg, Thr, Ala, Pro Tyr, Val, Met, Cys, Ile, Leu, Phe et lys en quantités équimolaires) sur la colonne PICO-TAG en appliquant le gradient fourni dans le tableau 1.8.



## Chapitre 2

Mise en oeuvre des hydrolyses par l'endoprotéinase Glu-C et la chymotrypsine en phases homogène et hétérogène



## 2.1 Introduction

La mise au point de l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine en phase hétérogène a demandé de nombreuses études préliminaires, afin de déterminer les paramètres de réaction et de caractériser le système de catalyse. Dans un premier temps, nous avons mis au point les conditions d'hydrolyse de l'hémoglobine par les deux protéases en phase homogène. Ensuite, nous avons défini les conditions de fixation de l'hémoglobine sur le support ainsi que les conditions d'hydrolyse par les deux protéases en phase hétérogène. Le dernier point concernant l'hydrolyse en phase hétérogène, a consisté à mettre au point la libération de la totalité des peptides de l'hydrolysate, afin de pouvoir comparer la sélectivité de ce système avec la réaction protéolytique en solution et, à définir la fin de la réaction.

## 2.2 Mise au point des conditions d'hydrolyse en phase homogène

### 2.2.1 Hydrolyse de l'hémoglobine native en solution

Le pH optimum de la chymotrypsine est de 7,5. Nous avons décidé de choisir le tampon Tris 50 mM à pH 7,4 généralement utilisé pour cette enzyme. Le pH optimum de l'endoprotéinase Glu-C est de 7,8. Le tampon d'hydrolyse est le tampon phosphate 50 mM. La concentration de l'hémoglobine en solution est de 2% (P/V) et le rapport enzyme/substrat est de 1/50 (mole/mole). L'hydrolyse a été effectuée à 37°C. Après une durée d'hydrolyse de 47 h pour la chymotrypsine et de 72 h pour l'endoprotéinase Glu-C, un aliquot a été prélevé et injecté en CLHP de phase inverse et élué par un gradient d'acétonitrile. Les profils obtenus montrent que l'hydrolyse chymotrypsique n'est pas totale puisque la majorité des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont intactes (figure 34a). L'hydrolyse par l'endoprotéinase Glu-C est pratiquement inexistante, seuls trois pics de très faible amplitude sont présents sur le chromatogramme en dehors du substrat (figure 34b). Ce résultat, est en accord avec ceux obtenus par Iyer et coll. [Iyer et Acharya 87], qui ont démontré qu'aucune des liaisons impliquant un acide glutamique ou aspartique de l'hémoglobine tétramérique sous forme native, n'est accessible à la digestion par la protéase V8 (endoprotéinase Glu-C) en tampon bicarbonate d'ammonium. Afin d'améliorer l'efficacité de l'hydrolyse, le rapport enzyme/substrat a été augmenté jusqu'à 1/10, mais aucune amélioration n'a été visible. Il a donc été décidé de dénaturer l'hémoglobine.

### 2.2.2 Hydrolyse de l'hémoglobine dénaturée par le SDS

De nombreux agents dénaturant ont été testés. Parmi eux, le seul permettant d'obtenir l'hémoglobine dénaturée et l'enzyme active est le SDS à une concentration de 0,1% (P/V) dans la solution d'hydrolyse. La chymotrypsine et l'endoprotéinase Glu-C ont déjà été employées dans de telles conditions pour réaliser des cartes peptidiques par hydrolyses limitées [Cleveland et coll. 77, Houen et Sando 91]. Les conditions d'hydrolyses sont identiques à celles évoquées précédemment exception faite de la présence de SDS dans les solutions. Un prélèvement est effectué après 24 h d'hydrolyse pour la chymotrypsine et 30 h pour l'endoprotéinase Glu-C. Les chromatogrammes obtenus après injection en CLHP sont rassemblés dans la figure 35. Dans ces conditions, les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  ont totalement disparues quelle que soit l'enzyme utilisée. La présence de SDS a donc permis aux protéases d'hydrolyser l'hémoglobine.

### 2.2.3 Stabilité des protéases en présence de SDS

Étant donné que la présence de 0,1% de SDS (P/V) dans une solution permet de dénaturer l'hémoglobine, nous avons cherché à vérifier que la chymotrypsine et l'endoprotéinase Glu-C sont toujours actives dans de telles conditions. L'activité enzymatique de la chymotrypsine sur un substrat synthétique simple en présence de SDS a été suivie en l'absence et également en présence d'hémoglobine. Les courbes

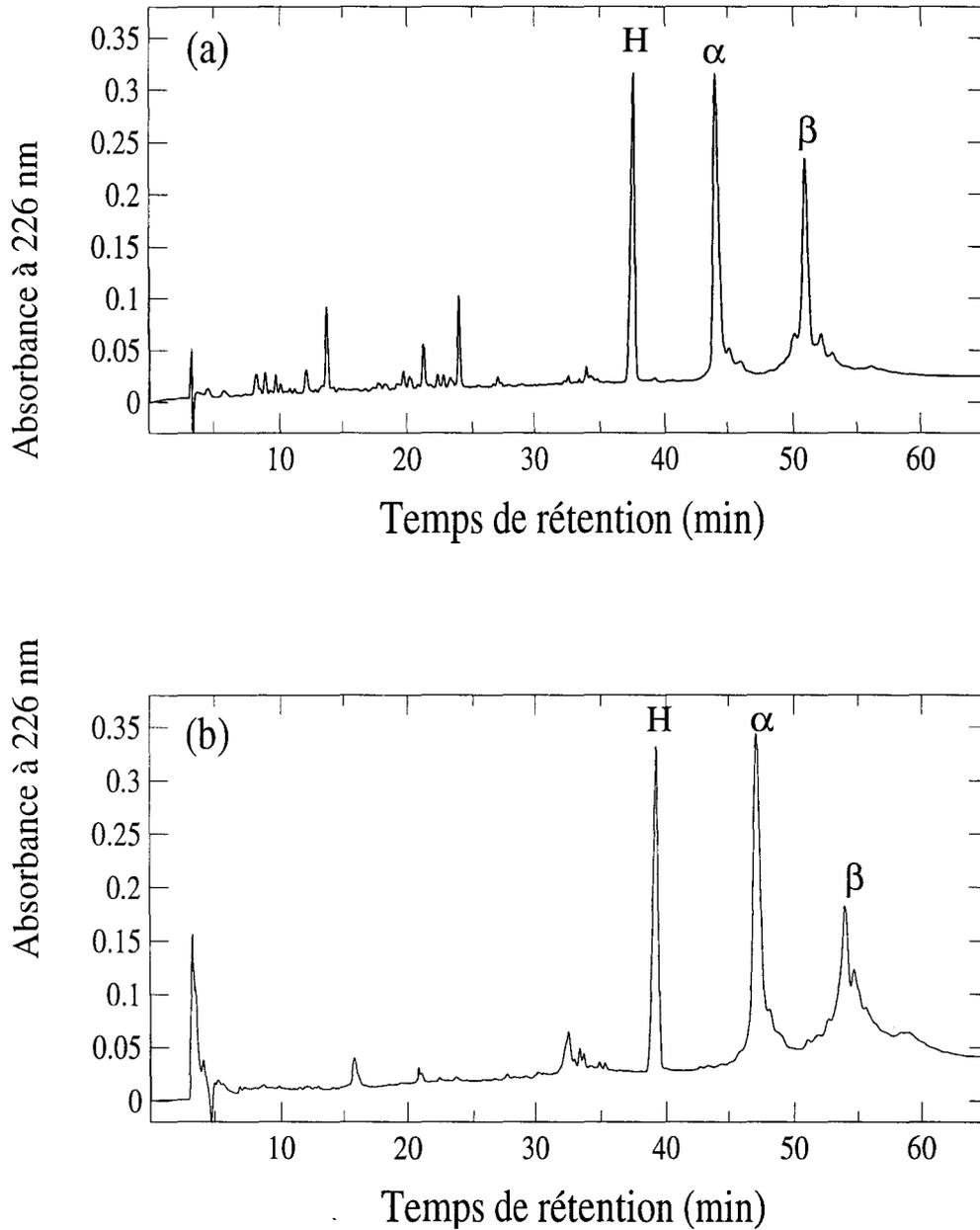


FIGURE 34 – Profils chromatographiques de phase inverse obtenus après hydrolyse de l'hémoglobine bovine native en solution, (a) avec la chymotrypsine en tampon Tris/HCl 50 mM à pH 7,4 après 47h, (b) avec l'endoprotéinase Glu-C en tampon phosphate 50 mM à pH 7,8 après 72h. H indique le pic d'hème,  $\alpha$  et  $\beta$  les pics correspondant respectivement aux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . Les conditions de chromatographie utilisées sont développées dans le paragraphe 1.7.1.

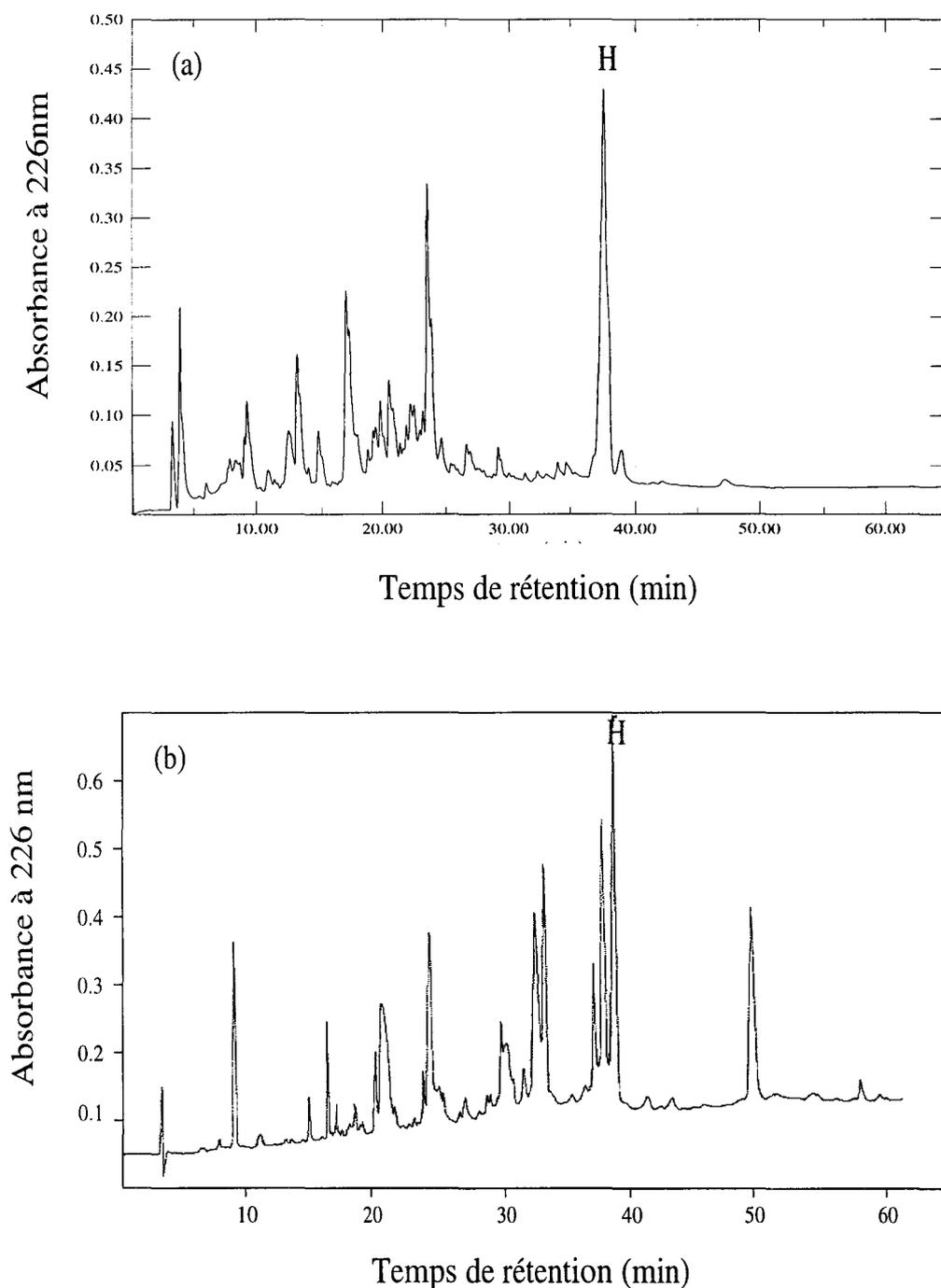


FIGURE 35 – Profils chromatographiques de phase inverse de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine en solution dénaturée par 0,1% de SDS (P/V), (a) par la chymotrypsine en tampon Tris/HCl 50 mM à pH 7,4 après 24h, (b) par l'endoprotéinase Glu-C en tampon phosphate 50 mM à pH 7,8 après 30h. H indique le pic d'hème. les conditions de chromatographie utilisées sont développées dans le paragraphe 1.7.1.

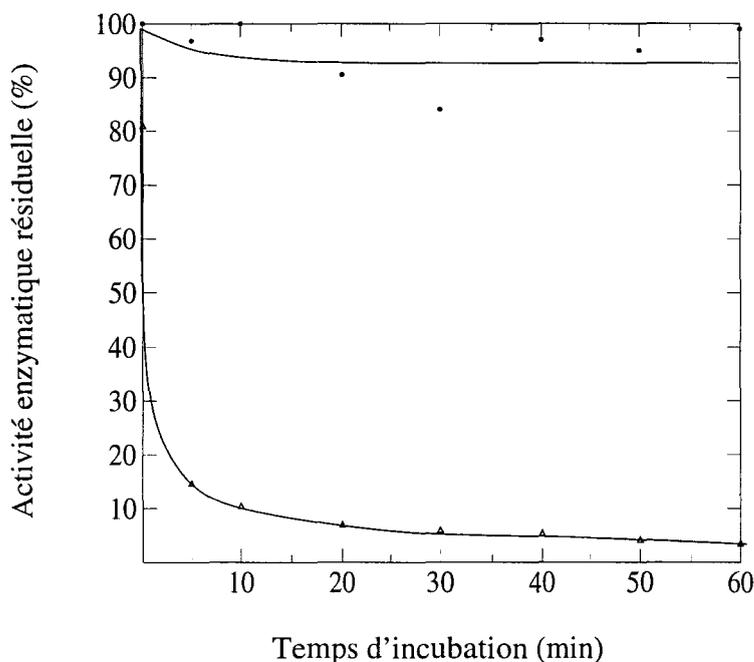


FIGURE 36 – *Activité enzymatique en fonction du temps de la chymotrypsine incubée dans le tampon Tris/HCl 50 mM à pH 7,4 ; (●) en présence de SDS à 0,1% (P/V) et d'hémoglobine à 2% (P/V), (△) en présence de SDS à 0,1% (P/V).*

rassemblées dans la figure 36 montrent que le SDS a une action profondément dénaturante sur la chymotrypsine puisque l'activité enzymatique résiduelle est seulement de 5% en présence de 0,1% de SDS (P/V) après 40 minutes. Par contre, en présence d'hémoglobine, l'activité enzymatique est stable à plus de 90% puisqu'à peine 10% de l'activité est perdue après une heure. Nous pouvons déduire de ces résultats que l'hémoglobine possède vis à vis du SDS un rôle protecteur de la protéase. Lors de l'hydrolyse, ce rôle protecteur semble se poursuivre puisque la cinétique n'est pas perturbée, l'enzyme ne semble pas dénaturée. Nous avons également suivi l'activité enzymatique de l'endoprotéinase Glu-C sur un substrat synthétique en présence de SDS à 0,1%. L'activité enzymatique n'est pas perturbée après 30 minutes d'incubation, nous pouvons donc en déduire que l'endoprotéinase Glu-C n'est pas dénaturée par la présence de 0,1% de SDS.

## 2.3 Mise au point des conditions d'hydrolyse en phase hétérogène

### 2.3.1 Conditions d'adsorption de l'hémoglobine sur le support

Afin de réaliser l'hydrolyse en phase hétérogène, nous avons déterminé les conditions d'adsorption de l'hémoglobine sur le support. L'hémoglobine est une protéine

dont le  $pH_i$  est de 7,1. Dans une solution à pH 7,4 ou à 7,8 (pH d'hydrolyses communs pour les digestions par la chymotrypsine et l'endoprotéinase Glu-C respectivement), elle ne s'adsorbe pas sur le support chargé négativement, sans doute à cause des répulsions de charges. Nous avons alors décidé de placer l'hémoglobine dans une solution de pH inférieur à son  $pH_i$ , ce qui lui permet d'être chargée positivement. A un pH de 6, l'hémoglobine s'adsorbe et la présence de SDS dans la solution ne modifie pas l'adsorption. Après cette étape d'adsorption, le pH a été remonté jusqu'à 7,4 ou 7,8 en vue de l'hydrolyse, ce qui a entraîné une libération massive de l'hémoglobine adsorbée. Il est donc apparu que l'hydrolyse de l'hémoglobine adsorbée sur le support ne pouvait pas se faire dans un tampon de pH supérieur à son  $pH_i$ .

Nous avons alors envisagé l'hydrolyse au pH d'adsorption qui reste proche du pH optimum des enzymes employées dans ce travail. Un dosage de l'activité enzymatique sur un substrat synthétique a permis de déterminer qu'à pH 6, l'activité de la chymotrypsine est égale à 90% de l'activité à son pH optimum. En ce qui concerne l'endoprotéinase Glu-C, son activité enzymatique à pH 6 est égale à 50% de son activité à pH 7,8. Les deux enzymes restant actives dans un tampon de pH 6, les hydrolyses ont été réalisées à ce pH que ce soit en phase homogène ou en phase hétérogène.

### 2.3.2 Caractérisation du système d'hydrolyse en phase hétérogène

L'hydrolyse en phase hétérogène est basée sur un système complexe comprenant l'hémoglobine, le SDS, la protéase considérée et le support. Afin de caractériser le système que nous employons, nous avons étudié les interactions qu'entretiennent chacun des composants du système.

#### 2.3.2.1 Interaction du support avec le SDS.

Nous avons vu précédemment dans le paragraphe 2.2.3 que le SDS interagit avec l'hémoglobine en solution, ce qui permet à l'enzyme de rester active. En phase hétérogène, le support est un composant supplémentaire du système, et nous avons voulu savoir si des interactions existaient avec le SDS. Un dosage a permis de déterminer qu'après incubation avec la résine en absence d'hémoglobine, il reste seulement 30% de SDS en solution par rapport à la concentration initiale introduite. Le SDS est une molécule fortement hydrophobe et chargée négativement à l'une de ses extrémités. Lorsqu'il est mis en contact avec le support lui-même chargé négativement, sa nature hydrophobe semble donc l'emporter sur les répulsions de charges. Si le SDS est incubé avec une résine contenant de l'hémoglobine adsorbée (conditions d'hydrolyses), le phénomène est encore plus marqué puisqu'il ne reste que 7% du SDS initialement introduit en solution. Ces résultats indiquent que la résine, tout comme l'hémoglobine fixe le SDS qui se trouve en solution. Dans les conditions d'hydrolyse en phase hétérogène, l'enzyme reste donc active alors que pratiquement tout le SDS est adsorbé sur la résine et sur l'hémoglobine.

### 2.3.2.2 Interaction du support avec l'hémoglobine

Les conditions d'adsorption de l'hémoglobine ont été définies dans le paragraphe 2.3.1. Cependant, l'action du support sur l'hémoglobine reste inconnu. La résine utilisée est fortement hydrophobe tout comme les supports de chromatographie de phase inverse, qui dénaturent généralement les protéines. Afin de déterminer l'effet du support sur l'hémoglobine, l'hydrolyse de l'hémoglobine après adsorption sur la résine sous forme native ou dénaturée par le SDS a été effectuée. Les chromatogrammes de phase inverse obtenus sont présentés dans la figure 37 pour l'hydrolyse par la chymotrypsine et dans la figure 38 pour l'hydrolyse par l'endoprotéinase Glu-C. L'hémoglobine adsorbée sous forme native sur le support a été hydrolysée totalement, alors que l'hydrolyse n'est que partielle ou presque inexistante avec l'hémoglobine native en solution (figure 34). Nous pouvons en déduire que la résine par son action semble permettre à l'enzyme d'accéder à certains sites de coupure protégés dans l'hémoglobine native en solution, par la forme globulaire repliée de la protéine. La résine en phase hétérogène, tout comme le SDS en solution permet d'hydrolyser l'hémoglobine totalement (toutes les chaînes). Par la suite, il serait donc possible de s'affranchir du SDS pour l'hydrolyse de l'hémoglobine en phase hétérogène. Il a néanmoins été conservé pour les études qui ont suivies afin que les variations éventuelles de sélectivité mises en évidence ne soient strictement dues qu'à l'effet de l'adsorption de l'hémoglobine sur le support.

### 2.3.2.3 Interaction du support avec les protéases

Afin de montrer que l'hydrolyse de l'hémoglobine a lieu en phase hétérogène solide/liquide, nous avons vérifié que la chymotrypsine et l'endoprotéinase Glu-C ne sont pas adsorbées sur le support et restent en solution. La chymotrypsine est une protéine dont le  $pH_i$  est de 8,6. A pH 6 elle est chargée positivement et son adsorption sur le support devrait être favorisée. Cependant, dans nos conditions d'hydrolyse, le support est partiellement encombré par l'hémoglobine. Le suivi de l'activité enzymatique du surnageant en fonction du temps d'incubation de la chymotrypsine avec le support ayant déjà fixé l'hémoglobine (figure 39) a permis de conclure qu'en présence d'hémoglobine, la chymotrypsine s'adsorbe peu (environ 20%). En présence de SDS, l'activité de la chymotrypsine est plus faible (figure 39). Cette baisse n'est pas due à une adsorption plus élevée de la chymotrypsine, mais à une dénaturation d'une partie de l'enzyme par le SDS non fixé sur l'hémoglobine ou le support donc resté en solution (0,007%).

Le  $pH_i$  de l'endoprotéinase Glu-C n'est pas disponible dans la littérature, nous ne pouvons donc pas prévoir son comportement en présence de la résine. Le suivi de l'activité enzymatique du surnageant en fonction du temps d'incubation de l'endoprotéinase Glu-C sur la résine vierge a permis de conclure que l'endoprotéinase Glu-C s'adsorbe. Par contre, en présence de résine ayant déjà fixé l'hémoglobine, l'endoprotéinase Glu-C s'adsorbe peu (environ 30 % en 17 h)(figure 42).

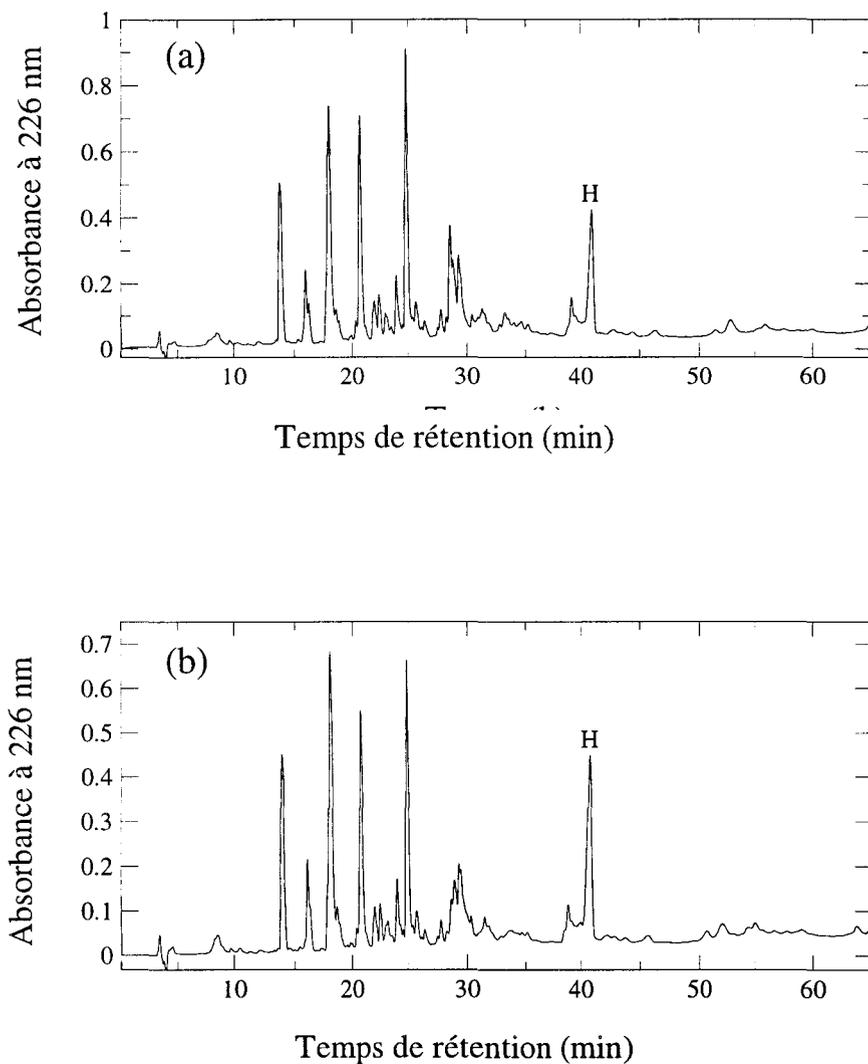


FIGURE 37 – Profils chromatographiques de phase inverse de l'hydrolysate chymotrypsique en tampon Tris/HCl 50 mM à pH 6 obtenu à partir de l'hémoglobine bovine adsorbée sur la résine après 72 h d'hydrolyse, (a) native et (b) dénaturée par 0,1% de SDS (P/V). Les conditions de chromatographie utilisées sont décrites dans le paragraphe 1.7.1.

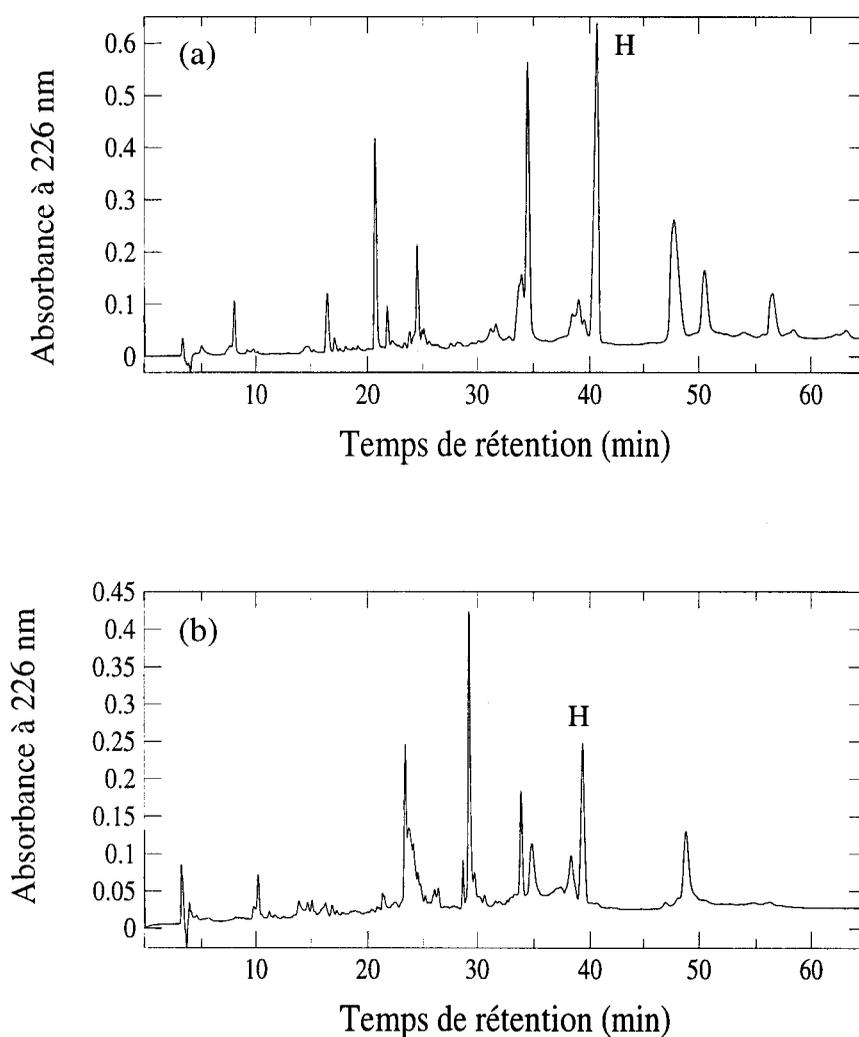


FIGURE 38 – Profils chromatographiques de phase inverse obtenus avec l'endoprotéinase Glu-C en tampon phosphate 50 mM à pH 6 sur (a) l'hémoglobine bovine native adsorbée sur la résine et (b) l'hémoglobine bovine dénaturée par 0,1% de SDS (P/V) et adsorbée sur la résine. Les temps d'hydrolyse sont de 72 heures. Les conditions de chromatographie utilisées sont décrites dans le paragraphe 1.7.1.

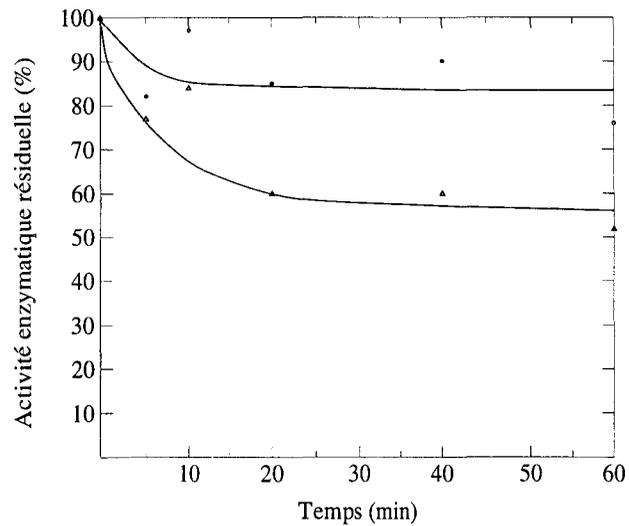


FIGURE 39 – *Activité enzymatique de la chymotrypsine dans le surnageant au contact de la résine contenant de l'hémoglobine adsorbée. (Δ) en présence de SDS 0,1% (P/V), (●) en absence de SDS.*

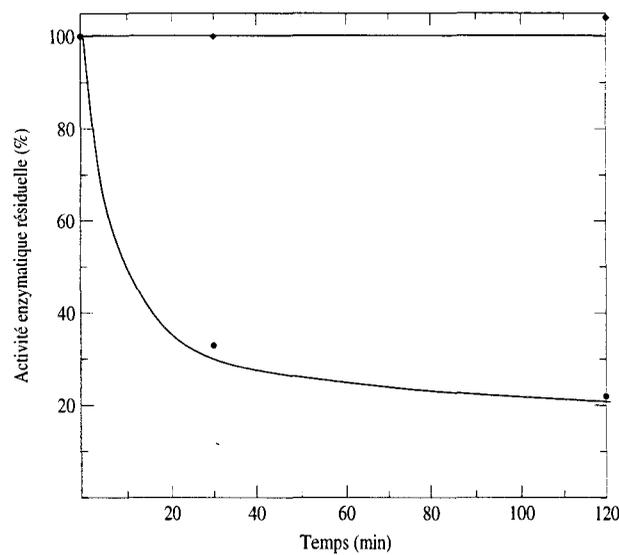


FIGURE 40 – *Activité enzymatique de l'endoprotéinase Glu-C dans le surnageant au contact de la résine vierge (●) et contenant de l'hémoglobine adsorbée en présence de SDS 0,1% (◆).*

### 2.3.3 Arrêt de la réaction et élution des peptides obtenus en catalyse hétérogène

Le principe de l'hydrolyse en phase hétérogène est de protéger certains sites de coupure par adsorption du substrat sur un support. Une partie des peptides produits vont rester adsorbés sur le support et il sera nécessaire de les éluer. Dès lors, ces peptides seront accessibles à l'hydrolyse. Il est donc nécessaire de procéder auparavant à l'arrêt de la réaction enzymatique. La chymotrypsine et l'endoprotéinase Glu-C sont deux enzymes à serine. Le PMSF a été choisi pour inhiber la chymotrypsine avant l'élution des peptides, alors que l'endoprotéinase Glu-C est dénaturée par l'introduction d'acétonitrile (50% final).

Lors de l'adsorption, deux types d'interactions interviennent principalement, les interactions hydrophobes et les interactions électrostatiques. Afin de désorber les peptides, il faut anihiler ces interactions. Un protocole de lavage en plusieurs étapes a été mis au point (voir détail au paragraphe 1.4.2). Dans un premier temps, un tampon borate 50 mM à pH 9,5 additionné de SDS à 0,1% (P/V) est mis au contact de la résine. Puis, un mélange tampon borate 50 mM à pH 9,5/acétonitrile 50/50 (V/V) est appliqué. Un dosage de l'azote a confirmé un taux de récupération de 90%. Ainsi, les différences de compositions peptidiques observées entre les hydrolyses en phases homogène et hétérogène seront imputables uniquement aux conditions d'hydrolyse puisque la totalité de l'hydrolysate en phase hétérogène est recouvré.

## 2.4 Critères de la fin de la réaction protéasique

Dans l'absolu, la fin d'une réaction enzymatique est obtenue lorsque toutes les liaisons peptidiques qui relèvent de la spécificité de l'enzyme sont hydrolysées. En réalité, il faut tenir compte du fait que l'hémoglobine est un substrat complexe. De nombreuses coupures peuvent être effectuées avec des vitesses très variables. Par exemple, la chymotrypsine coupe principalement les liaisons peptidiques impliquant un acide aminé aromatique mais également avec une vitesse plus faible les liaisons peptidiques impliquant des acides aminés hydrophobes aliphatiques à longue chaîne tels que la leucine. La même remarque peut-être faite pour l'endoprotéinase Glu-C. Les liaisons peptidiques impliquant un acide glutamique suivi d'une proline sont difficilement hydrolysées [Breddam et Meldal 92]. A ce phénomène naturel est ajouté une contrainte par l'adsorption de l'hémoglobine sur un support, ce qui augmente sans doute les écarts de vitesses. Il est donc délicat d'affirmer qu'une réaction d'hydrolyse est terminée. Des critères permettant de conclure que la réaction semble être à son terme peuvent cependant être retenus. Il a été décidé que la population peptidique ne devait plus évoluer aussi bien dans le nombre de pics présents sur un chromatogramme que dans leurs intensités respectives. Ce choix doit être nuancé puisque chaque pic correspond à plusieurs peptides. Un pic constant en aire ne signifie pas que les peptides correspondants sont présents en quantités stables. Cependant, en prenant en compte deux temps d'hydrolyse éloignés tels que l'aire des pics sur le chromatogramme n'évoluent plus, nous espérons nous approcher de la fin de la réaction.

## Conclusion

Nous avons pu montré dans ce chapitre que l'hydrolyse de l'hémoglobine native en solution n'est pas réalisable dans les conditions de pH utilisées que ce soit avec la chymotrypsine ou avec l'endoprotéinase Glu-C. L'ajout de SDS comme dénaturant a cependant permis d'obtenir des hydrolysats en phase homogène, et nous avons pu remarquer à cette occasion le rôle protecteur de l'hémoglobine qui fixe le SDS et permet à l'enzyme de rester active.

L'hydrolyse en phase hétérogène est plus complexe. Aux pH d'hydrolyse optima théoriques (7,4 et 7,8), l'hémoglobine n'a pu être adsorbée sur le support, et il a été nécessaire de descendre jusqu'à pH 6. C'est à ce pH que les hydrolyses ont été menées afin de ne pas libérer d'hémoglobine au cours de la réaction. L'étude des relations entre les différents composants du système en phase hétérogène a permis de montrer que le SDS s'adsorbe sur le support bien que tous deux soient chargés négativement. En présence d'hémoglobine adsorbée sur le support, soit dans les conditions d'hydrolyse, il ne reste dans le surnageant que 7% du SDS introduit. Ceci est le résultat conjugué de l'adsorption du SDS sur le support et/ou sur l'hémoglobine permettant à l'enzyme de rester active dans le système. Nous avons également pu déterminer que, même si la chymotrypsine peut s'adsorber sur la résine, seule une petite quantité (20%) s'adsorbe réellement lorsque l'hémoglobine est déjà fixée. Enfin, l'hémoglobine semble être dénaturée par son adsorption sur le support puisque l'hydrolyse de la protéine en absence de SDS est totale contrairement à l'hydrolyse de la protéine native en solution. L'élution de la totalité des hydrolysats en phase hétérogène est réalisé après l'inactivation de l'enzyme, pour protéger les peptides, par un protocole de désorption qui permet d'obtenir un rendement d'élution des peptides de 90%.

## Chapitre 3

# Étude de la sélectivité de l'hydrolyse de l'hémoglobine par l'endoprotéinase Glu-C en phase hétérogène



## Introduction

Nous avons étudié dans le premier chapitre de cette partie, les conditions permettant de réaliser l'hydrolyse de l'hémoglobine en phase hétérogène. Dans le chapitre qui suit, nous avons étudié l'hydrolyse de l'hémoglobine par une enzyme très spécifique, l'endoprotéinase Glu-C. Elle a été choisie pour sa grande spécificité qui permet d'obtenir un hydrolysats relativement simple, mais également parce qu'elle n'hydrolyse pas au niveau des acides aminés hydrophobes, ni au niveau des acides aminés basiques. De cette façon, nous préservons en solution les segments hydrophobes et positifs, et nous espérons voir un effet supplémentaire avec l'adsorption de l'hémoglobine sur le support, par protection de certains sites. L'analyse des résultats est basée sur une identification systématique des peptides présents dans les deux hydrolysats finaux issus de l'hydrolyse en phase homogène et hétérogène.

Dans un premier temps, nous avons identifié le temps de fin de réaction de chacun des systèmes. Puis, afin de définir si l'adsorption de l'hémoglobine sur le support entraîne des modifications dans l'hydrolyse, nous avons comparé les peptides obtenus en phase homogène et hétérogène, ainsi que le type de coupure observé. Enfin, nous avons tenté à partir de ces résultats de déduire comment fonctionne le phénomène de protection engendré par le support et quel est son impact sur la sélectivité de la réaction d'hydrolyse de l'hémoglobine.

### 3.1 Analyse des chromatogrammes obtenus en fin de réaction en phase homogène et hétérogène

#### 3.1.1 Obtention d'un hydrolysats peptidique final

L'analyse d'une population peptidique finale est importante pour rechercher une éventuelle modification de la sélectivité par adsorption de l'hémoglobine sur le support. Nous avons donc décidé de considérer la réaction protéolytique comme terminée lorsque deux chromatogrammes obtenus à des temps d'hydrolyse relativement éloignés sont similaires. Dans la figure 41 sont rassemblés les hydrolysats obtenus à partir de l'hémoglobine dénaturée par 0,1% de SDS en solution au bout de 17 h (figure 41a) et de 30 h d'hydrolyse (figure 41b). Les profils sont similaires malgré un temps d'hydrolyse pratiquement double entre les deux chromatogrammes. Nous avons alors considéré qu'après 30 h, la population peptidique de l'hydrolysats n'évoluait plus et que nous sommes en présence des peptides finaux. L'analyse des peptides présents dans l'hydrolysats en phase homogène a donc été réalisée après 30 heures d'hydrolyse.

Tout comme dans le cas de l'hydrolyse en phase homogène, l'hydrolyse en phase hétérogène a été suivie au cours du temps afin de mettre en évidence un hydrolysats final. Dans la figure 42 sont rassemblés les chromatogrammes obtenus par l'action de l'endoprotéinase Glu-C sur l'hémoglobine bovine dénaturée par 0,1% de SDS et adsorbée sur le support après 48 h (figure 42a) et 72 h (figure 42b) d'hydrolyse. Les profils obtenus sont très similaires, alors que 24 h séparent ces deux hydrolysats. Nous avons donc considéré que l'hydrolyse était terminée ou qu'elle procédait si lentement qu'elle n'était plus décelable. L'analyse de la population peptidique en phase hétérogène a été réalisée sur l'hydrolysats obtenu à 72 h.

#### 3.1.2 Modification de la résolution des chromatogrammes en présence de SDS

Les pics présents sur les chromatogrammes ont dans la majorité des cas une résolution médiocre (figures 41 et 42). La chromatographie d'un hydrolysats chymotrypsique après élimination du SDS par l'acétone a cependant permis d'obtenir des pics parfaitement résolus (figure 43 a). L'ajout volontaire de SDS en quantité variable sur cet hydrolysats a confirmé qu'il était responsable de la perte de résolution. Cet ajout de SDS à une concentration de 0,1% (P/V) provoque un élargissement des pics (figure 43 b), et pour des quantités plus élevées de 1% (P/V), le chromatogramme est modifié dans sa totalité (figure 43 c). Les pics sont déplacés vers les longs temps de rétention, ce qui semble montrer que des associations peptides-SDS menant à des entités plus hydrophobes interagissent avec la phase inverse. Kawasaki et coll. [Kawasaki et Suzuki 90] ont noté le même phénomène, lors de la séparation d'un hydrolysats en présence de SDS par CLHP. Selon eux, le SDS interagit avec la colonne, puis agit comme échangeur d'ions en retardant les peptides chargés positivement. Cette perte de résolution est regrettable pour les analyses suivantes (identification des peptides), mais la nécessité d'utiliser le SDS dans l'hydrolyse de l'hémoglobine en solution ne permet pas d'envisager l'obtention d'un chromatogramme de meilleure qualité.

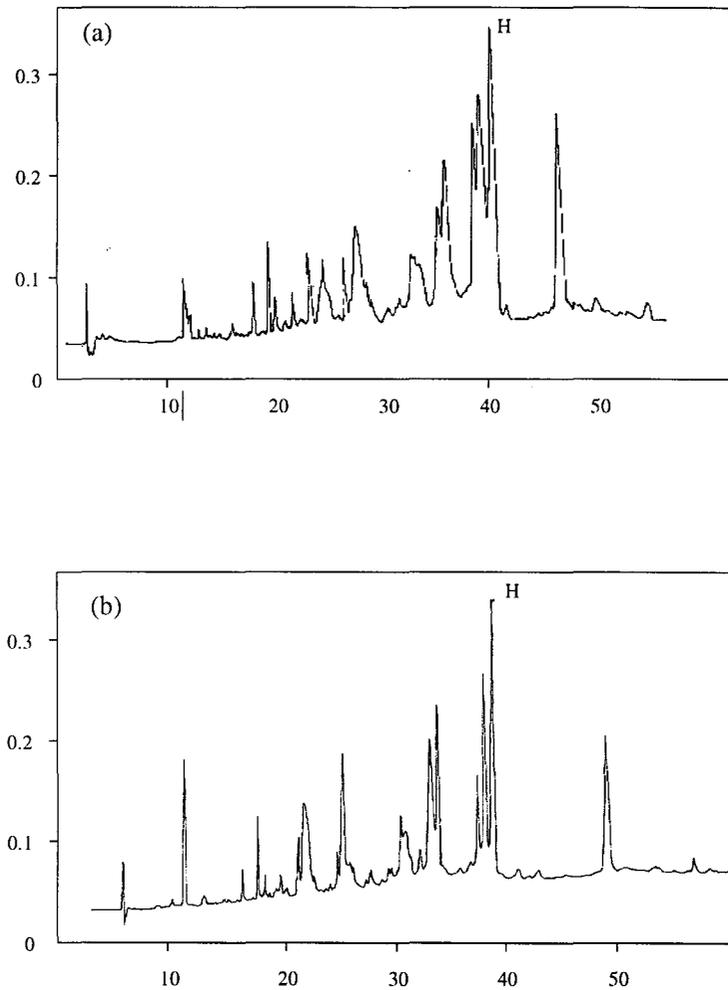


FIGURE 41 – Profils chromatographiques de phase inverse de l'hydrolysate obtenu par action de l'endoprotéinase Glu-C en tampon phosphate 50 mM pH 6 sur l'hémoglobine à 2% (P/V) dénaturée par 0,1% de SDS (P/V) en solution, (a) après 17 heures, (b) après 30 heures d'hydrolyses. Les conditions de chromatographie sont décrites dans le paragraphe 1.7.1.

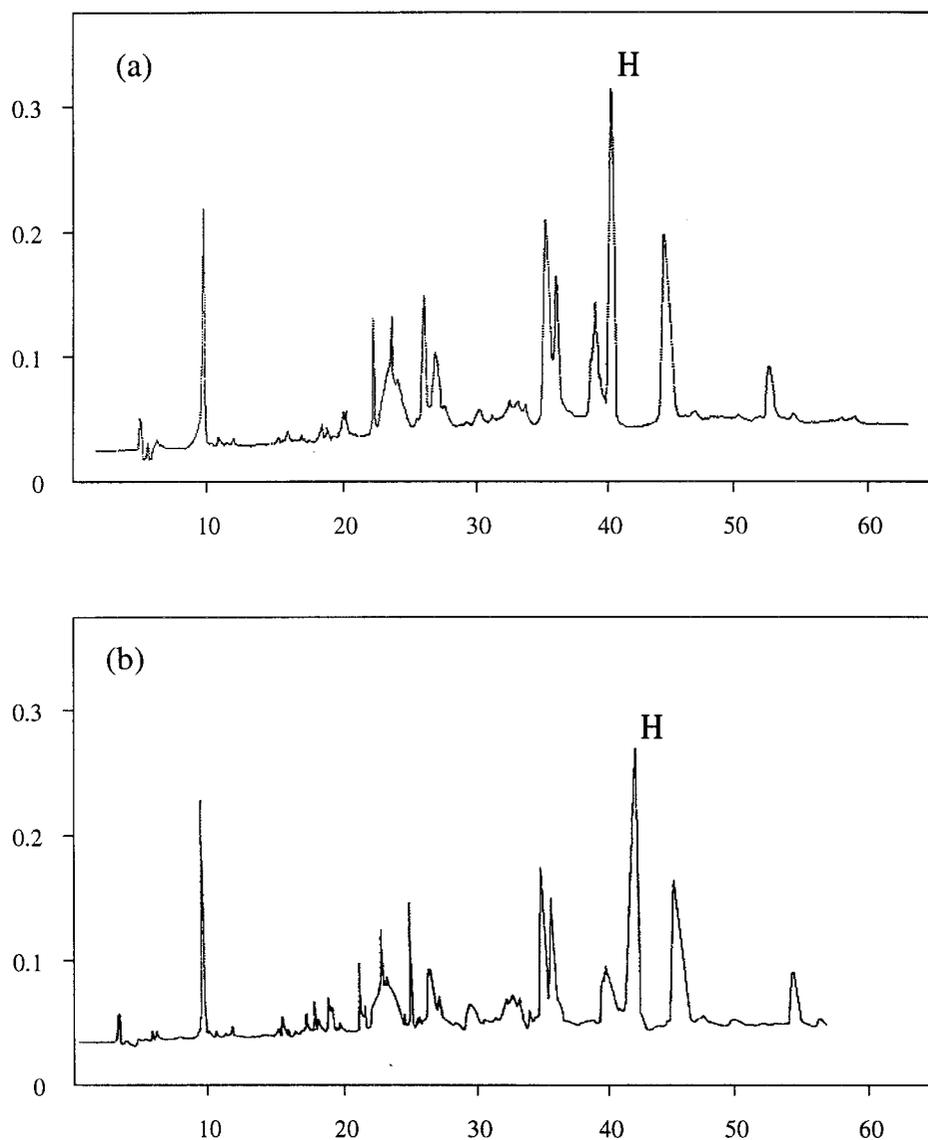


FIGURE 42 – Profils chromatographiques de phase inverse obtenu par l'action de l'endoprotéinase Glu-C sur l'hémoglobine bovine dénaturée par 0,1% de SDS (P/V) et adsorbée sur le support. (a) : à un temps de 48 heures, (b) : à un temps de 72 heures. Les conditions de chromatographie sont décrites dans le paragraphe 1.7.1.

### 3.1. ANALYSE DES CHROMATOGRAMMES OBTENUS...

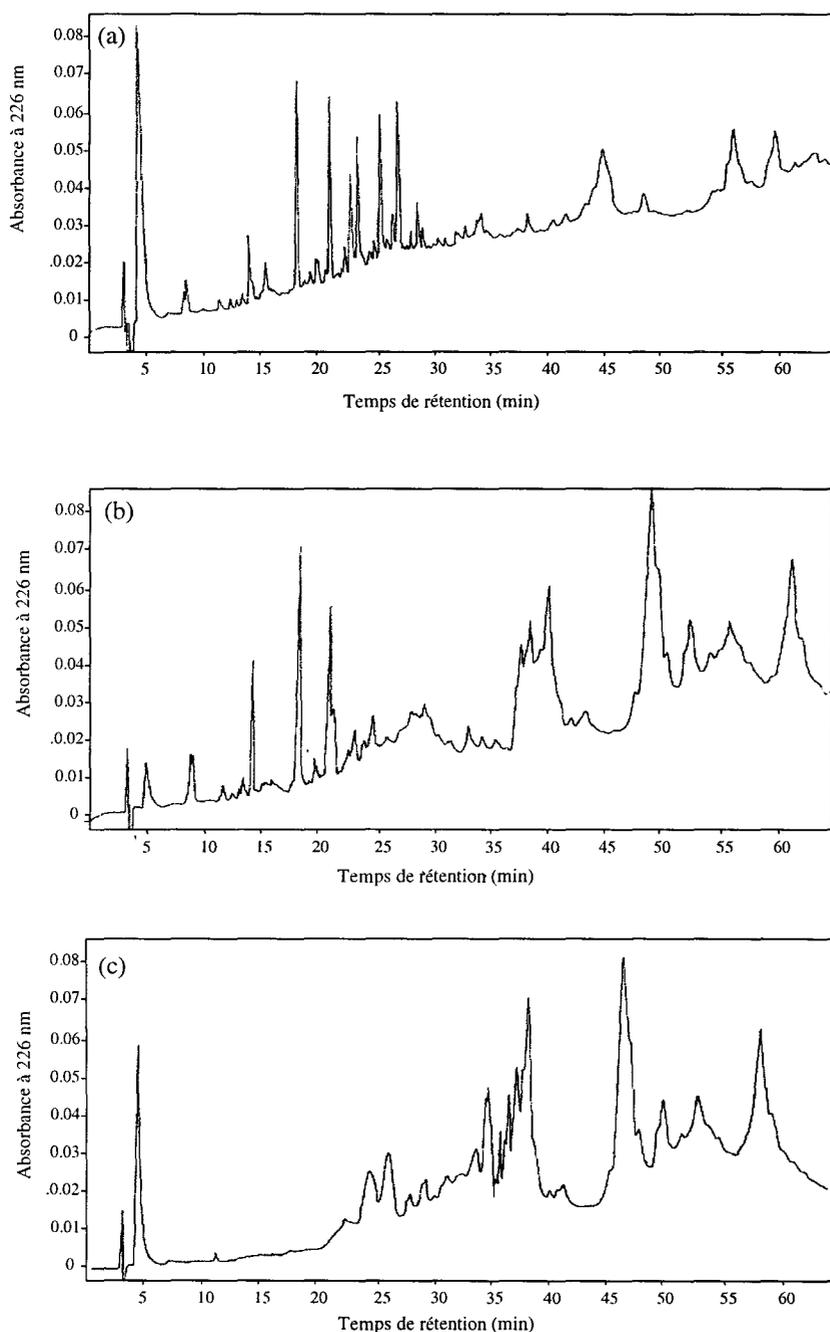


FIGURE 43 – Profils chromatographiques de phase inverse, d'un hydrolysate obtenu par action de la chymotrypsine bovine sur l'hémoglobine à 2% en tampon Tris 50 mM à pH 6 contenant 0,1% de SDS (P/V). (a) hydrolysate dont le SDS a été éliminé par l'acétone, (b) hydrolysate après ajout de 0,1 % de SDS (P/V), (c) hydrolysate après ajout de 1 % de SDS (P/V). Les conditions de chromatographie sont décrites au 1.7.1.

## comparaison des hydrolysats obtenus en phase homogène et en phase hétérogène

Afin de déterminer si l'hydrolyse de l'hémoglobine en phase hétérogène permet de modifier la sélectivité de la réaction protéolytique, nous avons comparé les résultats obtenus en phase homogène et en phase hétérogène. Dans un premier temps, nous avons comparé les chromatogrammes obtenus en fin de réaction, puis nous avons analysé les peptides identifiés dans chacun des deux systèmes. Ensuite, nous avons comparé le type de coupure effectuée par l'enzyme sur les différentes liaisons potentiellement hydrolysables de l'hémoglobine, et enfin, nous avons étudié chacune de ces liaisons afin d'essayer d'interpréter le type de coupure en phase homogène mais surtout en phase hétérogène.

### 3.2.1 Comparaison des chromatogrammes obtenus en fin d'hydrolyse en phases homogène et hétérogène

L'analyse des chromatogrammes obtenus après 30 h d'hydrolyse en phase homogène (figure 44a), et après 72 h d'hydrolyse en phase hétérogène (figure 44b) montre que les hydrolysats ne contiennent que peu de petits peptides ou de peptides hydrophiles. En effet, le premier pic apparaît seulement avec un temps de rétention de 10 min. Par contre, de nombreux peptides sont présents à des temps de rétention élevés avant et après l'hème (41 minutes), indiquant la présence de gros peptides ou de peptides hydrophobes. Ce résultat s'explique puisque l'endoprotéinase Glu-C est très spécifique et coupe uniquement au niveau des groupes carboxyles des acides glutamiques et aspartiques; or, ces deux acides aminés sont assez peu représentés dans les protéines. Ils apparaissent environ tous les vingt résidus. Dans le cas de l'hémoglobine, l'hydrolyse de tous les acides glutamiques et aspartiques devrait mener à des peptides formés en moyenne de 8 à 9 acides aminés.

### 3.2.2 Analyse des peptides présents en phase homogène et en phase hétérogène

Nous avons entrepris l'analyse des peptides obtenus après 30 heures d'hydrolyse en phase homogène et 72 h en phase hétérogène. Chaque fraction observée sur le chromatogramme de CLHP de phase inverse de type C<sub>4</sub> a été récoltée et analysée par spectrométrie de masse. Les fractions contenant plusieurs peptides ont été réinjectées en CLHP de phase inverse en mode isocratique afin de séparer les différents peptides. Lors de cette étape, la composition et la proportion de chaque peptide en acide aminé aromatique ont pu être déterminées grâce au détecteur spectral à barette de diode et au logiciel Millenium (WATERS). Chaque peptide récolté (peptides majoritaires) a ensuite été analysé par hydrolyse acide afin de connaître sa composition en acides aminés. Les divers renseignements accumulés (composition en acides aminés et masse) ont permis de les identifier. Lors de l'hydrolyse en phase hétérogène, nous avons pris des précautions afin d'analyser toute la population peptidique. Pour cela,

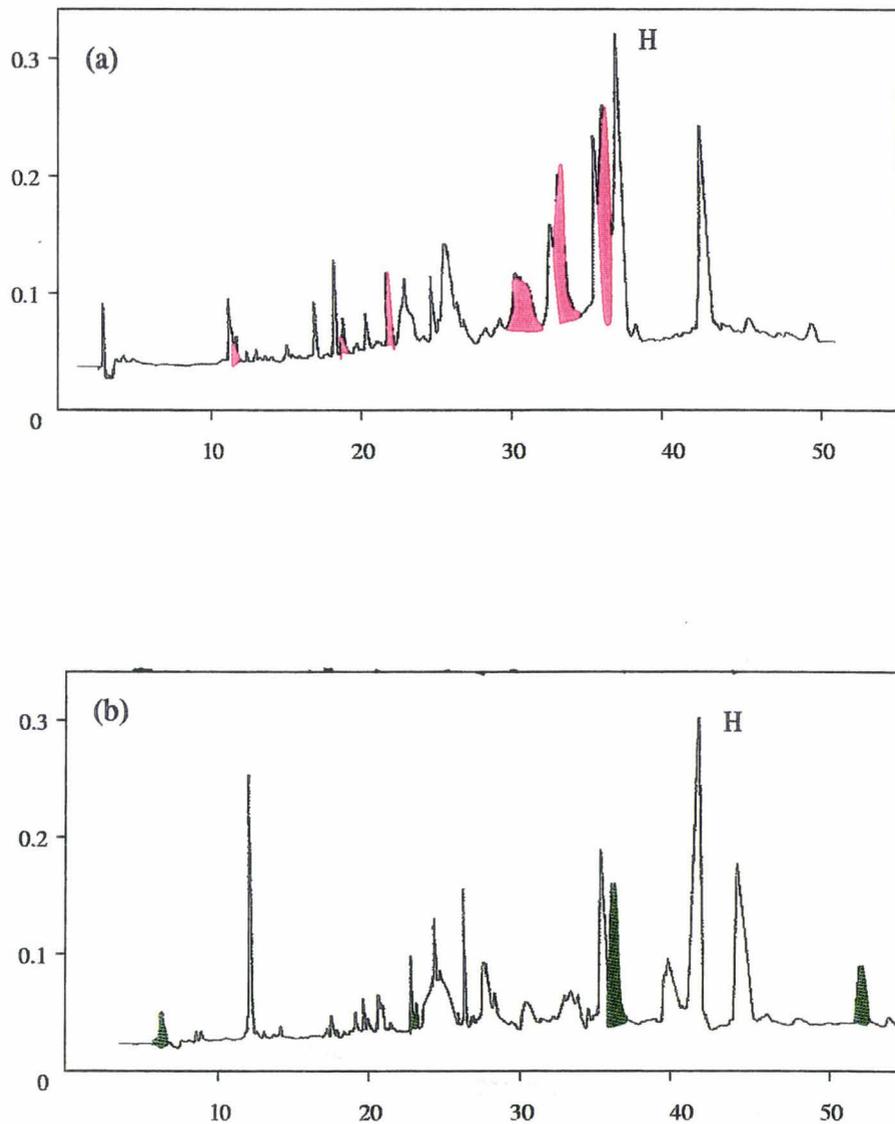


FIGURE 44 *Profils chromatographiques de phase inverse des hydrolysats en phase homogène et en phase hétérogène en fin d'hydrolyse, (a) de l'hémoglobine dénaturée par 0,1% de SDS en solution après 30 h, (b) et de l'hémoglobine dénaturée par 0,1% de SDS adsorbée sur le support après 72 h. Les conditions de chromatographie sont décrites dans le paragraphe 1.7.1.*

nous nous sommes assurés que tous les peptides ont été recouverts et qu'il n'en reste aucun adsorbé sur la résine. Ce point est essentiel pour ne pas confondre un changement de sélectivité de la réaction avec un simple effet de partage de certains peptides de l'hydrolysats. Un dosage de l'azote a permis de déterminer que 90% de l'azote introduit sous forme d'hémoglobine sur la résine est récupéré par la procédure d'extraction des peptides que nous avons mis au point (voir paragraphe 1.4.2).

Les chromatogrammes CLHP de phase inverse des hydrolysats obtenus en phase homogène (figure 44a) et en phase hétérogène (figure 44b) semblent après un examen rapide sensiblement identiques. L'analyse des peptides contenus dans chaque fraction permet d'apporter des renseignements supplémentaires. Nous avons fait apparaître en rouge les pics correspondant à des fractions renfermant des peptides présents uniquement après l'hydrolyse de l'hémoglobine en phase homogène. Les pics colorés en vert correspondent à des fractions renfermant des peptides obtenus uniquement après hydrolyse en phase hétérogène. Cette représentation permet de mieux mettre en évidence les différences entre les deux hydrolysats. Elle permet, de plus, de montrer que l'adsorption de l'hémoglobine sur le support a modifié la population peptidique obtenue après hydrolyse.

Les peptides finaux identifiés dans l'hydrolysats issu de la digestion de l'hémoglobine par l'endoprotéinase Glu-C en phases homogène et hétérogène sont visualisés au niveau de la séquence des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  (figure 45). Le même code de couleur est appliqué que pour les pics des chromatogrammes; les peptides présents dans les deux hydrolysats sont représentés en noirs, les peptides présents uniquement dans l'hydrolysats obtenu en phase homogène sont en rouge, et les peptides présents uniquement dans l'hydrolysats obtenu en phase hétérogène sont en vert. Sur cette figure, nous remarquons que certains peptides sont manquants. Ils permettent de mettre en évidence les limites de la méthode utilisée. En effet, certains peptides, petits en taille ou possédant un coefficient d'extinction molaire faible ont pu passer inaperçu lors des différentes étapes de purification. Il apparaît aussi que l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine n'est pas totale. De nombreux peptides se chevauchent ce qui indique des sites de coupure partiellement hydrolysés. Nous avons pourtant pris certaines précautions permettant de penser que l'hydrolyse était arrivée à son terme. Ceci doit signifier que certaines coupures se font à une vitesse très faible ce qui rend le résultat difficile à apprécier. L'hydrolyse incomplète d'une protéine par l'endoprotéinase Glu-C a déjà été rapportée dans la littérature. En effet, Crimmins et coll. [Crimmins et coll. 89] indiquent que la protéase V8 produit des hydrolysats contenant des fragments chevauchant et que pour cette raison, elle n'est pas appropriée au séquençage peptidique. Houmard et coll. [Houmard et Drapeau 72] ont mis en évidence le même phénomène dans l'hydrolyse de la myoglobine de coeur de cheval dénaturée par l'endoprotéinase Glu-C. L'hydrolyse est, là aussi, incomplète.

Le nombre de peptides identifiés dans chaque hydrolysats apporte peu de renseignements puisque nous dénombrons 27 peptides pour l'hydrolyse en phase homogène, et 30 peptides pour l'hydrolyse en phase hétérogène. Il est clair cependant, d'après la figure 45 visualisant ces peptides au niveau des chaînes de l'hémoglobine, que les deux hydrolysats sont très différents. Une analyse plus fine montre que seuls 16 peptides sont communs aux deux hydrolysats, 11 sont obtenus uniquement en phase homogène, et 14 uniquement en phase hétérogène. L'analyse des peptides présents

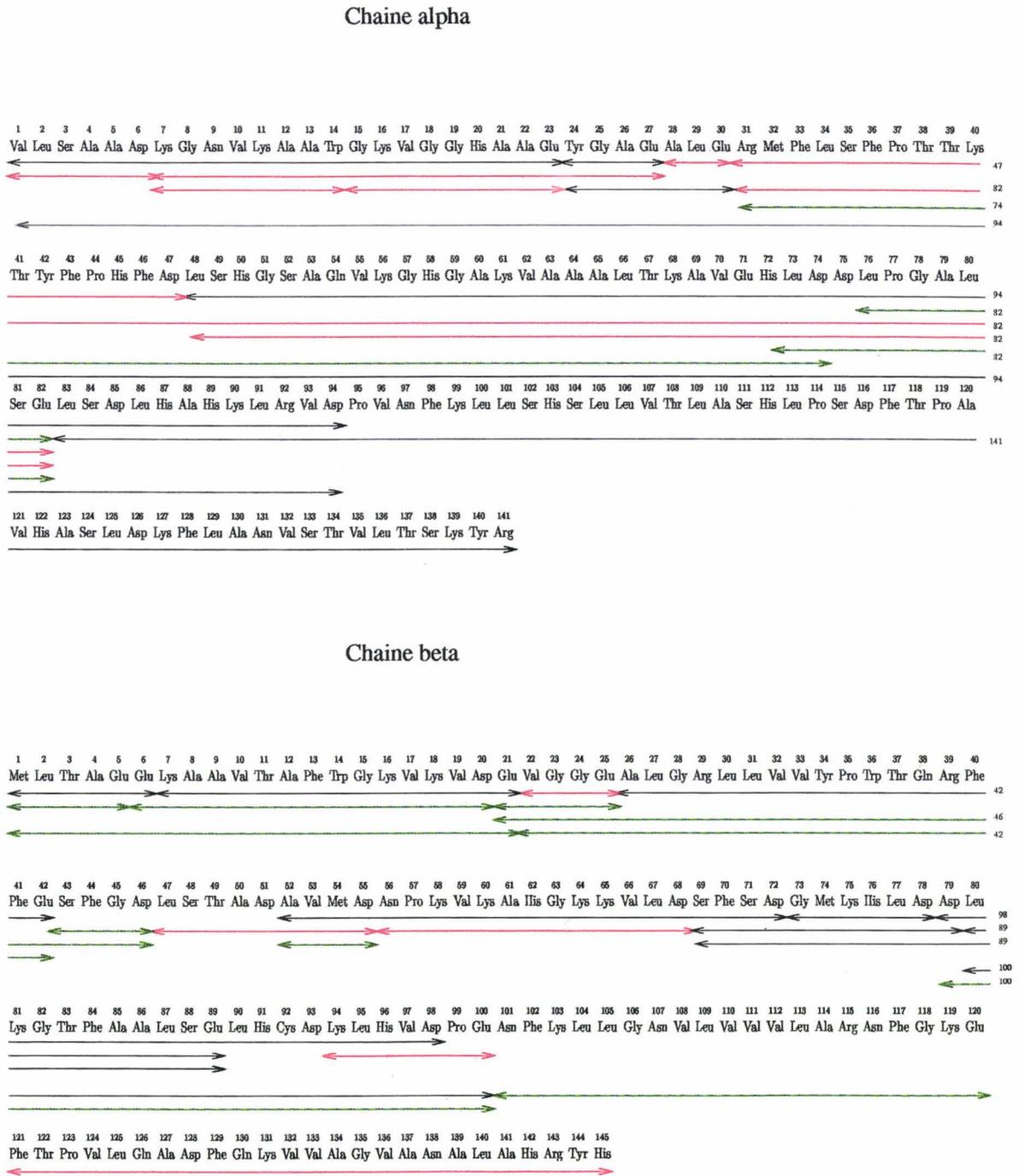


FIGURE 45 – Ensemble des peptides identifiés au niveau des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine bovine, dénaturée par 0,1% de SDS (P/V,) et adsorbée sur le support après 72 heures d'hydrolyse, par l'endoprotéinase Glu-C en tampon phosphate 50 mM pH 6. Les flèches rouge indiquent les peptides obtenus uniquement lors de l'hydrolyse de l'hémoglobine en solution. Les flèches vertes indiquent les peptides obtenus uniquement lors de l'hydrolyse de l'hémoglobine en phase hétérogène, et les flèches noires, les peptides communs aux deux hydrolysats.

dans les hydrolysats a donc permis de mettre en évidence une modification de la sélectivité de l'hydrolyse de l'hémoglobine en phase hétérogène par l'endoprotéinase Glu-C.

### 3.2.3 Comparaison du type de coupure effectué par l'enzyme en phase homogène et en phase hétérogène

Les liaisons peptidiques de l'hémoglobine impliquant un acide glutamique ou aspartique sont représentées dans le tableau 6. Nous avons résumé, dans ce tableau, les liaisons hydrolysées par l'endoprotéinase Glu-C dans nos conditions en phase homogène et hétérogène, et précisé si ces coupures étaient totales, partielles ou nulles (non hydrolysées).

Type de liaison	Nombre dans l'hémoglobine	Type de coupure	Type de liaison	Nombre dans l'hémoglobine	Type de coupure
			Asp-Gly	1	P(P)
Glu-Ala	2	P, P (T, P)	Asp-Ala	1	T (P)
Glu-Leu	2	P, P (P, P)	Asp-Leu	5	T, P, P, P, NH (T, P, P, NH, NH)
Glu-Val	1	P (T)			
Glu-Phe	1	T (T)	Asp-Phe	2	NH, NH (NH, NH)
Glu-Tyr	1	P (P)			
Glu-Glu	1	P (NH)	Asp-Glu	1	P (NH)
			Asp-Asp	2	P, P (P, NH)
Glu-Lys	1	P (T)	Asp-Lys	3	NH, NH, NH (P, NH, P)
Glu-Asn	1	T (T)	Asp-Asn	1	P (P)
Glu-Arg	1	P (P)			
Glu-Ser	1	P (T)	Asp-Ser	1	P (P)
Glu-His	1	P (NH)			
			Asp-Pro	2	P, P (P, P)

TABLEAU 6 – Liaisons peptidiques avec un acide glutamique ou aspartique rencontrées dans l'hémoglobine bovine, et type de coupure effectué par l'endoprotéinase Glu-C sur l'hémoglobine en phase hétérogène. Entre parenthèses sont indiqués les liaisons hydrolysées en phase homogène: T (coupure totale), P (coupure partielle), NH (liaison non hydrolysée).

Globalement, nous pouvons remarquer que seules 3 liaisons sur 31 sont hydrolysées totalement en phase hétérogène, soit 9,6% contre 32% en phase homogène. De même, 16 liaisons sont hydrolysées partiellement en phase homogène, contre 22 en phase hétérogène. Par contre, une meilleure hydrolyse de certaines liaisons est notée en phase hétérogène par rapport à la phase homogène. Ainsi, 9 liaisons

sont non hydrolysées en phase homogène, alors qu'elles ne sont plus que 6 en phase hétérogène. Ces modifications indiquent que l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine est moins poussée lorsqu'elle est adsorbée sur un support, même si quelques liaisons sont mieux hydrolysées. Il faut préciser que le classement choisi pour les coupures enzymatiques est uniquement qualitatif (totale, partielle, non hydrolysée). Lorsqu'une coupure est dite totale, cela signifie que pour toutes les chaînes d'hémoglobine présentes dans le système, le site est hydrolysé. Ainsi, sur la figure 45 une coupure totale peut être détectée par l'absence de peptides chevauchant dans le système considéré (aucun peptide ne comprend la séquence clivée totalement). Une coupure partielle signifie quant à elle que pour un site de clivage considéré, seule une certaine proportion des chaînes d'hémoglobine présentes dans le système sont hydrolysées. Sur la figure 45 cette classe de coupure présente des peptides chevauchant (un ou plusieurs peptides comprennent le site de clivage). Enfin, un site non hydrolysé est défini quand aucune chaîne d'hémoglobine présente dans le système n'a été hydrolysée. Sur la figure 45 aucun peptide ne commence ou ne se termine par le site non hydrolysable. Les différences entre les deux systèmes ne seront visibles que si la liaison change de catégorie. Il sera par exemple impossible de remarquer un changement entre deux coupures partielles. Une étude quantitative à partir du chromatogramme est impossible car pratiquement aucun pic ne correspond à un peptide pur.

De façon plus fine, nous pouvons remarquer que le type de coupure des liaisons impliquant un acide glutamique et aspartique est très différent à l'intérieur d'un même système. Les liaisons impliquant un acide aspartique sont beaucoup plus résistantes à la protéolyse que celles impliquant un acide glutamique. Seulement 7% des liaisons impliquant un acide aspartique sont hydrolysées totalement en solution contre 61% pour les liaisons impliquant un acide glutamique. Cette différence de cinétique d'hydrolyse pour l'acide aminé en position  $P_1$  a déjà été décrite dans la littérature. Breddam et coll. [Breddam et Meldal 92] ont déterminé sur des substrats synthétiques une hydrolyse 1000 fois plus rapide avec l'acide glutamique par rapport à l'acide aspartique.

### 3.2.4 Analyse des coupures réalisées par l'endoprotéinase Glu-C sur l'hémoglobine en phases homogène et hétérogène

Afin de comprendre le mécanisme mis en jeu lorsque l'hémoglobine est adsorbée sur le support, chaque liaison, ainsi que le type de coupure effectuée dans les deux systèmes ont été analysés.

#### Clivage des liaisons au niveau d'un acide glutamique

##### *Liaison Glu-Ala.*

Nous avons recensé deux liaisons Glu-Ala. La première est située sur la chaîne  $\alpha$  en position 27-28 et son environnement proche est représenté dans la séquence (25). La seconde se trouve en position 25-26 de la chaîne  $\beta$ , et son environnement proche est représenté par la séquence (26).



Ces deux liaisons, bien qu'identiques, ne présentent pas le même type de coupure lors de l'hydrolyse en solution. L'hydrolyse est partielle dans la chaîne  $\alpha$  et totale dans la chaîne  $\beta$ . Les séquences proches de ces liaisons diffèrent par un seul acide aminé, l'acide en position  $P_2$  qui est occupé dans la chaîne  $\alpha$  par une alanine et dans la chaîne  $\beta$  par une glycine. L'alanine est plus hydrophobe que la glycine ce qui peut expliquer la coupure totale lorsque l'acide aminé en position  $P_2$  est une glycine et une hydrolyse seulement partielle lorsque la position  $P_2$  est occupée par une alanine.

En phase hétérogène, le type de coupure réalisée sur la liaison 27-28 $\alpha$  n'est pas modifiée. Des variations quantitatives peuvent avoir eu lieu, mais nous ne sommes pas en mesure de les détecter. La charge locale est négative, car 3 acides glutamiques sont présents dans une séquence de 8 acides aminés, et nous remarquons également peu d'acides aminés hydrophobes. Logiquement, cette portion de l'hémoglobine ne doit entretenir que très peu d'interactions avec le support, ne modifiant pas ou peu le type de coupure observé.

Le type de coupure réalisé sur la liaison Glu-Ala (25-26 $\beta$ ) est modifié en phase hétérogène, puisqu'il devient partiel. L'environnement immédiat est relativement peu marqué du point de vue de la charge et de l'hydrophobicité (séquence 26). Nous remarquons cependant une leucine en position  $P'_2$  et une arginine en position  $P'_4$  qui doivent contribuer à l'adsorption sur le support de la séquence adjacente à la liaison du côté C-terminal. Cette adsorption peut provoquer, par une gêne stérique, le ralentissement de l'hydrolyse de cette liaison en phase hétérogène.

#### *Liaisons Glu-Leu.*

Deux liaisons de ce type sont rencontrées dans l'hémoglobine bovine. La première se trouve en position 82-83 de la chaîne  $\alpha$  et la seconde en position 89-90 de la chaîne  $\beta$ . Leurs environnements immédiats sont représentés respectivement dans les séquences (27) et (28).



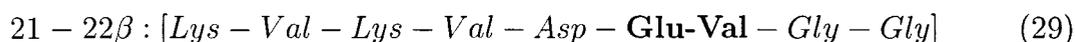
Nous avons observé pour ces deux liaisons une coupure de type partielle en solution, en accord avec les résultats de Houmard et coll. [Houmard et Drapeau 72] qui ont déterminé un taux d'hydrolyse de 25% pour une liaison Glu-Leu de la myoglobine de coeur de cheval.

En phase hétérogène, la liaison 82-83  $\alpha$  reste partiellement hydrolysée. Ce résultat semble normal, puisqu'un acide aspartique négatif en position  $P'_3$  et de 2 serines hydrophiles en position  $P_2$  et  $P'_2$  sont présents. Cette portion de chaîne ne devrait à

priori pas être adsorbée sur le support, ce qui permet à l'enzyme de couper dans les mêmes conditions qu'en phase homogène. L'analyse est identique pour la seconde liaison Glu-Leu (89-90 $\beta$ ) hydrolysée également de façon partielle en phase hétérogène. L'environnement est dans ce cas également ni très hydrophobe ni très positif.

#### *Liaison Glu-Val*

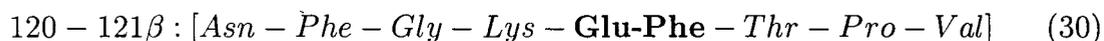
La liaison Glu-Val en position 21-22 de la chaîne  $\beta$  est la seule de l'hémoglobine bovine. L'environnement immédiat de cette liaison est représenté dans la séquence (29). La coupure est totale dans nos conditions d'hydrolyse en phase homogène. Ces résultats sont en désaccord avec ceux de Houmard et coll. [Houmard et Drapeau 72], qui obtiennent une hydrolyse partielle à 25% pour une liaison Glu-Val de la myoglobine de coeur de cheval. L'analyse de l'environnement proche du site de coupure (séquence 29) révèle 2 glycines en position P'<sub>2</sub> et P'<sub>3</sub> qui semblent contrebalancer l'effet défavorable de la valine. De plus Breddam et coll. [Breddam et Meldal 92] ont noté sur des substrats synthétiques simples que la valine en position P'<sub>1</sub> n'est pas défavorable. L'hydrolyse totale de la liaison Glu-Val n'est donc pas anormale.



Lors de l'hydrolyse en phase hétérogène, l'hydrolyse de cette liaison devient partielle. Cette modification semble due à la portion N-terminale de la liaison qui est composée de 2 lysines et de 2 valines, acides aminés respectivement positifs et hydrophobes ayant de fortes chances de s'adsorber sur le support.

#### *Liaison Glu-Phe.*

Une seule liaison Glu-Phe est rencontrée dans l'hémoglobine bovine, en position 120-121 de la chaîne  $\beta$ . Il s'agit de l'une des liaisons fortement défavorisée et rencontrée à un taux de coupure de 25 % par Houmard et coll. [Houmard et Drapeau 72]. Breddam et coll. [Breddam et Meldal 92] ont montré quant à eux, par action de l'endoprotéinase Glu-C sur des substrats synthétiques simples, que le phénylalanine est favorable en position P'<sub>1</sub>. L'hydrolyse partielle dans la myoglobine de coeur de cheval par Houmard est due non pas à la phénylalanine, mais à un autre acide aminé de la séquence proche qui est lui défavorable (par exemple la proline en position P'<sub>2</sub>). Dans nos conditions d'hydrolyse en solution, cette liaison est hydrolysée totalement.



L'analyse de la séquence proche de cette liaison (séquence 30) montre que le caractère hydrophobe de la phénylalanine est tempéré par la présence d'une thréonine en position P'<sub>2</sub> et d'une lysine en position P<sub>2</sub>, ce qui peut expliquer l'hydrolyse. En phase hétérogène, l'hydrolyse de cette liaison reste totale. Ce résultat est étonnant puisque nous pouvons noter dans la séquence proche une lysine en position P<sub>2</sub> et bien sûr une phénylalanine en position P'<sub>1</sub>, mais aussi en position P<sub>4</sub>. Ces 2 acides aminés respectivement positif et hydrophobe devraient contribuer à l'adsorption de cette portion d'hémoglobine sur le support et protéger la liaison. La présence d'une proline en position P'<sub>3</sub> peut expliquer le résultat observé. Il est bien connu que la

proline provoque un coude dans une séquence d'acides aminés. Nous pouvons alors imaginer que la conformation provoquée par la présence de la proline empêche une bonne adsorption sur le support.

*Liaison Glu-Tyr.*

L'hydrolyse de la liaison Glu-Tyr rencontrée en position 23-24 de la chaîne  $\alpha$  est partielle en phase homogène et hétérogène. L'environnement de cette liaison (séquence 31) est composé d'acides aminés peu hydrophobes tels que l'alanine et la glycine, et aucune charge positive n'est présente.



Il est donc envisageable que l'enzyme puisse accéder à ce site de façon à peu près normale en phase hétérogène, comme dans le cas d'une hydrolyse en solution.

*Liaison Glu-Glu et Glu-Lys.*

La liaison Glu-Glu en position 5-6 de la chaîne  $\beta$  n'est pas hydrolysée même partiellement. L'environnement proche de la liaison est le suivant :



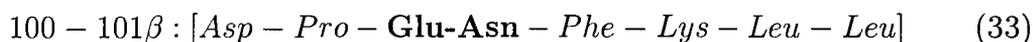
Dans cette séquence, deux coupures peuvent en théorie être envisagées. La première entre les deux acides glutamiques et la seconde entre l'acide glutamique et la lysine. Il est cependant fort peu probable que toutes deux puissent avoir lieu sur la même chaîne. L'endoprotéinase Glu-C est une endoprotéase, ce qui signifie qu'elle hydrolyse des liaisons peptidiques à l'intérieur d'une chaîne. Son site actif doit nécessiter la présence d'au moins 1 acide aminé en position  $P_2$  afin de positionner le substrat. Les résultats obtenus semblent montrer que la liaison Glu-Lys (6-7 $\alpha$ ) est favorisée par rapport à la liaison Glu-Glu à un point tel que les produits d'hydrolyse de cette dernière ne sont même pas décelables. Un résultat similaire a été observé par Breddam et coll. [Breddam et Meldal 92] sur des substrats synthétiques simples. Le peptide synthétique utilisé contient une séquence Glu-Glu-Tyr dans laquelle seule la liaison Glu-Tyr est hydrolysée.

Lors de l'hydrolyse en phase hétérogène, la liaison Glu-Glu est partiellement hydrolysée. En effet, la lysine qui est un acide aminé chargé positivement est suivie par deux alanines hydrophobes (séquence 32). Ces trois acides aminés sont susceptibles de s'adsorber sur le support et de défavoriser l'hydrolyse de la liaison Glu-Lys au profit sa voisine Glu-Glu.

*Liaison Glu-Asn*

La seule liaison Glu-Asn rencontrée dans l'hémoglobine bovine se trouve en position 100-101 de la chaîne  $\beta$ . L'environnement de cette liaison, hydrolysée totalement en phases homogène et hétérogène, est présenté dans la séquence (33). Pourtant, l'analyse de l'environnement montre une phénylalanine, une lysine et également 2 leucines du côté C-terminal de la liaison. Cette portion devrait donc être adsorbée sur le support et réduire le taux de coupure en phase hétérogène. Tout comme pour

la liaison Glu-Phe montrant un comportement étrange en phase hétérogène (coupure totale malgré l'environnement défavorable) nous pouvons remarquer une proline en position P<sub>2</sub>. La capacité de cet acide aminé à former un coude, nuit peut-être à l'adsorption de la séquence, permettant l'hydrolyse



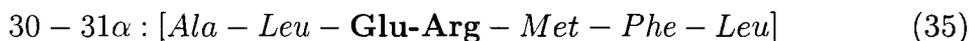
#### *Liaison Glu-Ser*

La liaison Glu-Ser (42-43  $\beta$ ) est totalement hydrolysée en solution ce qui semble normal puisqu'aucun acide aminé défavorable n'est détecté dans la séquence proche (séquence 34). En phase hétérogène, par contre, cette coupure totale se transforme en coupure partielle. Nous pouvons noter en position P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> et P'<sub>2</sub> une phénylalanine, acide aminé fortement hydrophobe, ainsi qu'une arginine en position P<sub>4</sub>. Ce segment ou au moins la partie C-terminale de la liaison doit être adsorbé sur le support, ce qui gêne sans doute l'enzyme.



#### *Liaison Glu-Arg*

La liaison Glu-Arg rencontrée en position 30-31 de la chaîne  $\alpha$  est hydrolysée partiellement en phase homogène et en phase hétérogène. Cette liaison est la seule accessible lors de l'hydrolyse de la chaîne  $\alpha$  native, comme l'ont montré Iyer et coll. [Iyer et Acharya 87]. Il est donc normal que l'hydrolyse se fasse dans nos conditions ou l'hémoglobine est dénaturée par 0,1% de SDS en solution. Lors de l'hydrolyse en phase hétérogène, nous remarquons que le taux d'hydrolyse est beaucoup plus faible que dans le cas de l'hydrolyse en phase homogène. En effet, le seul peptide contenant la liaison 30-31 $\alpha$  non hydrolysé est facilement quantifiable car il est l'unique composant d'une fraction observée sur le chromatogramme. L'environnement de la liaison est le suivant :

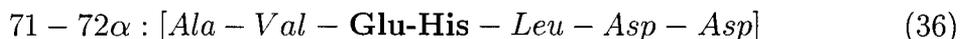


Cet environnement est rendu fortement hydrophobe par la présence de 2 leucines en position P<sub>2</sub> et P'<sub>4</sub> et également d'une phénylalanine en position P'<sub>3</sub>. Des interactions avec le support sont donc envisagées à ce niveau entre la chaîne  $\alpha$  et le support entraînant une protection partielle du site Glu-Arg, normalement accessible même sur la chaîne native.

#### *Liaison Glu-His*

Le cas de la liaison Glu-His est particulier. Elle se trouve en position 71-72 de la chaîne  $\alpha$ . Tout comme la liaison Glu-Glu en 5-6  $\alpha$ , cette liaison est non hydrolysée en phase homogène et partiellement hydrolysée en phase hétérogène. Nous observons

donc une hydrolyse améliorée de cette liaison alors que dans tous les autres cas l'hydrolyse est soit identique entre les deux systèmes soit restreinte en phase hétérogène. L'environnement immédiat dans l'hémoglobine est représenté dans la séquence (36).



En phase homogène, l'absence d'hydrolyse de cette liaison ne s'explique pas puisqu'aucun acide aminé défavorable n'est rencontré dans la séquence proche. En phase hétérogène par contre, quelques éléments expliquant une hydrolyse peuvent être décelés dans la séquence. Nous remarquons des acides aminés hydrophobes tels que la valine en position P<sub>2</sub> ou la leucine en position P'<sub>2</sub>, mais surtout un acide glutamique au niveau de la liaison étudiée et 2 acides aspartiques en position P'<sub>3</sub> et P'<sub>4</sub>. Dans ce cas, l'effet de charge semble l'emporter sur l'hydrophobicité, le segment n'est à priori pas adsorbé sur le support. La liaison devient peut-être hydrolysable car d'autres prioritaires en solution sont défavorisées par l'adsorption sur le support. Etant donné la gêne stérique imposée sur certaines liaisons, l'enzyme hydrolyserait des liaisons moins favorable mais accessibles.

L'étude de toutes ces liaisons impliquant un acide glutamique rencontrées dans l'hémoglobine bovine permettent d'observer des modifications dans l'hydrolyse des liaisons en phase homogène et hétérogène. Une modification de la sélectivité est incontestable puisque certaines liaisons non hydrolysées en phase homogène le deviennent en phase hétérogène et que dans la majorité des cas une gêne est provoquée par l'adsorption sur le support.

### Clivage des liaisons au niveau de l'acide aspartique

Contrairement aux liaisons impliquant l'acide glutamique qui sont en majorité hydrolysées totalement, les liaisons au niveau de l'acide aspartique sont, sauf exceptions, hydrolysées partiellement ou pas du tout (tableau 6). En phase hétérogène lorsque l'hémoglobine est adsorbée sur le support, le clivage de ces liaisons n'est pas modifié dans la majorité des cas. A l'intérieur de la classe la plus représentée (hydrolyse partielle), il y a sans doute des modifications au niveau qualitatif que nous ne sommes pas en mesure de détecter. Seules les liaisons dont le type de coupure est modifié entre les deux systèmes ont été analysées.

#### *Liaisons Asp-Ala.*

Une seule liaison Asp-Ala est présente dans l'hémoglobine bovine. Il s'agit de la liaison 51-52  $\beta$  dont l'environnement immédiat est le suivant:



Cette liaison est hydrolysée partiellement en solution, comme la majorité des liaisons impliquant un acide aspartique. Par contre, l'hydrolyse devient totale en phase hétérogène. Ce résultat peut s'expliquer par la séquence proche de la liaison qui n'est pas très hydrophobe et contient par contre deux acides aminés négatifs. Cette portion d'hémoglobine reste donc éloignée du support sans doute par un phénomène de répulsion dû aux charges identiques entre la séquence et le support. Le site n'est

pas protégé par la présence du support et reste accessible à l'enzyme, voir même devient plus accessible que lors de l'hydrolyse en solution.

*Liaisons Asp-Leu.*

Cinq liaisons Asp-Leu sont dénombrées dans les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine. Seule une nous intéresse ici, la liaison 75-76  $\alpha$  qui est non hydrolysée en solution est devenue partiellement hydrolysée en phase hétérogène. Le type de coupure des autres liaisons n'est pas modifiée par la présence du support. L'environnement proche de la liaison 75-76  $\alpha$  est le suivant:



L'hydrolyse d'une liaison impliquant un acide aspartique étant lente, la présence en position P'<sub>2</sub> d'une proline fortement défavorable [Breddam et Meldal 92] explique la non hydrolyse en phase homogène. Nous remarquons également dans cette séquence, trois acides aminés négatifs et peu d'acides aminés hydrophobes. Cette portion de l'hémoglobine a de fortes chances de subir un effet de répulsion vis à vis du support, le site est donc accessible à l'enzyme dans une hydrolyse en phase hétérogène expliquant la coupure partielle dans ce système.

*Liaisons Asp-Glu.*

Une liaison Asp-Glu est rencontrée dans l'hémoglobine bovine en position 20-21  $\beta$ . Elle est composée de 2 acides aminés pouvant être hydrolysés par l'endoprotéinase Glu-C, mais à des vitesses différentes. Une liaison impliquant un acide glutamique est clivée 1000 fois plus vite qu'une liaison impliquant un acide aspartique [Breddam et Meldal 92]. La non hydrolyse de la liaison Asp-Glu au profit de sa voisine Glu-Val en solution est donc normale (séquence 39).



En phase hétérogène, cette liaison Asp-Glu devient partiellement hydrolysée. La séquence proche renferme 2 valines et 2 lysines, acides aminés hydrophobes et positifs qui devraient contribuer à adsorber le segment C-terminal de la liaison sur le support. Par contre deux acides aminés négatifs sont présents au niveau de la liaison à hydrolyser, ce qui peut nuire à l'adsorption. L'hydrolyse de la liaison Asp-Glu ne peut s'expliquer que si l'hydrolyse de la liaison Glu-Val est ralentie, peut-être par un effet lointain et mal compris du support.

*Liaison Asp-Asp.*

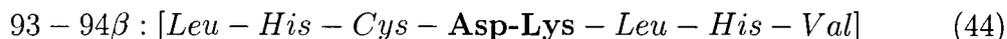
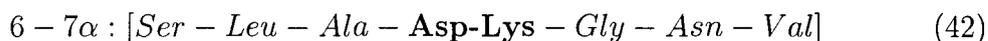
Deux liaisons Asp-Asp sont recensées dans l'hémoglobine bovine en position 74-75  $\alpha$  et 78-79  $\beta$ . En solution, la liaison 74-75  $\alpha$  n'est pas hydrolysée du tout alors que la liaison 78-79  $\beta$  est hydrolysée partiellement. Les environnements proches de ces liaisons peuvent être visualisés dans les séquences (40) et (41).



La grande différence entre ces séquences pouvant expliquer un type de coupure différent est la présence d'une proline en position P<sub>3</sub> de la liaison 74-75  $\alpha$ . La proline est fortement défavorable en position P<sub>3</sub>, P<sub>1</sub> et P<sub>2</sub> [Breddam et Meldal 92]. Nous pouvons penser qu'en position P<sub>3</sub> elle ralentit également l'hydrolyse. En phase hétérogène, nous ne notons aucune modification du type d'hydrolyse pour la liaison 78-79  $\beta$ . Par contre, la liaison 74-75  $\alpha$  devient partiellement hydrolysée. L'analyse de la séquence proche de cette liaison montre que l'environnement n'est pas très hydrophobe, seules 2 leucines sont notées en positions P<sub>1</sub> et P<sub>2</sub>. Nous remarquons surtout la présence de 3 acides aminés chargés négativement, ce qui doit empêcher le segment d'entretenir des interactions avec le support, mais également la présence d'une proline qui par la formation d'une structure en coude peut gêner l'interaction avec le support.

#### *Liaisons Asp-Lys.*

Nous avons dénombré trois liaisons Asp-Lys dans les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine bovine. La liaison 126-127  $\alpha$  est non hydrolysée que ce soit en phase homogène ou en phase hétérogène. Par contre pour les liaisons 6-7  $\alpha$  et 93-94  $\beta$  qui sont hydrolysées partiellement en solution deviennent non hydrolysées en phase hétérogène. Les séquences proches de ces liaisons sont les suivantes:



En solution, l'hydrolyse partielle d'une liaison Asp-Lys est normale puisque la lysine n'est pas un acide aminé défavorable en P<sub>1</sub> ([Breddam et Meldal 92]). La non hydrolyse au niveau de la liaison Asp-Lys 126-127 en solution doit donc s'expliquer par la présence d'un autre acide aminé défavorable dans la séquence proche. Au cours de l'hydrolyse en phase hétérogène, la liaison Asp-Lys semble être défavorisée puisque les liaisons 6-7  $\alpha$  et 93-94  $\beta$  deviennent non hydrolysées. Les séquences proches ne contiennent pas d'acides aminés chargés, nous sommes donc en présence de deux charges, une négative (Asp) et une positive (Lys) au niveau de la liaison elle-même. L'hydrophobicité n'est pas particulièrement élevée, il semble donc que la présence de cette charge positive soit suffisante pour permettre un phénomène de protection.

**Clivage de liaisons n'impliquant ni un acide aspartique, ni un acide glutamique**

Nous avons noté dans l'hydrolyse en phase homogène, l'hydrolyse de deux liaisons non conventionnelles pour l'endoprotéinase Glu-C. Elles se situent dans la chaîne  $\alpha$ . La première est la liaison Trp-Gly (14-15  $\alpha$ ) et la seconde est la liaison Lys-Val

(16-17  $\alpha$ ). Le tryptophane est un acide aminé fragile et nous pouvons considérer que la présence de ce peptide n'est pas dû à l'action de l'enzyme, mais à la fragilité du tryptophane. L'hydrolyse de la liaison Lys-Val ne peut s'expliquer de la même façon. L'endoprotéinase Glu-C est une enzyme très spécifique, mais des exemples d'hydrolyses de liaisons n'impliquant ni un acide glutamique ni un acide aspartique sont décrits dans la littérature. Ainsi, Breddam et coll. [Breddam et Meldal 92] ont noté une faible hydrolyse au niveau des acides aminés alanine et phénylalanine. Crimmins et coll. [Crimmins et coll. 89] ont quant à eux noté une hydrolyse au niveau d'une glycine. Ce type de coupure est rare mais peut donc exister.

## Conclusion

L'analyse des peptides présents dans les hydrolysats en phase homogène et hétérogène a révélé une différence importante des populations peptidiques, puisque seuls 60% des peptides sont communs aux deux hydrolysats. L'analyse du type de coupure démontre quant à elle un ralentissement global de l'hydrolyse en phase hétérogène, même si quelques liaisons sont mieux hydrolysées.

En règle générale, les modifications observées dans le type de coupure en phase hétérogène, peuvent être corrélées avec les propriétés du substrat et du support. Lorsque l'adsorption d'une portion est prévisible en fonction de sa charge et de son hydrophobicité, la liaison potentiellement hydrolysable qu'il renferme est moins bien hydrolysée qu'en solution. A l'opposé, si une portion d'hémoglobine ne doit pas s'adsorber, la liaison qu'elle renferme est soit hydrolysée de la même façon, soit dans certains cas, mieux hydrolysée. Nous pouvons conclure que le support possède un rôle protecteur pour les liaisons incluses dans des portions qui interagissent avec lui. Cette protection mène à une modification nette de la sélectivité de l'hydrolyse. La gêne stérique, provoquée par l'adsorption, ralentit plus ou moins l'hydrolyse d'une liaison, mais dans le même temps, permet l'hydrolyse de liaisons non favorisées normalement, mais accessibles.

## Chapitre 4

# Étude de la sélectivité de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la chymotrypsine en phase hétérogène



## Introduction

L'analyse des populations peptidiques finales a montré que l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par l'endoprotéinase Glu-C en phase hétérogène conduit à une nette modification de la sélectivité de la réaction protéolytique par rapport à l'hydrolyse en phase homogène. Cependant, les populations peptidiques restent communes à 60 %. Lors de l'hydrolyse par l'endoprotéinase Glu-C, les liaisons hydrolysables impliquent toujours les mêmes acides aminés, ce qui limite fortement les sites potentiels de coupure qui entretiennent des interactions avec le support. De plus, ces sites d'hydrolyse sont chargés négativement (acide aspartique et glutamique) tout comme le support. Par conséquent, les interactions avec le support ne doivent avoir lieu qu'en des positions plus éloignées ( $P_2$ ,  $P_3$ ,  $P'_1$ ,  $P'_2$ ) ce qui peut rendre l'influence du support difficile. Aussi, nous avons choisi de tester l'hydrolyse de l'hémoglobine en phase hétérogène avec le même support, mais avec une protéase moins spécifique offrant des sites potentiels de coupure plus nombreux et neutres au niveau de la charge. Le but du chapitre suivant est de vérifier si, dans ces conditions, l'hydrolyse en phase hétérogène s'accompagne d'un changement de sélectivité plus important. Nous avons choisi d'utiliser la chymotrypsine, qui est une protéase alimentaire peu spécifique et qui hydrolyse les liaisons peptidiques impliquant un acide aminé aromatique ou hydrophobe tel que la leucine. L'hydrolyse a été menée d'une part sur l'hémoglobine bovine en solution à 2 % (P/V) dénaturée par 0,1 % de SDS (P/V) avec un rapport enzyme/substrat de 1/50, dans un tampon Tris 50 mM à pH 6. Nous avons d'autre part réalisé une hydrolyse de l'hémoglobine dénaturée par 0,1 % de SDS (P/V) et adsorbée sur un support (20 mg d'hémoglobine/ml de support) avec également un rapport enzyme/substrat de 1/50 dans un tampon Tris 50 mM à pH 6. Ces deux hydrolysats constituent respectivement l'hydrolysats en phase homogène et l'hydrolysats en phase hétérogène. L'analyse des chromatogrammes en fin de réaction devrait nous permettre de conclure sur l'éventualité d'une différence dans le contenu des hydrolysats. Nous avons également examiné l'effet du support sur le mécanisme réactionnel et sur la cinétique de réaction. Puis, nous avons tenté, grâce à l'identification d'un peptide marqueur, d'expliquer la différence de comportement de certaines fractions des chromatogrammes entre les deux systèmes. Enfin, nous avons effectué un test de transport de la PPIX afin de savoir si nous avons enrichi l'hydrolysats en peptides intéressants, hydrophobes et positifs, solubilisant la porphyrine.

## 4.1 Comparaison des hydrolysats peptidiques issus de l'hydrolyse de l'hémoglobine en phase homogène et hétérogène

Les profils chromatographiques retenus pour la comparaison des hydrolyses en phases homogène et hétérogène en fin de réaction, sont obtenus à 22h pour l'hydrolyse en phase homogène et 72h pour l'hydrolyse en phase hétérogène. L'hydrolyse en solution semble produire des petits peptides ou des peptides hydrophiles que l'on retrouve dans la première partie du chromatogramme avec des temps de rétention faibles (figure 46a). Ce groupe de pics présent avant dix minutes d'élution n'est pas décelé dans le chromatogramme représentant l'hydrolysats obtenu en phase hétérogène (figure 46b), ce qui signifie que ces petits peptides ou peptides hydrophiles ne sont pas produits. Un phénomène inverse, peut être remarqué aux environs des temps de rétention de trente minutes. En effet, un groupe de pics est présent après 25 minutes de gradient en phase hétérogène, et absent dans le cas de l'hydrolyse en phase homogène. Ce groupe de pics correspond à des peptides de grandes tailles ou à des peptides hydrophobes. Ces deux observations permettent de supposer que l'hydrolyse en phase homogène conduit à un degré d'hydrolyse plus élevé que l'hydrolyse en phase hétérogène avec dans le premier cas des petits peptides hydrophiles, et dans le second cas des peptides plus gros et hydrophobes. De façon globale, nous pouvons conclure de l'analyse des chromatogrammes que les hydrolysats produits en phases homogène et hétérogène sont très différents.

Afin d'analyser plus précisément ces deux hydrolysats, les pics ou groupes de pics ont été numérotés sur les chromatogrammes, ce qui a permis de classer les fractions en quatre catégories différentes. Les deux premières ont déjà été citées, et correspondent aux pics présents sur un seul des chromatogrammes. La troisième catégorie comprend les pics présents sur les deux chromatogrammes en proportions égales (pics avec des aires équivalentes), et le quatrième groupe correspond aux pics présents sur les deux chromatogrammes mais en proportions différentes.

Le groupe 1, formé par les pics présents uniquement dans l'hydrolysats obtenu en phase homogène rassemble les pics 2, 3, 5, 6, 7 et 21 qui sont élués à des temps de rétention respectifs de 4; 5; 9; 11; 14,5 et 39 minutes. L'absence de ces pics dans l'hydrolysats obtenu en phase hétérogène signifie qu'ils renferment des peptides dont une ou plusieurs liaisons peptidiques qui peuvent être hydrolysées et ne l'ont pas été. Ceci est sans doute le résultat d'une forme de protection provoquée par l'adsorption de l'hémoglobine sur le support.

Le groupe 2 rassemble les pics 18, 19 et 20 qui possèdent des temps de rétention de 29, 31,5 et 38 minutes. Ils sont présents uniquement dans l'hydrolysats obtenu en phase hétérogène et renferment des peptides comportant un ou plusieurs sites de coupure potentiels non hydrolysés. Ils représentent sans doute les peptides précurseurs du groupe 1, et tout comme eux, ils nous renseignent sur le phénomène de protection dû au support.

Le groupe 3 comprend les pics qui sont présents sur les deux chromatogrammes en proportions équivalentes. Ce sont les pics 14, 16 et 17 qui sont élués à des temps de rétention respectifs de 22; 24,5 et 26,5 minutes. La présence de ces pics sur les

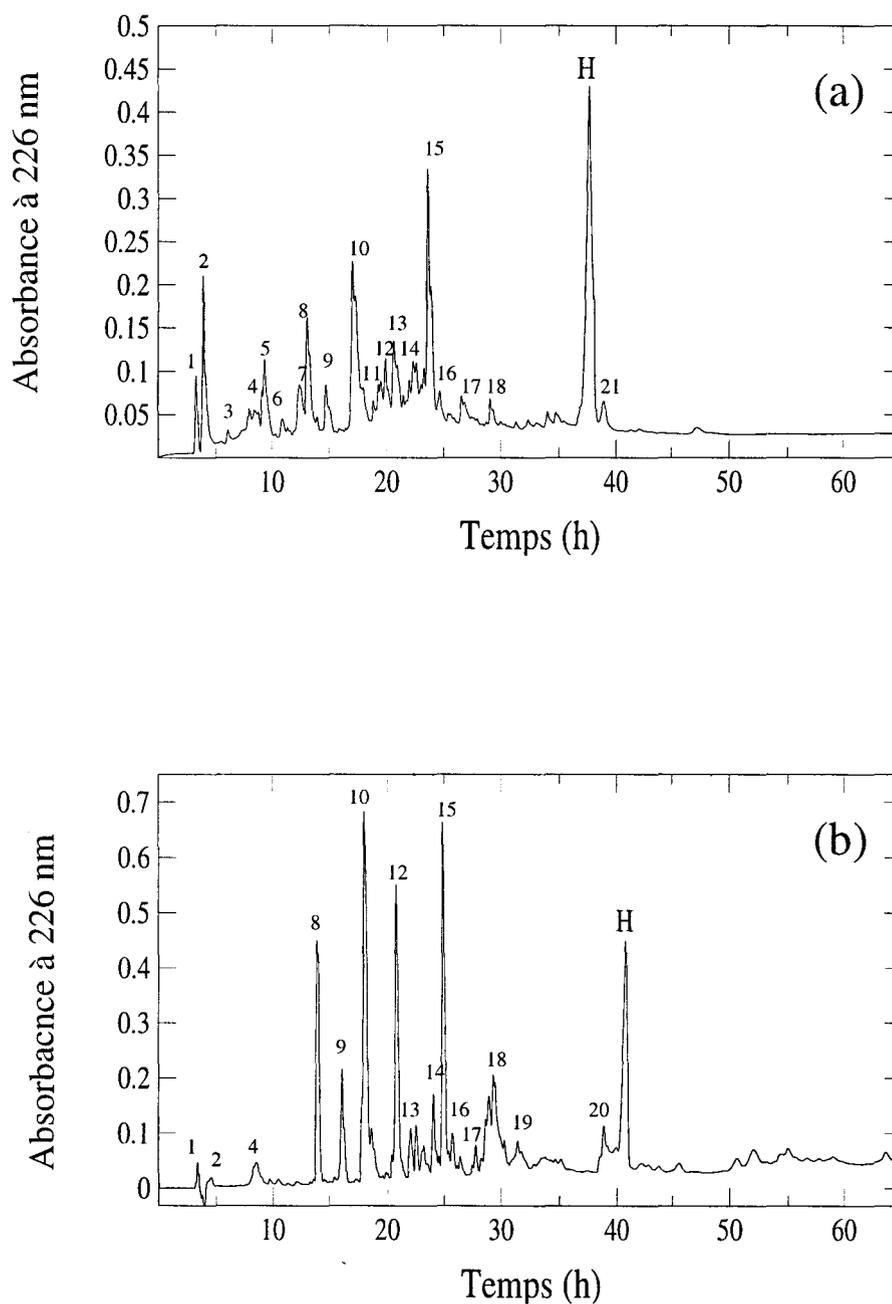


FIGURE 46 – Profils chromatographiques de phase inverse obtenus en fin d'hydrolyse de l'hémoglobine par la chymotrypsine en tampon Tris/HCl 50 mM à pH 6 en phase homogène et en phase hétérogène. (a) Hémoglobine dénaturée par 0,1% de SDS en solution, (b) Hémoglobine dénaturée par 0,1% de SDS et adsorbée sur le support. Les conditions de chromatographie sont développées dans le paragraphe 1.7.1.

deux chromatogrammes indique qu'une molécule d'hémoglobine n'est pas adsorbée totalement sur le support et que certains sites sont hydrolysés normalement en phase hétérogène.

Le groupe 4 comprend les pics présents sur les deux chromatogrammes mais en proportions différentes. Il représente sans doute le groupe le plus intéressant car il peut mener à une étude comparative sur la cinétique d'apparition et de disparition d'un ou plusieurs peptides. Ce groupe peut être divisé en deux parties distinctes, la première est représentée par les pics 4 et 13 qui sont élués à 8 et 21 minutes. Ils sont présents majoritairement dans l'hydrolysate en phase homogène. La deuxième partie est représentée par les pics 8; 9; 10; 12 et 15 présents en proportions plus élevées dans l'hydrolysate en phase hétérogène, et élués à 13; 15; 18; 19,5 et 24 minutes respectivement.

Les profils chromatographiques sont en fait beaucoup plus différents que dans le cas de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par l'endoprotéinase Glu-C en phase homogène et hétérogène. Les groupes 1, 2 et 4 sont représentatifs des différences présentes dans les deux hydrolysats. Ils prouvent que l'adsorption de l'hémoglobine sur le support a permis de générer des peptides différents de ceux produits dans l'hydrolyse en phase homogène. L'utilisation du support pour immobiliser l'hémoglobine a donc permis de modifier la sélectivité de l'hydrolyse par la chymotrypsine bovine.

## 4.2 Choix et identification d'un peptide marqueur

Afin de montrer que le changement de sélectivité est principalement dû à un ralentissement de l'hydrolyse de certains sites interagissant avec le support, nous avons choisi de suivre un peptide marqueur observable à la fois dans l'hydrolysate obtenu en phase homogène et en phase hétérogène, mais qui présente un comportement différent dans chaque système.

Le groupe 3 ne peut pas renfermer de peptide marqueur, car les fractions qui le composent contiennent des peptides présents dans les deux hydrolysats en quantités égales.

Les pics du groupe 1 ne sont présents que dans l'hydrolysate obtenu en phase homogène, ce qui signifie que les peptides correspondants proviennent d'un peptide plus gros dont un site de coupure a été protégé en phase hétérogène. L'un de ces peptides ne peut cependant pas être choisi comme peptide marqueur car le peptide parent dont il est issu ne peut pas être identifié. Il est par conséquent impossible de savoir quel site de coupure est protégé. L'enzyme a aussi bien pu hydrolyser le site qui se trouve du côté N-terminal que celui qui se trouve du côté C-terminal.

Les pics du groupe 2 ne sont pas nombreux, et représentent des peptides dont un site de coupure potentiel n'a pas été hydrolysé (ils sont présents uniquement dans l'hydrolysate obtenu en phase hétérogène). Ce sont de bons candidats pour le choix du peptide marqueur; mais le problème majeur est que le suivi doit se faire au cours de la cinétique et que leur aire sur les chromatogrammes n'est pas très importante et donc qu'ils ne sont pas présents en quantité suffisante.

Parmi les pics du groupe 4 (pics présents dans les deux hydrolysats, mais en proportions différentes), seuls ceux présents majoritairement dans l'hydrolysate obtenu

en phase hétérogène peuvent être étudiés. En effet, ils sont la preuve directe d'une protection. Les pics 8, 9 10 et 15 sont à peu près équivalents dans leur comportement. Ils sont présents en quantité suffisante dans l'hydrolysate en phase homogène et en quantité nettement plus élevée en phase hétérogène. Le pic 12 présente le même phénomène de façon amplifiée. C'est l'un des pics majoritaires du chromatogramme représentant l'hydrolysate en phase hétérogène, alors qu'il est minoritaire dans le chromatogramme correspondant à l'hydrolyse obtenue en phase homogène. La disproportion entre les deux systèmes est suffisamment élevée pour révéler des différences de comportement significatives. C'est donc un peptide contenu dans le pic 12 qui fera l'objet d'une étude plus poussée en tant que peptide marqueur.

### Identification du peptide marqueur

Le choix de la fraction contenant le peptide marqueur ayant été effectué, il convient maintenant d'identifier le ou les composants qu'elle renferme. Pour cela, le détecteur spectral à barrettes de diodes couplée à la CLHP renseigne sur la pureté d'une fraction. Il a permis de déterminer que la fraction correspondant au pic 12 n'était pas pure. Afin de séparer les différents constituants de cette fraction, il est possible de la recueillir et de la purifier par une seconde étape de chromatographie en mode isocratique. Ainsi, plusieurs pics sont normalement obtenus et analysés un à un afin de les identifier. Cette technique est satisfaisante dans le cas simple d'une identification, mais pour quantifier un peptide au cours des cinétiques, il est inconcevable de récolter le pic, puis de le purifier, car la quantification serait perturbée. Pour cette raison, la séparation des peptides correspondants au pic 12 a été mise au point sur l'hydrolysate total. La technique reste la même, le gradient a simplement été suspendu au temps de 11 minutes pour réaliser un palier (conditions isocratiques) avec un pourcentage de tampon B de 23,5% pendant 15 minutes. Puis le cours normal du gradient a été repris. Il en a résulté une augmentation du temps du gradient de 15 minutes seulement tout en permettant une séparation des peptides correspondant à la fraction du pic 12. La fraction 12 est composée majoritairement d'un peptide élué à 33 minutes dans le gradient modifié et d'un peptide minoritaire élué à 34 minutes. Ils sont notés respectivement 12a et 12b sur la figure 47.

Nous avons choisi le peptide majoritaire récolté dans les deux hydrolysats pour une analyse en spectrométrie de masse par désorption laser. Le spectre de masse présente une seule entité qui possède une masse protonée de 1430 Dalton, confirmant ainsi la pureté du pic (figure 48). L'identification du peptide correspondant a été faite grâce à la séquence des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine. Tous les fragments d'une masse de 1429 Da avec une marge d'erreur de 1 Da sont retenues. Cinq possibilités sont alors envisageables. La spectrométrie UV-visible de dérivée appliquée à la fraction éluée à 33 minutes (pic 12a dans la figure 47) montre qu'elle contient un seul et unique acide aminé aromatique qui est le tryptophane. Parmi les peptides ayant une masse adéquate, seul le peptide 1-14  $\alpha$  possède un tryptophane comme seul acide aminé aromatique. Dans ce peptide, l'acide aminé en position C-terminale est le tryptophane qui correspond à la spécificité de la chymotrypsine.

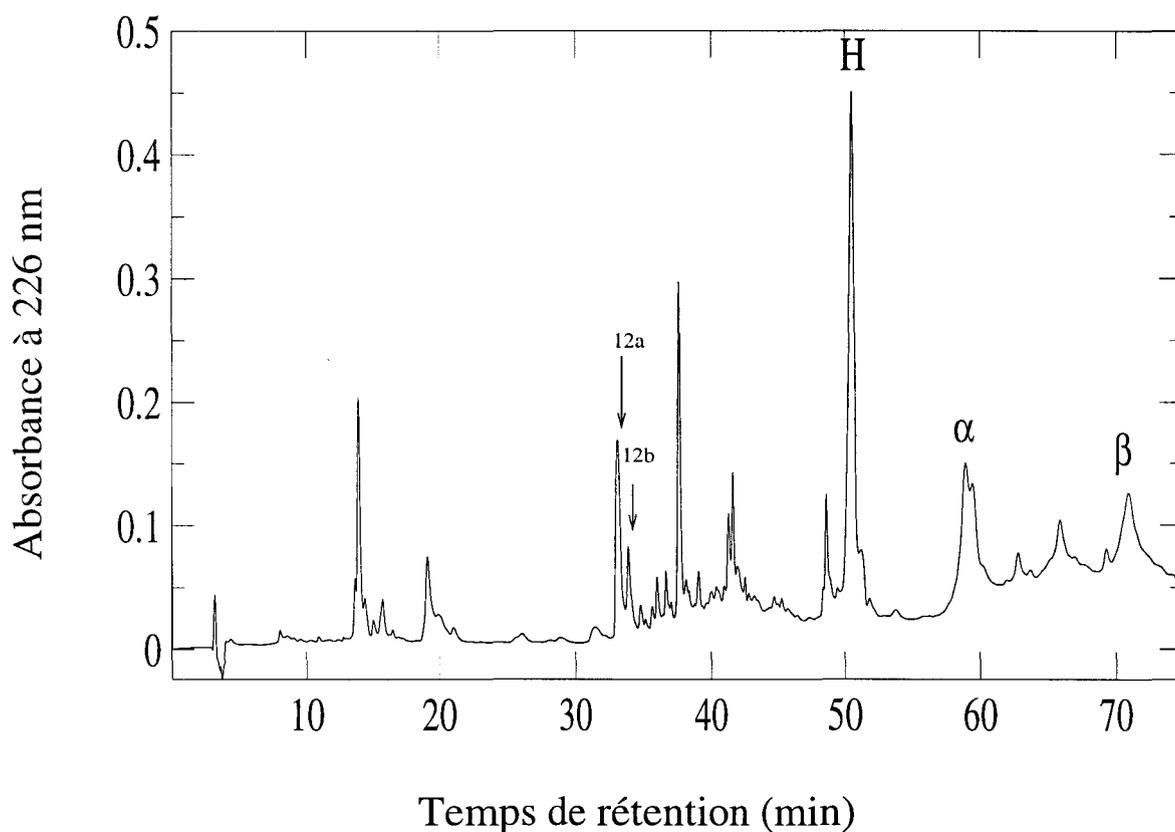


FIGURE 47 – Profil chromatographique de phase inverse de l'hydrolysate chymotrypsique à pH 6 obtenu après 25 h d'hydrolyse à partir de l'hémoglobine bovine dénaturée par 0,1 % de SDS et adsorbée sur la résine. Le gradient utilisé pour obtenir ce chromatogramme est le gradient modifié décrit dans le paragraphe 1.7.1. Les flèches permettent de cibler le peptide marqueur choisi (12a) ainsi que l'impureté présente dans le pic avant modification du gradient (12b).

Le peptide 1-14  $\alpha$  est donc le peptide marqueur que nous avons choisi pour suivre l'hydrolyse en phases homogène et hétérogène. Sa séquence est la suivante :

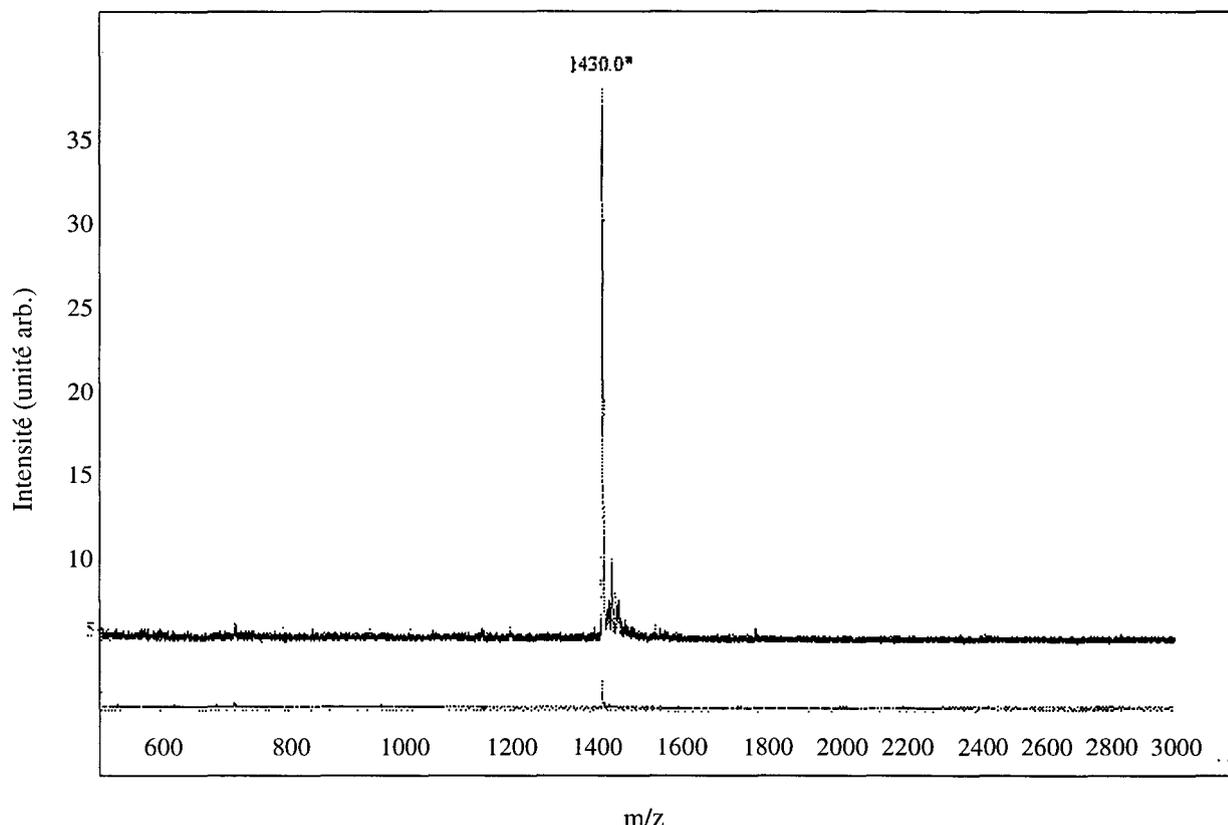


FIGURE 48 – *Spectre de masse du peptide marqueur 12a obtenu par désorption laser.*

### 4.3 Comparaison des mécanismes réactionnels d'hydrolyse de l'hémoglobine en phases homogène et hétérogène

Une étude cinétique a été menée en phases homogène et hétérogène afin de comparer les mécanismes d'hydrolyse de l'hémoglobine. Nous avons appliqué le gradient de chromatographie modifié permettant le suivi et la quantification du peptide 1-14 $\alpha$ . Les hydrolyses ont été suivies dans les deux systèmes au cours du temps par CLHP de phase inverse. Quatre chromatogrammes de chaque système correspondant au début de réaction (a, e), à deux intermédiaires (b, c, f, g) et à la fin de réaction (d, h) sont rassemblés dans la figure 49. L'état d'avancement de la réaction est comparable dans les deux systèmes pour chaque temps présenté, c'est à dire qu'ils ont le même taux

de conversion (quantité de substrat intact identique). Nous pouvons remarquer dans les deux systèmes que les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine (pics situés au delà de 50 minutes) disparaissent progressivement jusqu'à la fin de la réaction, soit 22h pour l'hydrolyse en phase homogène et 96 h pour l'hydrolyse en phase hétérogène. Ce mécanisme est appelé "one by one" par Linderström-Lang [Linderström-Lang 52]. Il implique l'hydrolyse de tous les sites potentiels d'une chaîne donnée avant l'attaque d'une autre chaîne. Des peptides finaux sont alors obtenus en grande majorité dès le début de la réaction. D'après la cinétique observée, l'adsorption de l'hémoglobine sur le support ne semble pas modifier ce mécanisme d'hydrolyse. Or, s'il n'est pas modifié, la production de peptides plus gros et plus hydrophobes dans l'hydrolyse en phase hétérogène est probablement due à une protection de certains sites de coupure sur l'hémoglobine.

#### 4.4 Comparaison de la cinétique des réactions en phases homogène et hétérogène

Les chromatogrammes rassemblés dans la figure 49 ne représentent qu'une partie de la cinétique d'hydrolyse. L'ensemble des données recueillies a été analysé afin de comparer la cinétique des réactions en phases homogène et hétérogène. A partir des chromatogrammes correspondant aux différents temps d'hydrolyse, le taux de conversion à cet instant peut être calculé. Il est défini comme étant la proportion relative exprimée en pourcentage des chaînes  $\alpha$  ou  $\beta$  ayant subi au moins une coupure par la chymotrypsine. Il est donné par la formule suivante :

$$T(\%) = \left( 1 - \frac{A\alpha_t + A\beta_t}{A\alpha_0 + A\beta_0} \right) \times 100 \quad (45)$$

ou  $T$  est le taux de conversion, et  $A$  l'aire associée aux chaînes  $\alpha$  ou  $\beta$  au temps 0 et au temps  $t$  considéré. Ce taux de conversion doit ensuite être corrigé par rapport à l'étalon interne hème qui se trouve naturellement dans chaque hydrolysate. Le facteur de correction  $FC_1$  est représenté par le rapport de l'aire du pic de l'hème entre le temps d'hydrolyse considéré ( $AH_t$ ), et l'aire du témoin non hydrolysé ( $AH_0$ ).

$$FC_1 = \frac{AH_t}{AH_0} \quad (46)$$

Les taux de conversion obtenus en fonction du temps ont été reportés dans la figure 50. Nous en déduisons que l'hydrolyse en phase homogène procède très rapidement puisqu'entre 7h et 22h la totalité de l'hémoglobine est hydrolysée. Dans le cas de l'hydrolyse en phase hétérogène, il faut entre 72h et 96h pour obtenir le même résultat. La réaction globale est donc beaucoup plus lente en phase hétérogène qu'en phase homogène.

La disparition des chaînes se produit très rapidement en phase homogène jusqu'à un taux de conversion de 80% (1h), puis progresse lentement jusqu'à 100% (20h).

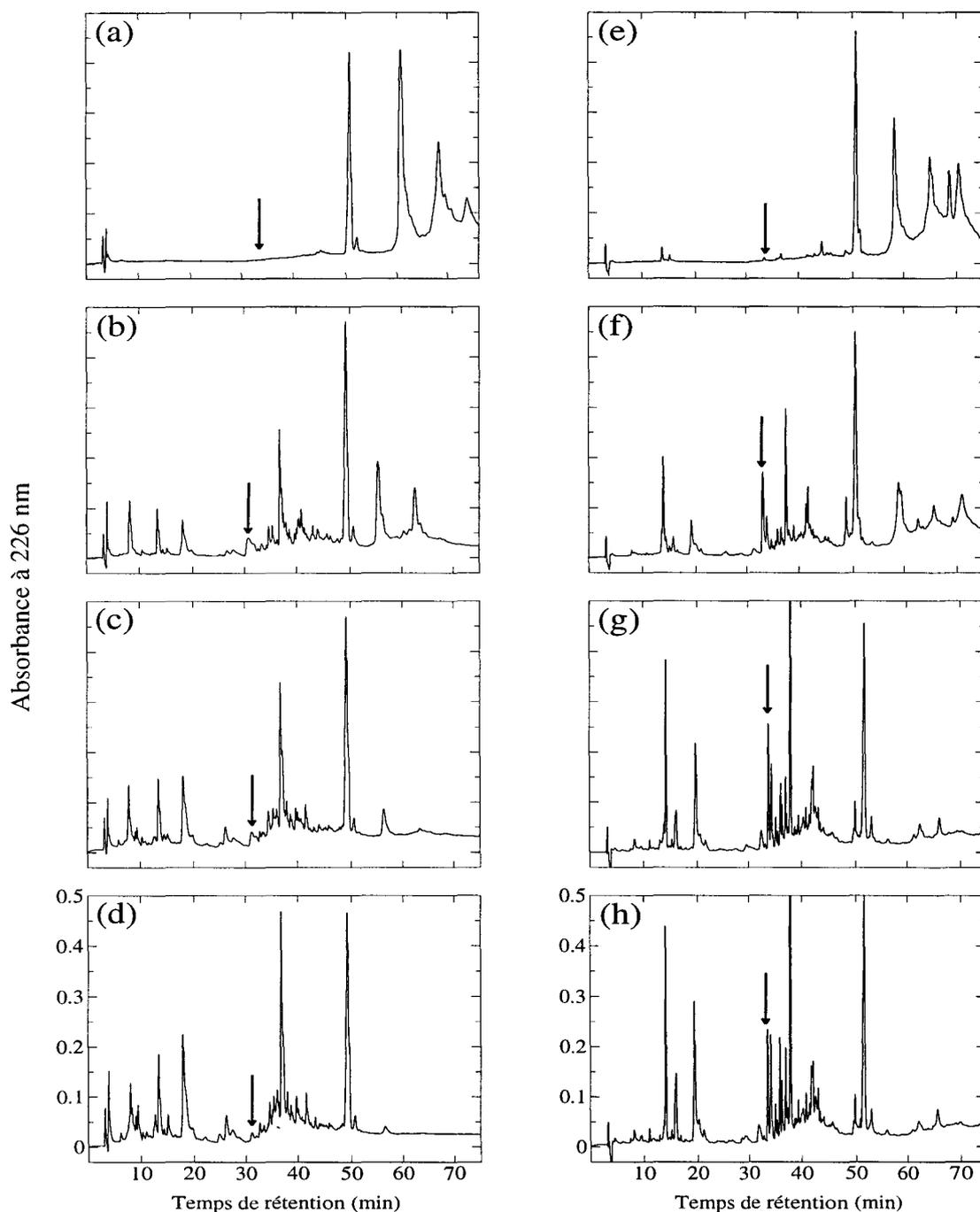


FIGURE 49 – Profils chromatographiques de phase inverse de la cinétique d'hydrolyse par la chymotrypsine en tampon Tris/HCl 50 mM à pH 6. Chaque temps d'incubation est donné avec le taux de conversion correspondant (%). Hémoglobine dénaturée en solution, (a) 30s, 13%, (b) 30 min, 37%, (c) 3 h, 94 %, (d) 7 h, 99%. Hémoglobine dénaturée adsorbée sur la résine, (e) 15 min, 15 %, (f) 8 h, 35 %, (g) 48 h, 93 %, (h) 72 h, 99 %. La flèche indique la position du peptide 1-14  $\alpha$ . Le gradient de chromatographie utilisé est le gradient modifié décrit dans le paragraphe 1.7.1.

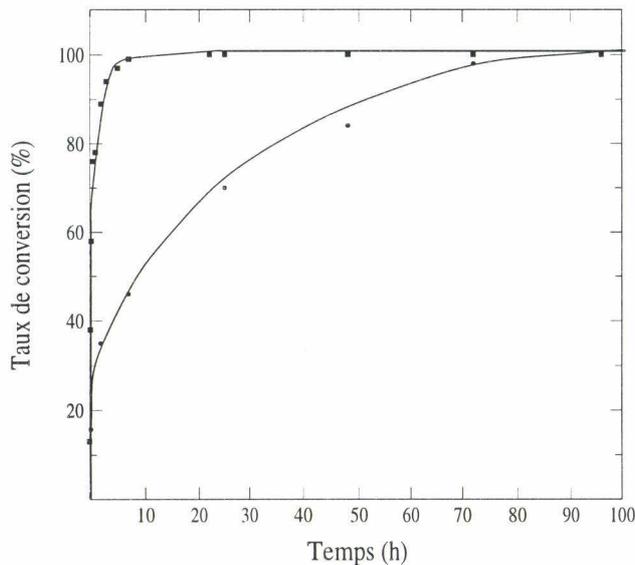


FIGURE 50 – Cinétiques d'hydrolyse de l'hémoglobine par la chymotrypsine en phases homogène (■) et hétérogène (●) en fonction du taux de conversion.

La courbe cinétique de l'hydrolyse en phase hétérogène est sensiblement différente. Nous observons également une phase rapide de disparition des chaînes au début de la réaction, mais qui se poursuit seulement jusqu'à 40% du taux de conversion (3h). Ensuite, la vitesse de réaction est beaucoup plus faible, puisque l'hydrolyse des 60 % d'hémoglobine toujours intacte nécessite 95 % du temps de réaction. Cette cinétique peut être expliquée par deux phénomènes. Le premier phénomène est directement lié à l'hydrolyse en phase hétérogène. Environ 20 % de la chymotrypsine s'adsorbe en 1 h sur la résine lorsque celle-ci contient 20 mg d'hémoglobine par ml. Dans cette première partie, la totalité de la chymotrypsine peut être considérée comme active alors que, plus tard, ce n'est plus le cas. Dans la seconde partie de la courbe, il est possible de considérer que l'activité enzymatique plus faible que dans la première partie est due en partie à l'adsorption de 20% de la chymotrypsine sur la résine, ralentissant la réaction. Le deuxième phénomène pouvant expliquer ce ralentissement global de la cinétique de réaction, sans doute le plus important, est dû aux contraintes diffusionnelles observables en catalyse hétérogène.

## 4.5 Suivi du peptide marqueur 1-14 $\alpha$

Le peptide marqueur choisi est le peptide 1-14 $\alpha$  élué à 33 min avec le gradient modifié en chromatographie de phase inverse. Les cinétiques d'évolution de ce peptide au cours des réactions en phases homogène et hétérogène ont été étudiées. Le suivi a été fait en fonction de l'aire occupée sur les différents chromatogrammes. Si la comparaison et la quantification au sein d'un même système peut se faire de façon aisée, il est plus délicat d'effectuer une comparaison entre les deux systèmes.

La technique employée, peut se résumer de la manière suivante :

La pureté du peptide marqueur est vérifiée, puis les variations d'aire dues aux erreurs d'injection sont corrigées grâce à l'étalon interne hème ( $FC_1$ ). Afin de comparer les systèmes entre eux, un deuxième facteur de correction ( $FC_2$ ) correspondant au taux d'hème présent dans chaque milieu au temps zero est appliqué. Les résultats rassemblés dans la figure 51 montrent qu'au cours des hydrolyses en phases homogène et hétérogène, le peptide marqueur présente une évolution semblable. En phase homogène, le peptide apparaît de façon assez lente et atteint sa concentration maximale pour un taux de conversion de l'hémoglobine de 80%. Ensuite, sa concentration baisse rapidement et devient nulle en fin de réaction.

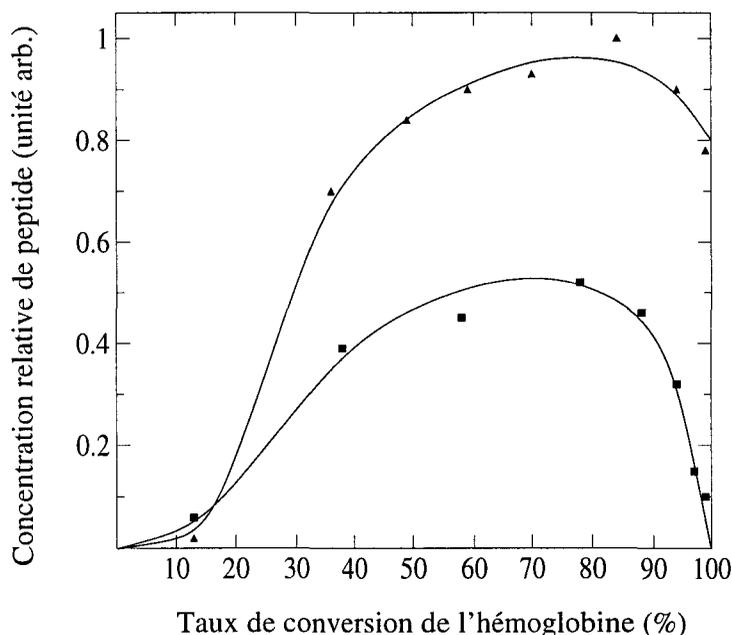


FIGURE 51 – Évolution de la concentration du peptide 1-14  $\alpha$  au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine en phases homogène ( $\blacksquare$ ) et hétérogène ( $\blacktriangle$ ).

Au cours de l'hydrolyse en phase hétérogène, la concentration du peptide marqueur augmente progressivement et parvient à sa concentration maximale également pour un taux de conversion de 80% également. Ensuite, la quantité de peptide décroît légèrement jusqu'à 80% de sa valeur maximale en fin de réaction théorique. Les courbes représentant les évolutions de la concentration du peptide marqueur en phases homogène et hétérogène sont homothétiques. La grande différence entre les deux systèmes réside dans l'accumulation du peptide en phase hétérogène. Il est produit en quantité double au cours de l'hydrolyse en phase hétérogène comparée à l'hydrolyse en phase homogène.

La quantité de peptide a également été représentée en fonction du temps d'hydrolyse dans la figure 52. Cette représentation permet de mieux visualiser la différence énorme de cinétique d'évolution de la concentration du peptide. Le peptide 1-14 $\alpha$  est apparu mais a également déjà disparu dans l'hydrolysats obtenu en phase ho-

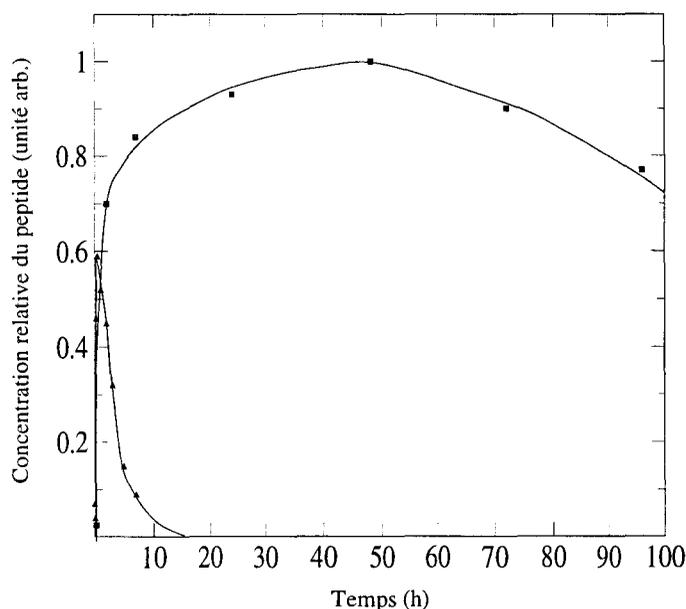


FIGURE 52 – Evolution de la concentration du peptide 1-14 $\alpha$  au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine en phase homogène (▲) et hétérogène (■).

mogène, alors qu'il commence seulement à être produit en phase hétérogène. Ce résultat s'explique par une cinétique fortement ralentie en phase hétérogène à cause des contraintes diffusionnelles. La quantité double du peptide obtenue en phase hétérogène s'explique quant à elle par la stabilisation du peptide 1-14 $\alpha$  alors qu'il est immédiatement hydrolysé en phase homogène. L'analyse de la séquence du peptide 1-14 $\alpha$  permet de remarquer qu'il est en majorité hydrophobe avec 2 valines, 4 alanines et 1 leucine. Il contient également 2 lysines chargées positivement. Ce peptide d'après sa séquence a donc de fortes chances d'interagir avec la résine hydrophobe et négative. Nous pouvons noter une leucine en position 2 et une asparagine en position 9 dont les liaisons peptidiques suivant ces deux acides aminés peuvent être hydrolysées par la chymotrypsine [Königsberg et Hill 62]. Le peptide 1-14 $\alpha$  est hydrophobe et positif, et possède deux sites de coupure potentiels. Le fait qu'il soit produit en plus grande quantité en phase hétérogène que dans l'hydrolyse en solution s'explique par un phénomène de protection dû à l'adsorption sur le support grâce aux lysines et aux acides aminés hydrophobes. Le suivi du peptide 1-14 $\alpha$  lors des cinétiques permet de conclure que l'utilisation de la résine mène à des intermédiaires stabilisés qui sont produits en plus grande quantité que lors d'une hydrolyse classique, par un phénomène de protection par adsorption sur le support.

## 4.6 Capacité de transport de la protoporphyrine IX par les hydrolysats chymotrypsiques

Le peptide 1-14 $\alpha$  n'est pas le seul à être présent en quantités différentes dans les deux hydrolysats. Les chromatogrammes en fin d'hydrolyse montrent une modification significative de la population peptidique globale. Nous avons vérifié que le changement de sélectivité obtenu par hydrolyse de l'hémoglobine en phase hétérogène a permis d'améliorer le rendement en peptides transporteurs de molécules insolubles telles que la protoporphyrine IX. La protoporphyrine IX est une molécule insoluble en solution aqueuse, hydrophobe et anionique à pH neutre. La résine étant hydrophobe et anionique, elle devrait permettre d'enrichir l'hydrolysats en peptides complémentaires, hydrophobes et cationiques qui sont de bons candidats pour le transport de la protoporphyrine IX.

Pour chaque hydrolysats peptidique obtenu en phase homogène et hétérogène, la capacité de transport de la PPIX a été étudiée. Les résultats sont rassemblés dans la figure 53.

La capacité maximale de solubilisation de l'hydrolysats obtenu en phase homogène est de 100  $\mu\text{g}$  de PPIX par mg d'hydrolysats. L'hydrolysats obtenu en phase hétérogène permet une solubilisation maximale de 300  $\mu\text{g}$  de PPIX par mg d'hydrolysats, soit trois fois plus que l'hydrolysats obtenu en phase homogène. Ces résultats démontrent que le changement de sélectivité observé dans la cinétique de l'hydrolyse en phase hétérogène oriente l'hydrolyse chymotrypsique vers une population peptidique possédant des propriétés physico-chimiques complémentaires à celles du support.

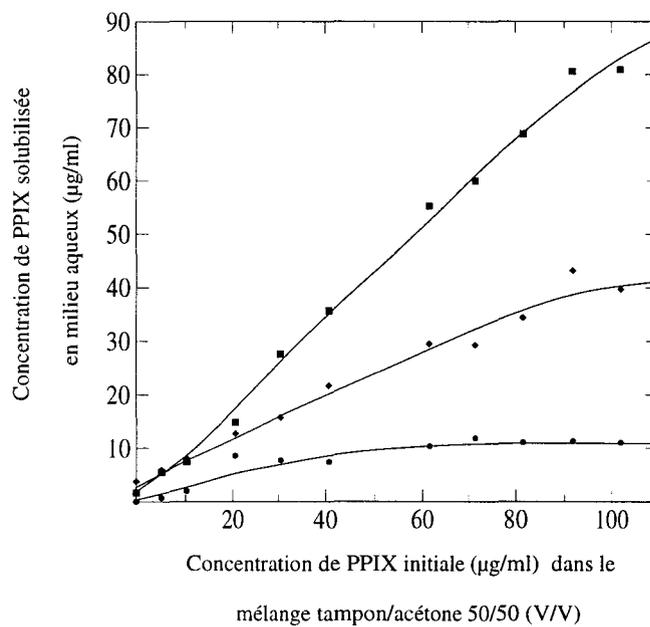


FIGURE 53 – Courbes de solubilisation de la protoporphyrine IX. (●) solubilisation témoin de porphyrine sans hydrolysate, (◆) solubilisation de la porphyrine par l'hydrolysate en phase homogène, (■) solubilisation de la porphyrine par l'hydrolysate en phase hétérogène. La PPIX est solubilisée dans un milieu hydro-organique acétate d'ammonium 20 mM à pH 7/acétone 50/50 (V/V). L'évaporation de l'acétone sous vide provoque la formation du complexe soluble entre les peptides de l'hydrolysate et la PPIX.

## Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence une modification très nette de la sélectivité de la réaction protéasique. L'hydrolyse du substrat adsorbé sur un support mène à un hydrolysats dont la teneur en gros peptides hydrophobes est fortement augmentée. Le mécanisme réactionnel étant d'après le modèle de Linderstroëm-Lang un mécanisme de type one by one dans les deux cas, ces différences ne peuvent provenir que d'une protection due à la résine.

Grâce au suivi cinétique du peptide marqueur 1-14 $\alpha$ , nous avons pu déterminer qu'il se comporte en peptide intermédiaire dans l'hydrolyse en solution, puisqu'il disparaît totalement. Dans l'hydrolyse en phase hétérogène en revanche, nous avons pu mettre en évidence la stabilisation de ce peptide intermédiaire, produit en quantité double par rapport à l'hydrolyse en solution et qui reste présent à la fin de la réaction, si celle-ci est réellement terminée. L'existence de deux sites de coupure potentiels de la chymotrypsine en position 2 et 9 de ce peptide nous incite à penser que cette portion est adsorbée sur le support, donc hors d'atteinte de l'enzyme. L'environnement hydrophobe et positif de ces sites de coupure protégés est en accord avec le modèle de fonctionnement proposé dans cette thèse.

La dernière partie de ce chapitre a montré grâce à un test de transport de la PPIX que l'hydrolysats en phase hétérogène a été enrichi en peptides transporteurs de molécules insolubles. En effet, sa capacité de transport de la porphyrine est trois fois meilleure que celle de l'hydrolyse en phase homogène, ce qui démontre clairement l'orientation de l'hydrolyse en phase hétérogène vers la production de peptides hydrophobes et cationiques.

## Conclusion

Dans cette seconde partie, nous avons tenté de modifier la sélectivité de la réaction protéolytique. La technique choisie a consisté à adsorber par interactions faibles, la protéine substrat sur un support, afin de créer des contraintes sur la réaction protéasique.

Lors du premier chapitre, nous avons abordé la mise en oeuvre de ces hydrolyses. Les conditions d'adsorption de l'hémoglobine sur le support ont été déterminées, et ont conditionné le choix du pH d'hydrolyse. Ainsi, l'hydrolyse n'a pas eu lieu au pH optimum des deux enzymes utilisées, car l'hémoglobine fixée par des interactions faibles est alors libérée. Ensuite, nous avons déterminé que la chymotrypsine s'adsorbe faiblement sur le support (environ 20%) et que l'enzyme libre est active car le SDS utilisé pour dénaturer le substrat est capté par l'hémoglobine et par le support. L'hémoglobine semble être dénaturée par l'adsorption sur le support puisque l'hydrolyse en absence de SDS mène à la disparition totale des chaînes contrairement à l'hydrolyse en solution. Enfin, nous avons déterminé les conditions optimales de récupération de l'ensemble des peptides de l'hydrolysats réalisé en phase hétérogène, notamment par l'inhibition ou la dénaturation de l'enzyme.

Dans un deuxième chapitre, nous avons entrepris les hydrolyses en phase homogène et en phase hétérogène par l'endoprotéinase Glu-C qui est une enzyme très spécifique. L'étude de l'hydrolysats en solution a permis de mieux comprendre la spécificité de cette protéase. En effet, même si en tampon phosphate à pH 6 elle hydrolyse les liaisons impliquant un acide glutamique et un acide aspartique, les cinétiques semblent être différentes dans les deux cas. L'enzyme hydrolyse de façon préférentielle les liaisons impliquant un acide glutamique. Un autre phénomène augmente les différences de cinétique, il s'agit de l'acide aminé en position P'<sub>1</sub>. Les liaisons impliquant un acide aminé hydrophobe sembleraient être résistantes à la protéolyse. La position P'<sub>1</sub> n'est pas la seule à devoir être prise en compte, les acides aminés en position P'<sub>2</sub> et P'<sub>3</sub> peuvent atténuer ou renforcer cet effet. Pratiquement toutes les liaisons impliquant un acide glutamique qui étaient hydrolysées totalement en solution, sont hydrolysées partiellement lorsque l'hémoglobine est adsorbée. Nous avons même noté le cas de sites potentiels non hydrolysés en solution et hydrolysés partiellement en présence du support, démontrant une modification de sélectivité de la réaction protéasique. La protection partielle de certains sites semble être due à l'adsorption de fragments hydrophobes ou positifs ou les deux sur le support. L'hydrolyse améliorée de certains sites semble par contre indiquer un nivellement des vitesses d'hydrolyse, certaines, précédemment favorisées sont ralenties et d'autres délaissées deviennent favorisées.

Le troisième chapitre de cette partie a été consacré à l'hydrolyse par une protéase peu spécifique, la chymotrypsine. L'hydrolysats final est fortement modifié par l'adsorption de l'hémoglobine sur le support comme l'ont montré les chromatogrammes. De plus, l'étude de la cinétique a permis de révéler que l'hydrolyse en phase hétérogène est fortement ralentie par rapport à l'hydrolyse en phase homogène par les contraintes diffusionnelles, mais sans doute aussi par l'encombrement stérique. Grâce au suivi du peptide marqueur 1-14 $\alpha$ , nous avons montré la protection de certains sites potentiels d'hydrolyse en phase hétérogène. Enfin, la capacité maximale de transport de la

PPIX est fortement améliorée (x 3) par l'hydrolyse de l'hémoglobine sur le support, ce qui laisse présumer un enrichissement de l'hydrolysate en peptides recherchés.



## Conclusion



L'objectif de ce travail de thèse était de mettre au point des méthodes pour isoler et préparer à partir d'hydrolysats peptidiques d'hémoglobine bovine des peptides amphiphiles transporteurs de la protoporphyrine IX. Ainsi, à partir d'un hydrolysats peptidique d'hémoglobine préparé à l'échelle pilote, nous avons isolé un peptide amphiphile à l'échelle préparative en associant un fractionnement par chromatographie d'échange d'ions, un dessalage par électrodialyse et une chromatographie de phase inverse. Nous avons dans une autre approche montré qu'il était possible de modifier la sélectivité de la réaction protéasique en menant la catalyse en phase hétérogène avec l'hémoglobine adsorbée à la surface d'un support hydrophobe anionique. Cette approche a permis d'orienter l'hydrolyse de l'hémoglobine vers l'obtention de populations peptidiques nouvelles ayant une capacité de transport accrue de la protoporphyrine IX.

L'association de la chromatographie d'échange d'ions, de l'électrodialyse et de l'HPLC de phase inverse présente plusieurs intérêts pour la purification d'un peptide amphiphile. La chromatographie d'échange d'ions a permis le traitement de grosses quantités d'échantillons et de fractionner l'hydrolysats peptidique selon la charge des peptides. L'inconvénient majeur de cette technique étant l'introduction de sels dans les fractions récoltées; le couplage à une électrodialyse à l'échelle pilote a permis de recouvrer des fractions peptidiques non contaminées en sels sans perte notable de matériel. Enfin, la CLHP de phase inverse a permis de purifier un peptide en une seule étape à partir d'une fraction précédemment récoltée contenant des peptides basiques, et de le sélectionner selon son hydrophobicité.

Cette technique a permis l'isolement du peptide 1-23  $\alpha$  composé des 23 premiers acides aminés de la chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine bovine. En solution diluée, le peptide 1-23 $\alpha$  sous forme de monomère interagit majoritairement avec un dimère de PPIX, avec une constante d'association proche de  $2 \cdot 10^4 \text{M}^{-1}$ . Nous avons estimé une capacité maximale de transport de la PPIX par le peptide à 215  $\mu\text{g}$  par mg de peptide, soit un rapport molaire PPIX-peptide proche de 1. Dans ce complexe, la PPIX est associée sous forme de polymères. Nous ne sommes donc pas parvenu à réaliser un complexe dans lequel la PPIX serait à l'état de monomère. Cependant, dans les complexes obtenus avec une stoechiométrie PPIX-peptide largement inférieur à 1, la PPIX semble peu polymérisée. Il serait donc intéressant d'entreprendre des recherches sur la formation du complexe en faisant varier la concentration en peptide pour une concentration constante et faible en PPIX. Nous avons pu également quantifier, par une constante d'affinité, la capacité de la PPIX à interagir avec une membrane lipidique, et comparé cette affinité avec celle du complexe. Le résultat semble indiquer que la PPIX a une affinité plus élevée pour les lipides que pour le peptide. Cependant, il serait intéressant, pour compléter cette étude, de déterminer si la PPIX du complexe peptide-PPIX peut être transférée à une membrane lipidique représentant une cellule.

Nous avons pu montrer, dans la deuxième partie de notre travail, que l'adsorption de l'hémoglobine à l'état dénaturé sur un support hydrophobe anionique modifie radicalement la sélectivité de la réaction protéasique aussi bien avec une protéase spécifique que de spécificité plus large. Ainsi, l'hydrolyse en phase hétérogène de l'hémoglobine par l'endoprotéinase Glu-C, conduit à une modification nette de la sélectivité puisque 40 % des peptides identifiés sont différents de ceux rencontrés

lorsque la réaction est menée en phase homogène avec l'hémoglobine dénaturée. Pourtant, l'hémoglobine présente peu de liaisons potentiellement hydrolysables sur lesquelles le support peut interférer, puisque l'endoprotéinase Glu-C est une protéase très spécifique. Malgré cette restriction, nous avons noté par l'analyse des coupures effectuées dans les deux systèmes, un ralentissement de l'hydrolyse en certains sites. Plus étonnant, il a été observé que certaines liaisons non hydrolysées par la protéase en phase homogène, le sont en phase hétérogène lorsque l'hémoglobine est adsorbée sur le support. De nombreuses liaisons hydrolysées totalement en solution deviennent partiellement hydrolysées en phase hétérogène. La protection générée par le support n'est donc pas totale. Ce fait s'explique par la nature même des sites hydrolysables. L'endoprotéinase Glu-C hydrolyse au niveau des acides glutamiques et aspartiques qui sont tous deux chargés négativement, comme le support. Cette charge négative diminuerait l'efficacité de l'adsorption sur le support au voisinage des liaisons hydrolysables, ce qui entraînerait seulement un ralentissement de l'hydrolyse de ces liaisons. Il est remarquable tout de même de constater qu'avec cette protéase très spécifique, les populations peptidiques obtenues en fin d'hydrolyse soient très modifiées par la catalyse hétérogène.

Nous avons réalisé des études complémentaires avec une enzyme moins spécifique, la chymotrypsine, qui n'hydrolyse pas les liaisons impliquant des acides aminés négatifs. Avec cette enzyme, pour laquelle le nombre de liaisons potentiellement hydrolysables est plus élevé, les hydrolysats peptidiques obtenus par catalyse en phase homogène et hétérogène sont fondamentalement différents aussi bien du point de vue de leur profil chromatographique en phase inverse que de leurs propriétés physico-chimiques. Il a été montré que l'hydrolysats obtenu en catalyse hétérogène a trois fois plus de capacité de transport de la porphyrine que l'hydrolysats obtenu en phase homogène. Ainsi, par l'adsorption de l'hémoglobine sur le support, nous avons enrichi l'hydrolysats en peptides qui possèdent des propriétés complémentaires du support, soit en peptides basiques et hydrophobes transporteurs de la PPIX. Nous avons pu montrer avec un peptide marqueur (1-14 $\alpha$ ) que ces changements de sélectivité sont dues à une stabilisation de peptides intermédiaires par adsorption sur le support qui, en solution, sont rapidement hydrolysés par la chymotrypsine.

Dans l'hydrolyse en phase hétérogène, le support devrait par interactions faibles protéger certains sites potentiellement hydrolysables. C'est effectivement le cas, nous avons noté dans l'hydrolyse par l'endoprotéinase Glu-C une protection des liaisons contenues dans des fragments hydrophobes et/ou positifs de l'hémoglobine. Nous avons même remarqué que l'adsorption d'un seul côté de la liaison permettait une protection. L'analyse du peptide marqueur 1-14  $\alpha$  basique et positif obtenu lors de l'hydrolyse par la chymotrypsine, démontre le même phénomène de protection, puisque les deux sites de coupures potentiels qu'il renferme ne sont pas hydrolysés en phase hétérogène. Cependant, l'effet global sur la sélectivité de la réaction est plus complexe puisque nous avons noté en plus des sites protégés, des sites plus facilement hydrolysés en phase hétérogène. Il semblerait que l'enzyme hydrolyse mieux ces liaisons normalement défavorisées simplement parce qu'elles sont accessibles et donc plus facilement hydrolysable que les autres en phase hétérogène. Afin de confirmer l'intérêt de cette voie de recherche, nous envisageons l'analyse de tous les peptides présents dans les hydrolysats chymotrypsiques en phases homogène et hétérogène.

Si l'analyse des résultats confirme une modification très nette de la sélectivité de la réaction enzymatique, il serait intéressant d'appliquer ce système de catalyse à l'hydrolyse d'autres protéines. Nous pourrions éliminer le SDS qui nuit aux analyses chromatographiques car la protéine étant dénaturée à la surface du support, sa présence n'a plus lieu d'être.

Nous avons montré qu'il était possible de faciliter la préparation de peptides amphiphiles ayant de l'affinité pour la protoporphyrine IX en modifiant la sélectivité d'une protéase par adsorption de l'hémoglobine sur un support ayant des propriétés physico-chimiques semblables à la porphyrine (hydrophobe et anionique). L'intérêt de ce résultat dépasse largement le cas de l'hémoglobine qui peut être ici considérée comme un modèle. Il serait donc possible avec une même protéase et une même protéine de moduler la composition des hydrolysats peptidiques obtenus en menant la catalyse en phase hétérogène avec des support fonctionnalisés. Ces systèmes pourraient avoir un intérêt en biotechnologie agro-alimentaire car ils permettraient d'orienter la sélectivité de protéases conventionnelles afin de préparer des hydrolysats peptidiques avec des propriétés fonctionnelles nouvelles (pouvoir émulsifiant, foisonnant...). De même, dans le cadre de la préparation de nouveaux peptides ou fractions avec des propriétés spécifiques (peptides à activité biologique, transporteurs de nutriments ...) à destination de l'alimentation fonctionnelle, de la nutrition thérapeutique ou de la diététique; cette approche permettrait d'enrichir les hydrolysats en de tels peptides rendant ainsi plus accessible leur préparation à plus grande échelle.



## Bibliographie

- [Adler-Nissen et Olsen 79] J. Adler-Nissen et H. S. Olsen. – *The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein*, Washington D.C., American Chemical Society Symposium series 92. – chap. 7, 125 (1979).
- [Aichun et coll. 90] D. Aichun, H. Ping et S. Winslow. – *Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra*. *Biochemistry*, **29**, 3303 (1990).
- [Ando et coll. 93] S. Ando, H. Nishikawa, H. Takiguchi, S. Lee et G. Sugihara. – *Antimicrobial specificity and hemolytic activity of cyclized basic amphiphilic  $\beta$ -structural model peptides and their interactions with phospholipid bilayers*. *Biochem. Biophys. Acta*, **1147**, 42 (1993).
- [Aubes-Dufau et coll. 95] I. Aubes-Dufau, J. Capdevielle, J. L. Seris et D. Combes. – *Bitter peptide from hemoglobin hydrolysate: isolation and characterization*. *FEBS Lett.*, **364**, 115 (1995).
- [Aubes-Dufau et Combes 97] I. Aubes-Dufau et D. Combes. – *Effect of different proteases on bitterness of hemoglobin hydrolysates*. *Appl. Biochem. Biotech.*, **67**, 127 (1997).
- [Bachor et coll. 88] R. Bachor, C. R. Shea, R. Gillies et T. Hasan. – *Photosensitized destruction of human bladder carcinoma cells treated with chlorin e6-conjugated microspheres*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 1580 (1988).
- [Barel et coll. 86] A. Barel, J. P. Perrin, A. Pagnan et S. Biffanti. – *Role of high-, low and very low lipoproteins in the transport and tumor-delivery of hematoporphyrin*. *Cancer Lett.*, **32**, 145 (1986).
- [Barkhudaryan et coll. 93] N. Barkhudaryan, J. Kellerman, A. Galoyan et F. Lottspeich. – *High molecular weight aspartic endopeptidase generates a coronar constrictory peptide from  $\beta$  chain of hemoglobin*. *FEBS Lett.*, **329**, 215 (1993).
- [Beaudet et coll. 74] R. Beaudet, S. A. Saheb et G. Drapeau. – *Structural heterogeneity of the protease isolated from several strains of Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, **249**, 6468 (1974).
- [Bellamy et coll. 92] W. Bellamy, M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, K. Kawase et M. Tomita. – *Identification of the bactericidal domain of lactoferrin*. *Biochem. Biophys. Acta*, **1121**, 130 (1992).
- [Bellamy et coll. 93] W. Bellamy, H. Wakabayashi, M. Takase, K. Kawase, B. Shimamura et M. Tomita. – *Killing of Candida albicans by lactoferricin B*,

- a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin.* Med. Microbiol. Immunol., **182**, 97 (1993).
- [Bidleymeyer et coll. 84] B. A. Bidleymeyer, S. A. Cohen, T. L. Tarvin, J. R. Napier et W. S. Hancock. – *Rapid analysis on wild-type and mutant subtilisin-catalyzed hydrolysis.* J. Chromato., **336**, 93 (1984).
- [Boman et coll. 91] H. G. Boman, I. Faye, G. H. Gudmundson, J. Y. Lee et D. A. Lidholm. – *Cell-free immunity in cecropia.* Eur. J. Biochem., **201**, 23 (1991).
- [Bouhallab et Touzé 95] S. Bouhallab et C. Touzé. – *Continuous hydrolysis of caseinomacropptide in a membrane reactor: kinetic study and gram-scale production of antithrombotic peptides.* Lait, **75**, 251 (1995).
- [Bourdon et coll. 96] O. Bourdon, J. Blais, J. Bolard, V. Vonarx, L. Morlet, T. Patrice, C. Bedel, N. Cempel et D. Guillochon. – *Hydrophobic photosensitisers delivery to tumor tissues by an amphiphilic peptide.* Analytical use of fluorescent probes in oncology, **39**, 363 (1996).
- [Bourhim et coll. 90] A. Bourhim, S. Czernecki et P. Krausz. – *Glycosylated hemo-toporphyrins: a new approach in cancer phototherapy.* J. Carbohyd. Chem., **9**, 761 (1990).
- [Boyer 71] Paul. D. Boyer, editor. – *The enzymes, Hydrolysis peptide bonds.* – New York and London, Academic Press, third edition, volume III (1971).
- [Brantl et coll. 79] V. Brantl, C. Gramsch, F. Lottspeich, R. Mertz, K. H. Jarger et A. Herz. – *Novel opioid peptides derived from casein ( $\beta$ -casomorphins). Isolation from bovine casein peptone.* Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem, **360**, 1211 (1979).
- [Brasseur et coll. 91] N. Brasseur, O. Brault et P. Couvreur. – *Adsorption of hemo-toporphyrin onto polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: carrier capacity and drug release.* Int. J. Pharm, **170**, 129 (1991).
- [Brault 90] D. Brault. – *Physical chemistry of porphyrins and their interactions with membranes: the importance of pH.* J. of Photochem. Photobiol., B: Biology, **6**, 79 (1990).
- [Breddam et Meldal 92] K. Breddam et M. Meldal. – *Substrate preferences of glutamic-acid-specific endopeptidases assessed by synthetic peptide substrates based on intramolecular fluorescence quenching.* Eur. J. Biochem., **206**, 103 (1992).
- [Brown et coll. 76] S. B. Brown, M. Shillcock et P. Jones. – *Equilibrium and kinetics studies of the aggregation of porphyrins in aqueous solution.* Biochem. J., **153**, 279 (1976).
- [Cempel et coll. 94] N. Cempel, J. M. Piot et D. Guillochon. – *Preparation of photodynamic hydrolysates from bovine hemoglobin.* J. Agr. Food Chem., **42** (1994).
- [Cempel et coll. 95] N. Cempel, J. M. Aubry, J. M. Piot et D. Guillochon. – *Isolation from bovine haemoglobin of a peptide that might be used as a potential hydrophobic photosensitizer carrier.* Biotechnol. Appl. Biochem., **21**, 287 (1995).

- [Chersi et coll. 90] A. Chersi, M. L. Sezzi, T. F. Romano, M. Evangelista et A. Nista. – *Preparation and utilization of fluorescent synthetic peptides*. Biochem. Biophys. Acta, **1034**, 333 (1990).
- [Chobert et coll. 89] J. M. Chobert, M. Z. Sitohy et J. Whitaker. – *Solubility and emulsifying properties of caseins modified enzymatically by Staphylococcus aureus V8 protease*. J. Food Biochem., **13**, 335 (1989).
- [Cleveland et coll. 77] D. W. Cleveland, S. G. Fisher, M. W. Kirschber et U. K. Laemmli. – *Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis*. J. Biol. Chem., **252**, 1102 (1977).
- [Cordano et Cook 85] A. Cordano et D. A. Cook. – *Preclinical and clinical evaluation with casein hydrolysate products*, New York, Marcel Dekker, inc. – chap. 9, 119 (1985).
- [Crimmins et coll. 89] D. L. Crimmins, R. S. thoma, D. W. McCourt et B. D. Schwartz. – *Strong-cation-exchange sulfoethyl aspartamide chromatography for peptide mapping of Staphylococcus aureus V8 protein digests*. Anal. Biochem., **176**, 255 (1989).
- [Crosby et coll. 54] W. H. Crosby, J. I. Munn et F. W. Furth. – *Standardizing a method for clinical hemoglobinometry*. U.S. Armed Forces Med. J., **5**, 693 (1954).
- [Dalgalarondo et coll. 95] M. Dalgalarondo, E. Dufour, J.M. Chobert, C. Bertrand-Harb et T. Haertlé. – *Proteolysis of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\beta$ -casein by pepsin in ethanolic media*. Int. Dairy Journal, **5**, 1 (1995).
- [Degrado et coll. 80] W. F. DeGrado, F. J. Kezdy et E. T. Kaiser. – *Design, synthesis and characterization of a cytotoxic peptide with Melittin-like activity*. J. Am. Chem. Soc., **103**, 679 (1980).
- [Dive et coll. 89] D. Dive, J. M. Piot, F. Sannier, D. Guillochon, P. Charet et S. Lutrat. – *Use of hemoglobin enzymic hydrolysates, prepared on a pilot plant scale, as a nitrogen source for the cultivation of three species of tetrahymena*. Enzyme Microb. Technol., **11**, 165 (1989).
- [Dougherty 93] T. Dougherty. – *Photodynamic therapy*. Photochem. Photobiol., **58**, 895 (1993).
- [Drapeau et coll. 72] G. Drapeau, Y. Boily et J. Houmar. – *Purification and properties of an extracellular protease of Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem., **247**, 6720 (1972).
- [Eisenberg et coll. 82] D. Eisenberg, R. Weiss et T. C. Terwilliger. – *The helical hydrophobic moment: A measure of the amphiphilicity of a helix*. Nature, **299**, 371 (1982).
- [Ellison III et coll. 88] R. T. Ellison III, T. J. Giehl et F. M. LaForce. – *Damage of the outer membrane of enteric Gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin*. Infect. Immunity, **56**, 2774 (1988).
- [Erickson 81] C. Erickson. – *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).

- [Fairley 38] N. H. Fairley. – *Methaemalbumine (pseudo-methaemoglobin)*. Nature, **142**, 1156 (1938).
- [Froidevaux 98] R. Froidevaux. – *Hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine en solvants organiques biphasiques: études préliminaires sur la préparation de peptides opioïdes dans un réacteur ouvert*. Mémoire de DEA GEBM, Université des Sciences et Techniques de Lille (1998).
- [Gubicza et Kelemen-Horvath 93] L. Gubicza et I. Kelemen-Horvath. – *Effect of water-mimicking additives on the synthetic activity and enantioselectivity in organic solvents of a Candida cylindracea lipase*. Journal of Molecular Catalysis, **84**, L27 (1993).
- [Gunther 79] R. C. Gunther. – *Chemistry and characteristics of enzyme-modified Whipping proteins*. J. Am. Oil. Chemist' Soc., **56**, 345 (1979).
- [Gupta 91] M. N. Gupta. – *Thermostabilization of proteins*. Biotechnol. Appl. Biochem., **14**, 1 (1991).
- [Hamblin et Newman 94] M. Hamblin et E. Newman. – *Photosensitizer targeting in photodynamic therapy I. Conjugates of haematoporphyrin with albumin and transferrin*. J. Photochem. Photobiol. B-Biol., **26**, 45 (1994).
- [Heide et coll. 64] K. Heide, H. Haupt, K. Störiko et H. E. Schultze. – *On the heme binding capacity of hematopeixin*. Clin. Chim. Acta, **10**, 460 (1964).
- [Hertmanni et coll. 91] P. Hertmanni, E. Picque, D. Thomas et V. Larreta-Garde. – *Modulation of proteases specificity by a change in the enzyme microenvironment. Selectivity modification on a model substrate, purified soluble proteins and gluten*. FEBS Lett., **279**, 123 (1991).
- [Hirose et coll. 92] Y. Hirose, K. Kariya, I. Sasaki, Y. Kurono, H. Ebiike et K. Achiwa. – *Drastic solvent effect on lipase-catalysed enantioselective hydrolysis of prochiral 1,4-dihydropyridines*. Tetrahedron Lett., **47**, 7157 (1992).
- [Houen et Sando 91] G. Houen et T. Sando. – *Peptide mapping in sodium dodecyl sulfate-containing buffers: control of proteolytic cleavage by organic solvent*. Anal. Biochem., **193**, 186 (1991).
- [Houmard 76] J. Houmard. – *Kinetic investigation of the Staphylococcal protease-catalysed hydrolysis of synthetic substrates*. Eur. J. Biochem., **68**, 621 (1976).
- [Houmard et Drapeau 72] J. Houmard et G. Drapeau. – *Staphylococcal protease: a proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **69**, 3506 (1972).
- [Ikeda et coll. 91] S. Ikeda, T. Nezu et G. Ebert. – *Induced CD and interaction of some porphyrin derivatives with  $\alpha$ -helical polypeptides in aqueous solutions*. Biopolymers, **31**, 1257 (1991).
- [Ivanov et coll. 97] V. T. Ivanov, A. A. Karelin, M.M. Philippova, I. V. Nazimov et V. Z. Pletnev. – *Hemoglobin as a source of endogenous bioactive peptides: the concept of tissue-specific peptide pool*. Biopolymers, **43**, 171 (1997).
- [Iyer et Acharya 87] K. S. Iyer et A. S. Acharya. – *Conformational studies of  $\alpha$ -globin in 1-propanol: propensity of the alcohol to limit the sites of proteolytic cleavage*. Proc. Natl. Acad. Sci., **84**, 7014 (1987).

- [Jori et coll. 84] G. Jori, M. Beltramini, E. Reddi, B. Salvato, A. Pagnan, L. Ziron, L. Tomio et T. Tsanov. – *Evidence for a major role of plasma lipoproteins as hematoporphyrin carriers in vivo*. *Cancer Lett.*, **24**, 291 (1984).
- [Katagiri et coll. 87] M. Katagiri, K. Tsutsui, T. Yamano, Y. Shimonishi et F. Ishibashi. – *Interaction of heme with synthetic peptide mimicking the putative heme-binding site of histidine-rich glycoprotein*. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **149**, 1070 (1987).
- [Kawasaki et Suzuki 90] H. Kawasaki et K. Suzuki. – *Separation of peptides dissolved in a sodium dodecyl sulfate solution by reversed-phase liquid chromatography: removal of sodium dodecyl sulfate from peptides using an ion-exchange precolumn*. *Anal. Biochem.*, **186**, 264 (1990).
- [Kleinmann et coll. 91] R. E. Kleinmann, S. Bahna, G. F. Powel et H. A. Sampson. – *Use of infant formulas in infants with cow milk allergy*. *Pediatr. Allergy Immunol.*, **4**, 146 (1991).
- [Konigsberg et Hill 62] W. Konigsberg et R. J. Hill. – *The structure of human hemoglobin V. The digestion of the  $\alpha$  chain of human hemoglobin with pepsin*. *J. Biol. Chem.*, **237**, 31516 (1962).
- [Kosciarz et coll. 98] E. Kosciarz, F. Rofidal, I. Dossou-Yovo, D. Vercaigne-Marko, N. Nedjar-Arroume, P. Dhulster et D. Guillochon. – *Fractionation at pilot plant scale of an haemoglobin hydrolysate by strong anionic exchange chromatography: application to the preparation of an amphiphilic peptide*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **71**, 35 (1998).
- [Kuzelova et Brault 94] K. Kuzelova et D. Brault. – *Kinetic and equilibrium studies of porphyrin interactions with unilamellar lipidic vesicles*. *Biochemistry*, **33** (1994).
- [Lebrun et coll. 98] F. Lebrun, A. Bazus, P. Dhulster et D. Guillochon. – *Solubility of heme in heme-iron enriched bovine hemoglobin hydrolysates*. *J. Agr. Food Chem.*, **46**, 5017 (1998).
- [Lee et coll. 86] S. Lee, H. Mihara, H. Aoyagai, T. Kato, N. Izumiya et N. Yamasaki. – *Relationship between antimicrobial activity and amphiphilic property of basic model peptides*. *Biochem. Biophys. Acta.*, **862**, 211 (1986).
- [Lee et coll. 94] S. Lee, T. Tanaka, K. Anzai, Y. Kirino, H. Aoyagi et G. Sugihara. – *Two mode ion channel induced by interaction of acidic amphiphatic  $\alpha$ -helical peptides with lipid bilayers*. *Biochem. Biophys. Acta*, **1191**, 181 (1994).
- [Lehrer et coll. 93] R.I. Lehrer, A. K. Lichtenstein et T. Ganz. – *Defensins/ Antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells*. *Annu. Rev. Immunol.*, **10**, 105 (1993).
- [Leke Lokombe 94] A. Leke Lokombe. – *Valorisation d'un hydrolysate de protéine obtenu à partir de l'hémoglobine bovine. Etudes expérimentales, immunochimiques, et essais cliniques*. Thèse de Doctorat, Université de Technologie de Compiègne (1994).
- [Lignot 98] B. Lignot. – *Effet de solvant sur la sélectivité de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine et sur l'obtention de peptides à activité biologique*. Thèse de Doctorat, Université de Technologie de Compiègne (1998).

- [Lignot et coll. 99] B. Lignot, R. Froidevaux, N. Nedjar-Arroume et D. Guillochon. – *Solvent effect on kinetics of appearance of hemorphins in the course of peptic hydrolysis of bovine hemoglobin*. Biotechnol. Appl. Biochem., **29**, 25 (1999).
- [Linderstroëm-Lang 52] K. Linderstroëm-Lang. – *Proteins and enzymes. III. The initials stages in the breakdown of proteins by enzymes.*, California, Stanford University Press, volume 7. – 53 (1952).
- [Mamoru et coll. 91] T. Mamoru, W. Bellamy, M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi et K. Kawase. – *Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin*. J. Dairy Sci., **74**, 4137 (1991).
- [Maracek et coll. 73] Z. Maracek, M. Jirsa et J. Korinek. – *This binding of protoporphyrin to serum proteins*. Clin. Chim. Acta, **45**, 409 (1973).
- [Margalit et coll. 83] R. Margalit, N. Shaklai et S. Cohen. – *Fluorimetric studies on the dimerization equilibrium of protoporphyrin IX and its haemato derivative*. Biochem. J., **209**, 547 (1983).
- [Mazière et coll. 91] J. C. Mazière, P. Morlière et R. Santus. – *New trends in photobiology. The role of the low density lipoprotein receptor pathway in the delivery of lipophilic photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours*. J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **8**, 351 (1991).
- [Miclo et coll. 95] L. Miclo, E. Perrin, A. Driou, M. Mellet et G. Linden. – *Determination of the ratios of the aromatic amino acid residues by first- or second-derivative UV spectrometry for a simple characterization of peptides*. Int. J. Peptide Protein Res., **46**, 186 (1995).
- [Moan et Berg 92] J. Moan et C. Berg. – *Photochemotherapy of cancer: experimental research*. Photochem. Photobiol., **55**, 931 (1992).
- [Nitzan et coll. 87] Y. Nitzan, H. Ladan et Z. Malik. – *Growth-inhibitory effect of hemin on staphylococci*. Curr. Microbiol., **14**, 279 (1987).
- [Nyberg et coll. 86] F. Nyberg, C. Pernow, U. Moberg et R. B. Eriksson. – *High-performance liquid chromatography and diode-array detection for the identification of peptides containing aromatic amino acids in studies of endorphin-degradation activity in human cerebrospinal fluid*. J. of Chromatography, **359**, 541 (1986).
- [Oseroff et coll. 87] A. Oseroff, G. Ara, D. Ohuoha, J. Aprille, J. C. Bommer, M. L. Yarmush, J. Foley et L. Cincotta. – *Strategies for selective cancer photochemotherapy: antibody-targeted and selective carcinoma cell photolysis*. Photochem. Photobiol., **46**, 83 (1987).
- [Piot et coll. 88] J. M. Piot, D. Guillochon, D. Leconte et D. Thomas. – *Application of ultrafiltration to the preparation of defined hydrolysates of bovine haemoglobin*. J. Chem. Tech. Biotechnol., **42**, 147 (1988).
- [Piot et coll. 92a] J. M. Piot, Q. Zhao, D. Guillochon, G. Ricard et D. Thomas. – *Isolation and characterisation of a bradykinin-potentiating peptide from a bovine peptic hemoglobin hydrolysate*. FEBS Lett., **299**, 75 (1992).
- [Piot et coll. 92b] J. M. Piot, Q. Zhao, D. Guillochon, G. Ricard et D. Thomas. – *Isolation and characterisation of two opioid peptides from a bovine hemoglobin peptic hydrolysate*. Biochem. Biophys. Res. Com., **189**, 101 (1992).

- [Pispisa et coll. 94] B. Pispisa, M. Venanzi, A. Palleschi et G. Zanotti. – *Intramolecular electronic energy transfer between naphthalene and protoporphyrin chromophores bound to sequential peptides*. *Macromolecules*, **27** (1994).
- [Rupley et coll. 83] J. A. Rupley, E. Gratton et G. Careri. – *Water and globular proteins*. *Trends Biochem. Sci.*, **8**, 18 (1983).
- [Ryu et Dordick 92] K. Ryu et J. S. Dordick. – *How do organic solvents affect peroxidase structure and function*. *Biochemistry*, **31**, 2588 (1992).
- [Sakurai et coll. 88] T. Sakurai, A. L. Margolin, A. J. Russell et A. M. Klibanov. – *Control of enzyme enantioselectivity by the reaction medium*. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 7236 (1988).
- [Schlimme et Meisel 95] E. Schlimme et H. Meisel. – *Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects*. *Die Nahrung*, **39**, 1 (1995).
- [Schmidt et coll. 95] D.G Schmidt, R. J. G. M. Meier, C. J. Slangen et E. C. H. Van Beresteijn. – *Raising the pH of the pepsin-catalysed hydrolysis of bovine whey proteins increases the antigenicity of the hydrolysates*. *Clin. Experiment. Allergy*, **25**, 1007 (1995).
- [Seetharama et coll. 92] A. A. Seetharama, I. K. Subramonia, G. Sahni, K. M. Khandke et B. N. Manjula. – *Restriction in the conformational flexibility of apoproteins in the presence of organic cosolvents: a consequence of the formation of "native-like conformation"*. *J. Protein Chem.*, **11**, 527 (1992).
- [Sessa et coll. 69] G. Sessa, J. H. Freer, G. Colacicco et G. Weissmann. – *Interaction of a lytic polypeptide, melittin, with lipid membrane*. *J. Biol. Chem.*, **244**, 3575 (1969).
- [Sorensen et coll. 91] S. B. Sorensen, T. L. Sorensen et K. Breddam. – *Fragmentation of proteins by S. Aureus strain V8 protease. Ammonium bicarbonate strongly inhibits the enzyme but does not improve the selectivity for glutamic acid*. *FEBS Lett.*, **294**, 195 (1991).
- [Steiner et coll. 81] H. Steiner, D. Hultmark, A. Engstrom, H. Bennich et H. G. Boman. – *Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity*. *Nature*, **292**, 246 (1981).
- [Tawaki et Klibanov 92] S. Tawaki et A. M. Klibanov. – *Inversion of enzyme enantioselectivity mediated by the solvent*. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 1882 (1992).
- [Tchorbanov et Iliev 93] B. Tchorbanov et I. Iliev. – *Limited enzymic hydrolysis of casein in the presence of ethanol*. *Enzyme Microb. Technol.*, **15**, 974 (1993).
- [Ueji et coll. 92] S. Ueji, R. Fujino, N. Okubo, T. Miyazawa, S. Kurita, M. Kitadani et A. Muromatsu. – *Solvent-induced inversion of enantioselectivity in lipase-catalysed esterification of 2-phenoxypropionic acids*. *Biotechnol. Lett.*, **14** (1992).
- [Venkatesch et coll. 96] B. Venkatesch, R. Jayakumar, R. P. Pandian et P. T. Manoharan. – *Surface active peptide-mediated porphyrin aggregation*. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **223**, 390 (1996).
- [Verger et coll. 73] R. Verger, M. C E. Mieras et G. H. De Haas. – *Action of phospholipase A at interfaces*. *J. Biol. Chem.*, **248**, 4023 (1973).

- [Waynes 86] L. Waynes. – *Association of hydrophobic substances with hemin (characterisation of the reverse type I binding spectrum and its relationship to cytochrome P-450)*. *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 4443 (1986).
- [Welinder 88] K. Gjesing Welinder. – *Generation of peptides suitable for sequence analysis by proteolytic cleavage in reverse-phase high-performance liquid chromatography solvents*. *Anal. Biochem.*, **174**, 54 (1988).
- [Wescott et Klibanov 93] C. R. Wescott et A. Klibanov. – *Solvent variation inverts substrate specificity of an enzyme*. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 1629 (1993).
- [Wu et coll. 91] S.H. Wu, F.Y. Chu et K.T. Wang. – *Reversible enantioselectivity of enzymatic reactions by media*. *Bioorg. Medicinal Chem. Letter*, **1**, 339 (1991).
- [Yang et coll. 96] T. Yang, D. R. Horejsh, K. J. Mahan, E. J. Zaluzec, T. J. Watson et D. A. Gage. – *Mapping cross-linking sites in modified proteins with mass spectrometry: an application to cross-linked hemoglobins*. *Anal. Biochem.*, **242**, 55 (1996).
- [Zaks et Klibanov 86] A. Zaks et A. Klibanov. – *Substrate specificity of enzymes in organic solvents vs water is reversed*. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2767 (1986).
- [Zhao et Piot 98] Q. Zhao et J. M. Piot. – *Organic solvent extraction associated with HPLC in the preparation of hemorphins from hemoglobin peptic hydrolysate*. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, **28**, 61 (1998).
- [Zhou 89] C. Zhou. – *Mechanism of tumor necrosis induced by photodynamic therapy*. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol*, **3**, 299 (1989).
- [Zioudrou et coll. 79] C. Zioudrou, R. A. Streaty et W. A. Klee. – *Opioid peptides derived from food proteins*. *J. Biol. Chem.*, **254**, 2446 (1979).

# Annexe A

## Articles



# Fractionation at Pilot-Plant Scale of an Haemoglobin Hydrolysate by Strong Anionic Exchange Chromatography: Application to the Preparation of an Amphiphilic Peptide

Elisabeth Kosciarz, Florence Rofidal, Ida Dossou-Yovo, Dominique Vercaigne-Marko,\* Naïma Nedjar-Arroume, Pascal Dhulster & Didier Guillochon

Laboratoire de Technologie des Substances Naturelles, IUT 'A' de Lille 1, BP 179, 59 653 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

(Received 15 April 1997; revised version received 16 July 1997; accepted 21 July 1997)

**Abstract:** The development and the scale-up of high performance anion chromatography to obtain 1 milligram to 1 gram yields of a peptide fraction from a complex peptic haemoglobin hydrolysate is described here. The chromatographic conditions were developed using a 1 cm<sup>3</sup> Mono Q analytical column and progressively scaled-up to a 6 dm<sup>3</sup> Q Sepharose Fast Flow column. For easy recovery of peptide and easy adjustment of conditions for final purification, a volatile buffer, ethanolamine HCl buffer 20 mmol dm<sup>-3</sup>, pH 10.5, was employed; desalting was carried out by a pilot-plant scale electro dialysis which permitted the elimination of 99% NaCl without important loss of peptide (less than 15%). A combination of these techniques with reverse phase HPLC proved a useful strategy for fractionation of a complex peptide mixture and enabled pure peptides to be obtained in sufficient quantities for further analyses and biological tests. The example of preparation and purification of an amphiphilic peptide is described. Its ability to solubilize an insoluble photosensitizer, protoporphyrin IX, was determined in order to study its utilization as a carrier for photochemotherapy. © 1998 SCI.

*J. Chem. Technol. Biotechnol.* 71, 35–42 (1998)

Key words: peptic haemoglobin hydrolysate; amphiphilic peptide; anion exchange chromatography; pilot-plant scale purification

## NOTATION

PP IX Protoporphyrin IX  
RP-HPLC Reverse-phase high performance liquid chromatography

## 1 INTRODUCTION

For many years, protein hydrolysates derived from various sources (soya, milk, wheat and fish)<sup>1</sup> have been

used as food ingredients for human as well as animal nutrition.<sup>2</sup> Numerous biologically active peptides have already been identified in such hydrolysates.<sup>3</sup> Investigations on their potential applications are undertaken in many areas such as nutritional therapy,<sup>4,5</sup> and in the medical field on account of their immunomodulating properties,<sup>6</sup> and their opioid,<sup>7</sup> antithrombotic<sup>8</sup> or antimicrobial activities.<sup>9</sup>

A pilot-plant scale ultrafiltration process to obtain a well defined and reproducible hydrolysate of bovine blood haemoglobin proteolysed by pepsin was described previously.<sup>10</sup> This hydrolysate contained more than 100 different peptides; opioid peptides<sup>11</sup> and

\* To whom correspondence should be addressed.

36 E. Kosciarz, F. Rofidal, I. Dossou-Yovo, D. Vercaigne-Marko, N. Nedjar-Arroume, P. Dhulster, D. Guillochon

bradykinin potentiating peptides<sup>12</sup> were isolated and characterized. More recently an amphiphilic peptide was purified and tested for its capacity to solubilize and transport water-insoluble porphyrins for use in photodynamic therapy.<sup>13</sup>

Quantitative isolation of a peptide from a peptidic hydrolysate in order to test its biological application is difficult because it requires several chromatographic steps. These may involve size exclusion liquid chromatography and reverse phase liquid chromatography. The first is principally used as a pre-fractionation method whereas the second permits the subsequent isolation of pure peptides.<sup>13,14</sup> Pre-fractionation methods require large quantities of peptidic hydrolysate but the limiting factor of size exclusion gel filtration is the small amount of sample that can be loaded onto the gel columns. To get a good resolution, the volume sample is chosen depending on the volume of the column. In general, ion exchange liquid chromatography allows much larger quantities of sample to be loaded, the available capacity of an ion exchanger depending on the number of charged substituted groups, and therefore is considered a powerful method for both analytical and preparative protein separations. However, for peptides, its use has been limited by the presence of large amounts of salts in the eluted fractions and the difficulty of desalting the peptide solutions.

The aim of this study was to develop a pre-fractionation method of complex protein hydrolysates by anion exchange chromatography associated with an electro dialysis step at pilot-plant scale in order to eliminate salts. This fractionation procedure followed by reverse phase chromatography was applied to the isolation of an amphiphilic peptide from a haemoglobin hydrolysate in order to use it as a porphyrin carrier. This peptide was used as a marker to follow the development and assess the efficiency of scale-up of a process to yield 1 g quantities of a peptide fraction.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Hydrolysate preparation

Bovine haemoglobin hydrolysate was obtained at pilot-plant scale by pepsin proteolysis in an ultrafiltration reactor followed by decolorization with MgO, desalting and atomization as previously described.<sup>10</sup> The nitrogen content was determined by the Kjeldahl method (Gehhardt apparatus Vapodest 3), the peptide content of the powder was 82.15%.

### 2.2 Anion exchange chromatography

Analytical anion exchange chromatography was performed using a Fast Protein Liquid Chromatography

(FPLC) system (Pharmacia Biotech, Orsay, France) using a Mono Q HR 5.5 ion exchange matrix (5 × 50 mm, 10 μm particle size). The equipment consisted of a GP 250 Plus system controller, two P500 pumps and a Uvicord SII detector set at 226 nm and connected with a REC 101 recorder.

Scale-up to preparative ion exchange chromatography was achieved with Q-Sepharose Fast Flow (Bio Process medium) using initially a 20 cm<sup>3</sup> pre-packed column 16/10 (16 mm × 100 mm) then a 380 cm<sup>3</sup> gel bed in a XK 50 column (50 mm × 300 mm) and at least a 6120 cm<sup>3</sup> gel bed in a BPG 200 column (200 mm × 750 mm) with a Bio Pilot Liquid Chromatography system (Pharmacia), consisting of a C3 Plus controller, a conductivity meter, a Uvicord SII detector with industrial equipment and a peristaltic pump (Watson Marlow).

For pH optimization, a mixture of 1 mg of peptic hydrolysate in 100 mm<sup>3</sup> buffer A was injected onto the Mono Q column previously equilibrated in the same buffer A. Six buffer A solutions were used: 20 mmol dm<sup>-3</sup> ammonium acetate, pH 6 and 7, 20 mmol dm<sup>-3</sup> Tris/HCl buffer, pH 8 and 9, and 20 mmol dm<sup>-3</sup> ethanolamine/HCl buffer, pH 10 and 10.5. The formulation for buffer B was buffer A containing 1 mol dm<sup>-3</sup> NaCl. The flow rate was 1 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>. After a 4 min initial isocratic wash with buffer A, elution was performed using a linear gradient from 0 to 0.5 mol dm<sup>-3</sup> NaCl in 20 min and then 4 min isocratic elution with buffer B. After each run the column was re-equilibrated for 15 min before the next injection of sample.

For gradient optimization, an 80 min isocratic elution with buffer A was followed by a linear A-B gradient [0.55 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl per min (0.055% B min<sup>-1</sup>)] for 160 min then a linear A-B gradient [2 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl per min (0.2% B min<sup>-1</sup>)] for 80 min. At the end, isocratic washes with buffer containing 0.35 mol dm<sup>-3</sup> and 1 mol dm<sup>-3</sup> NaCl were carried out before re-equilibrating with buffer A. The flow rate was 0.5 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>.

### 2.3 Reverse-phase HPLC

Analysis of peptides in the different fractions separated by ion exchange chromatography was carried out by RP-HPLC. The HPLC apparatus was an LKB 2150 pump system controller, with an LKB 2510 Uvicord SD monitor set at 226 nm and connected with an LKB 2152 Integrator. The separation was performed using a Vydac C18 column (250 mm × 4.6 mm). Elution was with eluent A, ammonium acetate 10 mmol dm<sup>-3</sup>, pH 6, and eluent B, which was a mixture of A with acetonitrile (20/80) (v/v). The gradient applied was 0 to 50% B over a period of 80 min; the flow rate was 0.8 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>. Each fraction eluted from the column

was manually collected for mass spectrometric determination.

#### 2.4 Electrodialysis

Desalting of a 2 dm<sup>3</sup> fraction was performed by electro-dialysis (EUR 2D-5P11 Electrodialyseur, EURODIA Industries S.A., Wissous, France). Salt removal was monitored by following decreasing intensity (3.1 to 0.1 A) at a constant imposed voltage (18 V). The conductivity of the solution was measured before and after electro-dialysis. The concentration of NaCl was determined using a calibration curve for NaCl. This concentration was also verified by the AgNO<sub>3</sub> precipitation method of Mohr.<sup>15</sup>

#### 2.5 Protoporphyrin IX-peptide complex formation

Protoporphyrin IX (PP IX) free acid was obtained from Sigma Chemical Co. The capacity of peptide to solubilize PP IX was investigated according to the procedure described by Cempel *et al.*,<sup>13</sup> slightly modified. A 5.4 mg sample of PP IX was dissolved in 20 cm<sup>3</sup> acetone/phosphate buffer (50 mmol dm<sup>-3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH pH 7)(50/50). The complex formation was carried out by adding PP IX to a 3.5 mg cm<sup>-3</sup> peptide solution in water. The peptide concentration in the final mixture was 0.23 mg cm<sup>-3</sup>, and the PP IX concentration was varied to enable a calibration curve to be prepared. The sample volumes were adjusted to 2 cm<sup>3</sup> with the acetone/phosphate buffer. Acetone was then removed *in vacuo*, and the resultant solution incubated at 40°C for 20 min. Thereafter, the insoluble residues were eliminated by centrifugation (5000 g for 10 min), and the supernatant fluid was lyophilized. To determine the quantity of PP IX solubilized by the peptide, 1 cm<sup>3</sup> of acetone/phosphate buffer mixture was added to the lyophilized powder to provide the same conditions used for the calibration curve for pure protoporphyrin. The absorbance was measured at 538 nm.

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

Chromatographic conditions on Mono Q column (1 cm<sup>3</sup>) were developed and extrapolated by linear scale-up from the semi-preparative scale purification (20 cm<sup>3</sup>) to pilot-plant scale (6 dm<sup>3</sup>) on Q-Sepharose Fast Flow, a Bio Process medium. As interfacing steps such as desalting or buffer exchange are often necessary to adjust sample conditions to the requirements of the next operation, a volatile solvent was used as eluent and pilot-plant scale desalting achieved by electro-dialysis. The amphiphilic capacity of the marker peptide was

investigated by its ability to solubilize protoporphyrin IX in water.

#### 3.1 Adsorption and separation of the haemoglobin hydrolysate as function of pH

The influence of buffer pH on peptide fixation and separation was assayed at an analytical stage on a Mono Q column HR 5.5 over the pH range value from 6 to 10.5. As shown in Fig. 1, only a very alkaline pH of 10.5 allowed the fixation of nearly all the peptides with no exclusion peak. The best resolution, as shown by the large number of peaks, was obtained at this pH value. Ethanolamine, a volatile buffer, can be easily eliminated by evaporation providing a simple method to adjust sample conditions (buffer exchange) for the subsequent purification step.

#### 3.2 Study of gradient slope, flow rate and peptide amount loaded on the resolution

The influence of gradient slope on the separation of the peptides was optimized on a Mono Q column (1 cm<sup>3</sup>) and the parameters were transposed to Q-Sepharose Fast Flow medium (20 cm<sup>3</sup>). As presented in Fig. 2, after isocratic elution with a bed volume of initial buffer in order to adsorb the maximum of peptides, a low gradient slope (0.05 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl min<sup>-1</sup>) followed by a steeper gradient (2 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl min<sup>-1</sup>) gave the best resolution of peptides. In this way, 12 fractions were separated. Elution of the remaining peptides was achieved with a buffer containing 35 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl.

The influence of flow rate on resolution should be studied for each product to be purified. Flow rates over the range 0.5 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> to 5 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> were assessed. The best separation was obtained with a low flow rate of 0.5 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>, giving a complete run in 6 h. Even if the quality of the matrix allows a much higher throughput, as indicated by the manufacturer (Pharmacia Biotech) for proteins, for peptides the saving of time would not counterbalance the loss of resolution.

The same argument was taken into account for the injection of peptide samples: a study of sample loading was performed in the range of 5–100 mg of hydrolysate. The best resolution among the peaks was obtained with a maximum of loading of 25 mg. Above this, there was reorganization in peak distribution and poorer resolution.

#### 3.3 Choice of a fraction containing an amphiphilic peptide as a marker

At this stage of process development, it was necessary to choose a peptide as marker to verify that the scaled-up process retains the same degree of product purity. All 12 fractions obtained at semi-preparative scale were

38 E. Kosciarz, F. Rofidal, I. Dossou-Yovo, D. Vercaigne-Marko, N. Nedjar-Arroume, P. Dhulster, D. Guillochon

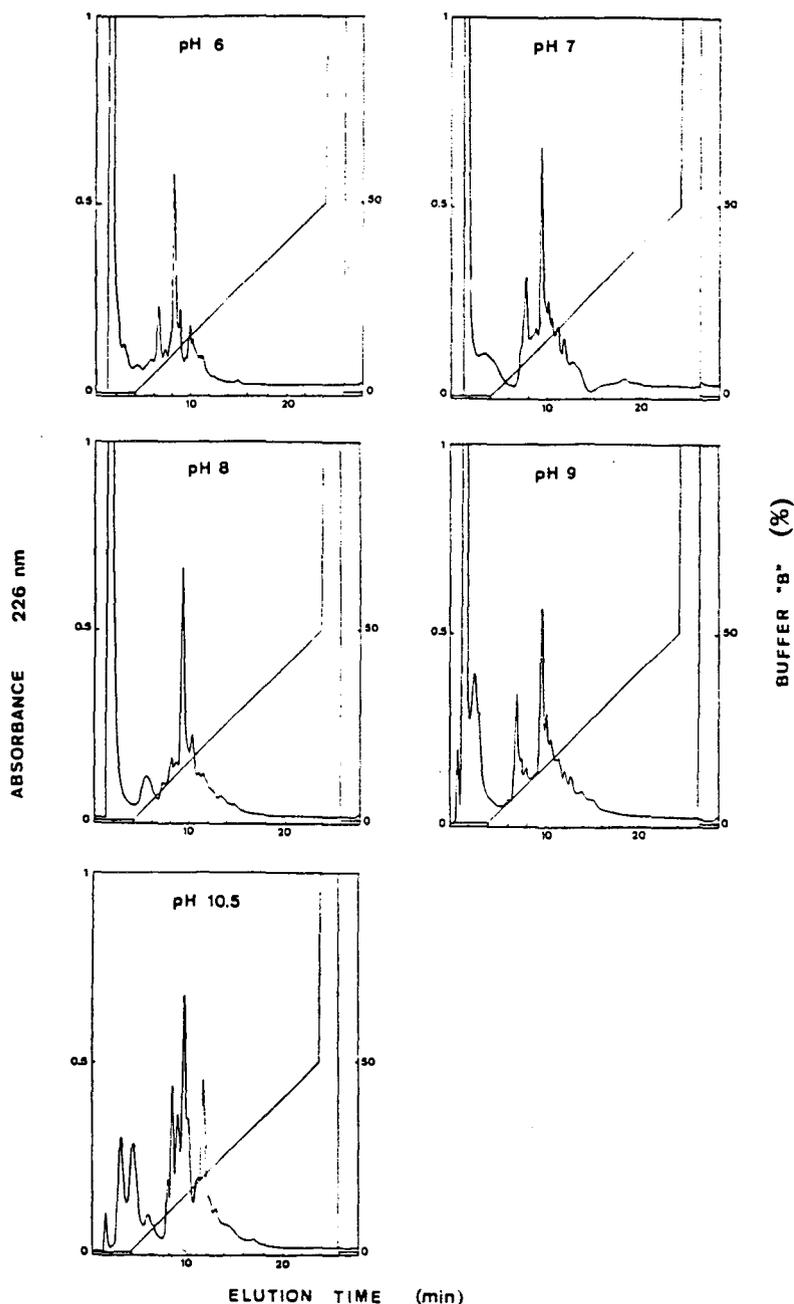


Fig. 1. Separation of haemoglobin hydrolysate on a Mono Q HR 5.5 column as a function of pH. Linear A-B gradient [ $2.5 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ NaCl}$  per min ( $0.25\% \text{ B min}^{-1}$ )] after 4 min isocratic elution with buffer A. Flow rate,  $1 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ .

analysed by RP-HPLC (results not shown) in order to identify one of the fractions containing both the main and most hydrophobic peptide. Fraction 7, which was eluted by  $0.054 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$ , was retained because it contained a peptide eluted by 23% acetonitrile in RP-HPLC and representing 20% of the peptic fraction. Figure 3 shows the RP-HPLC profile of the total

hydrolysate loaded on the anion exchange column (Fig. 3(a)) and 'fraction 7' isolated (Fig. 3(b)).

This peptide was purified by RP-HPLC. Its molecular mass, 2235.18 Da, was determined by MALDI-MS. It presented a fluorescence emission at 357 nm corresponding to the presence of a tryptophan residue. According to the bovine haemoglobin sequence data

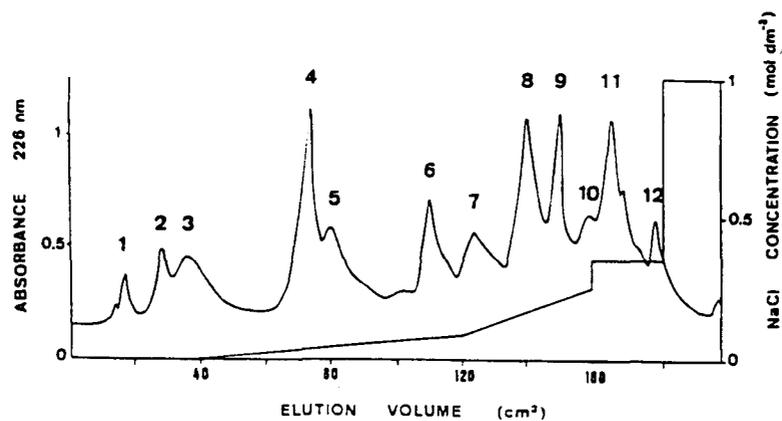


Fig. 2. Elution as a function of gradient slope on Q-Sepharose Fast Flow (20 cm<sup>3</sup>) column. After 40 cm<sup>3</sup> isocratic elution with buffer A, a 80 cm<sup>3</sup> linear gradient up to 0.09 mol dm<sup>-3</sup> NaCl and then a 40 cm<sup>3</sup> linear gradient up to 0.25 mol dm<sup>-3</sup> NaCl were applied, and were followed by two isocratic steps at 0.35 mol dm<sup>-3</sup> and 1 mol dm<sup>-3</sup> NaCl respectively. Flow rate, 0.5 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>.

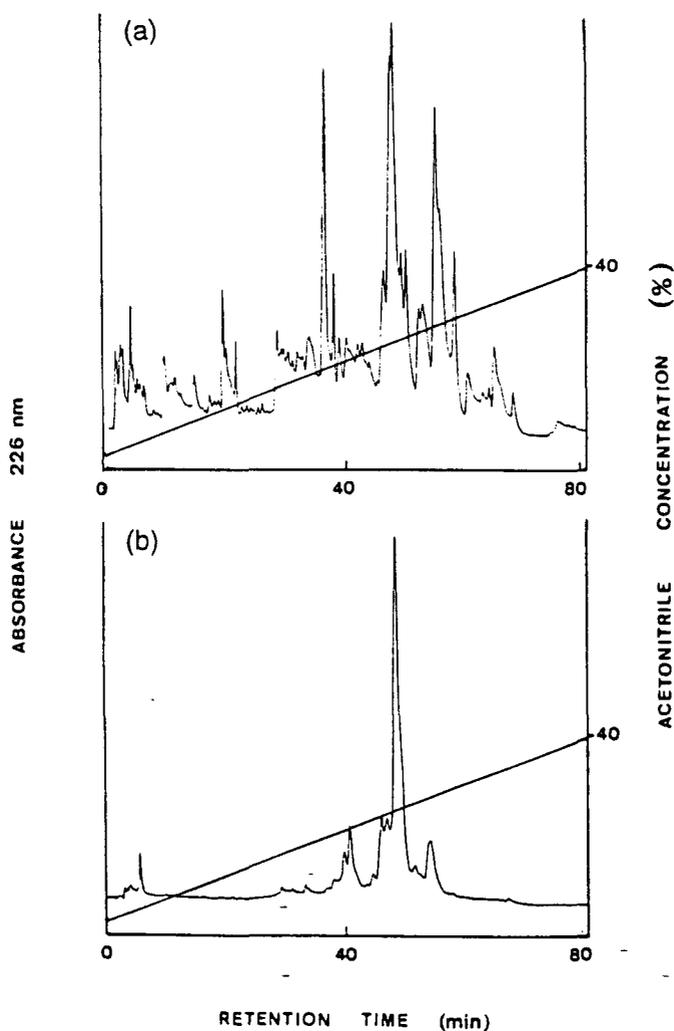


Fig. 3. Reverse-phase liquid chromatographic analyses of haemoglobin hydrolysate and 'fraction 7' obtained by ion exchange chromatography. (a): Total haemoglobin hydrolysate; (b): 'fraction 7'.

40 E. Kosciarz, F. Rofidal, I. Dossou-Yovo, D. Vercaigne-Marcko, N. Nedjar-Arroume, P. Dhulster, D. Guillochon

bank developed in the laboratory, the isolated peptide corresponds to the first 23 amino acids in the N-terminal part of the  $\alpha$ -chain:

<sup>1</sup>Val-Leu-Ser-Ala-Ala-Asp-Lys-Gly-Asn-Val-Lys-Ala-Ala-Trp-Gly-Lys-Val-Gly-Gly-His-Ala-Ala-Glu<sup>23</sup>

According to Eisenberg *et al.*,<sup>16</sup> the mean hydrophobic moment per residue and mean hydrophobicity per residue of this peptide were estimated to be 0.05 and 0.14 respectively. In order to test the amphiphilic potentiality of this peptide, its ability to aid solubilization of Protoporphyrin IX was studied. Figure 4 shows that the amounts of PP IX solubilized increased as a function of the initial amount of PP IX, with a maximum reached at  $100 \mu\text{g cm}^{-3}$ . The maximum solubilization capacity of the peptide was about  $190 \mu\text{g}$  of PP IX per mg of

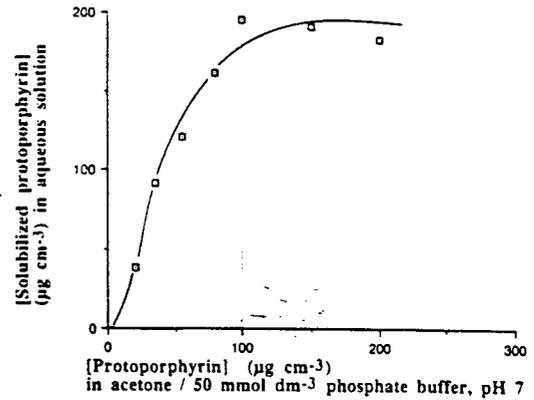


Fig. 4. Solubilization of Protoporphyrin IX ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ) as a function of the Protoporphyrin IX concentration for a peptide concentration in acetone/buffer mixture of  $0.23 \text{ mg cm}^{-3}$ .

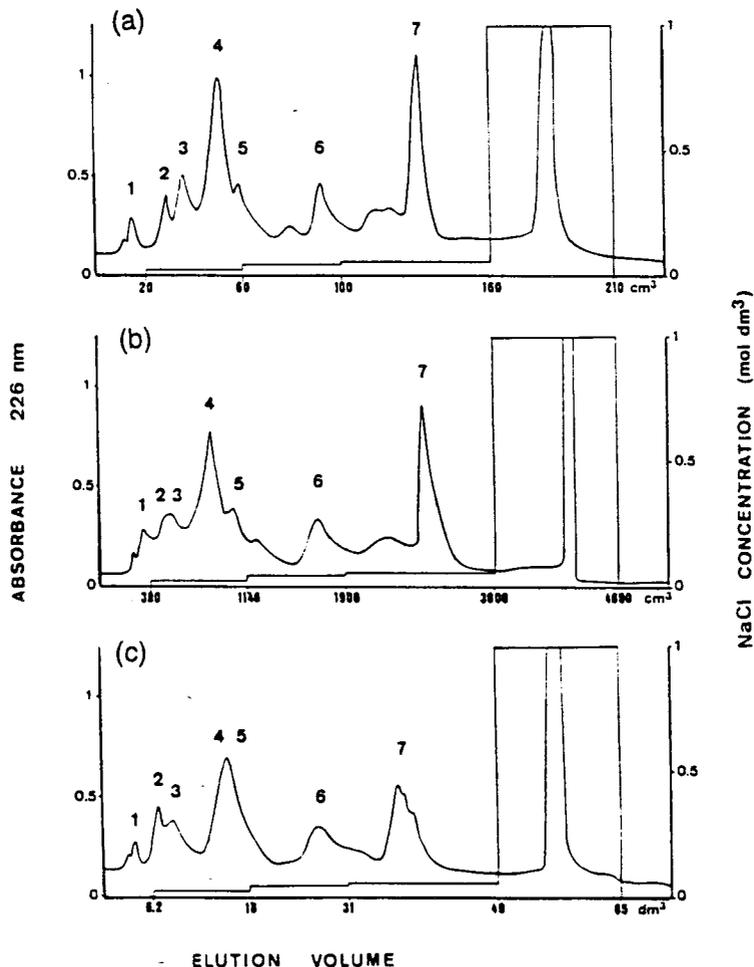


Fig. 5. Scale-up of the chromatographic parameters. (a):  $20 \text{ cm}^3$  gel bed; (b):  $380 \text{ cm}^3$  gel bed; (c):  $6120 \text{ cm}^3$  gel bed. Elution by isocratic steps: buffer A containing NaCl at successive concentrations of ( $\text{mol dm}^{-3}$ ) 0, 0.025, 0.045, 0.054 and 1.0.

TABLE 1  
Scale-up of the Ion Exchange Chromatographic Process

Column size (mm)	Gel volume (cm <sup>3</sup> )	Sample mass (mg)	Sample volume (cm <sup>3</sup> )	Flow rate (cm <sup>3</sup> min <sup>-1</sup> )	Fraction 7 (mg peptides)
16 × 100	20	25	0.5	0.5	3
50 × 195	380	475	10	5.0	58
200 × 195	6120	7650	153	78.75	714

peptide in acetone/phosphate buffer, which corresponds to approximately a 1/1 molar ratio. These results demonstrate the high solubilizing capacity of this peptide for protoporphyrins and its potentialities in photodynamic therapy. For all these reasons, this peptide of the 'fraction 7' was chosen as marker for further checking the efficiency of the scale-up.

#### 3.4 Development of an isocratic step elution at semi-preparative scale

At pilot-plant scale, it was more practical to use a step-wise rather than linear salt gradient to isolate 'fraction 7'. Hence, the NaCl concentrations necessary to elute the marker peptide by isocratic steps were determined using the 20 cm<sup>3</sup> column. After an initial run with buffer lacking NaCl to adsorb the peptides on the matrix, two steps were chosen, 0.025 mol dm<sup>-3</sup> and 0.045 mol dm<sup>-3</sup> NaCl, to eliminate the maximum amount of peptides below 'fraction 7'. Elution with 0.054 mol dm<sup>-3</sup> NaCl allowed the collection of 'fraction 7'. A final isocratic run with 1 mol dm<sup>-3</sup> NaCl was used to wash off the column before re-equilibrating it in the initial buffer. As seen in Fig. 5(a), fractionation by steps led to a better resolution, in particular of 'fraction 7'. As analysed by HPLC, the marker peptide was detected in 'fraction 7' in which it represented about 30% of the peptidic content.

#### 3.5 Scale-up from semi-preparative to pilot-plant scale

On the basis of the preceding studies, the following parameters were retained: flow rate 0.5 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> corresponding to a linear throughput of 15 cm h<sup>-1</sup> and 25 mg (dry matter) peptidic hydrolysate loaded on the 20 cm<sup>3</sup> column.

The scale-up of this chromatographic process was performed from a 20 cm<sup>3</sup> to a 6120 dm<sup>3</sup> column with an intermediate 380 cm<sup>3</sup> column. It was necessary to maintain the linear flow rate of 15 cm h<sup>-1</sup>, i.e. to increase the flow rate proportionally to the column section, and then to increase the sample mass and the elution volumes of each step in proportion to the gel volume. The conditions used and the results obtained during the scale-up are summarized in Table 1. Figure 5 shows the good reproduction of the elution during scale-up.

For the move from semi-preparative to preparative scale, the section of the 380 cm<sup>3</sup> column was 10 times larger than that of the 20 cm<sup>3</sup> column, so the flow rate was multiplied 10 times (i.e. 5 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>). As the gel height was about twice that of the smaller column, it was necessary to take this factor into account to determine the sample mass to be loaded onto the column and the elution volumes of each NaCl step. The chromatogram obtained on the 380 cm<sup>3</sup> column (Fig. 5(b)) gave good reproducibility of separation. The marker peptide was still eluted in 'fraction 7', as determined by RP-HPLC and represented about 44% of the peptidic content.

From preparative to pilot-plant scale, as the gel height was the same for the 380 cm<sup>3</sup> and 6120 dm<sup>3</sup> columns, the chromatographic parameters could be directly extrapolated. As seen in Fig. 5(c), the peak corresponding to 'fraction 7' was slightly broader, but the purity (45%) of the marker peptide was quite good. Despite the 300-fold increase in scale and the effects of diffusion forces in the gel, the resolution of the chromatogram was little altered and there was an increase in peptide quantity and purity.

At pilot-plant scale, 7.6 g of a solubilized complex peptic powder (as shown in Fig. 3(a)) could be injected at once on the 6 dm<sup>3</sup> column and 'fraction 7' containing

TABLE 2  
'Fraction 7' Composition Before and After Electrodialysis

Fraction 7	Conductivity	NaCl concentration		NaCl content	Peptidic content
		(Conductimetry)	(Mohr's method)		
Before desalting	5.28 mS	3.24 g dm <sup>-3</sup>	3.27 g dm <sup>-3</sup>	12.96 g	714 mg
After desalting	20 μS	0.01 g dm <sup>-3</sup>	0.02 g dm <sup>-3</sup>	0.04 g	616 mg

42 E. Kosciarz, F. Rofidal, I. Dossou-Yovo, D. Vercaigne-Marko, N. Nedjar-Arroume, P. Dhulster, D. Guillochon

0.714 g peptides could be recovered after about 10 h of chromatography.

### 3.6 Desalting of peptidic fraction

Despite the low NaCl concentration necessary to elute this 'fraction 7', salts represented 93% of dry matter and peptides only 7%. So, elimination of NaCl becomes a crucial stage in the purification procedure. Using pilot-scale electro dialysis, 99.5% of NaCl was removed in 30 min whereas less than 14% of the peptides were lost (Table 2).

## CONCLUSIONS

The scaled-up process described yielded 616 mg peptide fraction, containing about 300 mg of the  $\alpha$ -1-23 amphiphilic peptide, from 7.6 g of peptic haemoglobin hydrolysate. This peptide was easily purified in a single step using a preparative RP-HPLC column.

The present study shows the efficiency of this fractionation method. Using pilot-plant scale ion exchange chromatography, the scale of peptide separation from a complex enzymic hydrolysate can be increased many fold without lack of resolution. This process of ion exchange chromatography associated with electro dialysis at pilot-plant scale offers advantages for the quantitative separation of peptides from protein hydrolysates derived from the food industry for applications in the areas of nutrition and medicine.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge the assistance of Mrs Danielle Wallet for reviewing the manuscript and Mr Guy Ricart for mass spectrometry determinations.

## REFERENCES

1. Kilara, A., Enzyme modified food ingredients. *Process Biochem.*, **21** (1985) 149-57.
2. Cuthberton, D. P., Amino acids and protein hydrolysates in human and animal nutrition. *J. Sci. Food Agric.*, **1** (1950) 35-41.
3. Meisel, M., Frister, H. & Schlimme, E., Biologically active peptides in milk proteins. *Z. Ernährungswiss.*, **28** (1989) 267-78.
4. Silk, D. B. A., Grimble, G. H. & Rees, R. G., Protein digestion and amino acid and peptide absorption. *Proc. Nutr. Soc.*, **44** (1985) 63-72.
5. Rerat, A., Simoes-Nunes, C., Mendy, F. & Roger, L., Amino acid absorption and production of pancreatic hormone in non-anesthetized pigs after duodenal infusions of a milk enzymic hydrolysate or of free amino acids. *Brit. J. Nutr.*, **60** (1988) 121-6.
6. Werner, G. H., Floc'h, F., Migliore-Samour, D. & Jolles, P., Immunomodulating peptides. *Experientia*, **42** (1986) 521-31.
7. Chiba, H., Tani, F. & Yoshikawa, M., Opioid antagonist peptides derived from c-casein. *J. Dairy Res.*, **56** (1989) 363-6.
8. Bouhallab, S. & Touzé, C., Continuous hydrolysis of caseinomacropeptide in a membrane reactor: kinetic study and gram-scale production of antithrombotic peptides. *Lait*, **75** (1995) 251-8.
9. Bellamy, W., Wakabayashi, H., Takase, M., Kawase, K., Shimamura, S. & Tomita, M., Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of lactoferrin B. *Med. Microbiol. Immunol.*, **182** (1993) 97-105.
10. Piot, J. M., Guillochon, D., Leconte, D. & Thomas, D., Application of ultrafiltration to the preparation of defined hydrolysates of bovine haemoglobin. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **42** (1988) 147-56.
11. Piot, J. M., Zhao, Q. Y., Guillochon, D., Ricart, G. & Thomas, D., Chemical characterization and opioid activity of peptides isolated from a bovine haemoglobin peptic hydrolysate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **189** (1992) 101-10.
12. Piot, J. M., Zhao, Q. Y., Guillochon, D., Ricart, G. & Thomas, D., Isolation and characterization of a bradykinin potentiating peptide from haemoglobin hydrolysate. *FEBS Letters*, **299** (1992) 75-9.
13. Cempel, N., Aubry, J. M., Piot, J. M. & Guillochon, D., Isolation from bovine haemoglobin of a peptide that might be used as a potential hydrophobic photosensitizer carrier. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **21** (1995) 287-94.
14. Piot, J. M., Zhao, Q., Guillochon, D., Dhulster, P., Ricart, G. & Thomas, D., Semi-preparative purification and characterization of peptides from complex haemoglobin hydrolysate by HPLC-mass spectrometry. *Chromatographia*, **30** (1990) 205-10.
15. Audigie, C. I., Figarella, J. & Zonszan, F., La méthode de Mohr. In *Manipulation d'Analyse Biochimique*. ed. Doin, Paris, 1978, pp. 11-12.
16. Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M. & Wall, R., Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J. Mol. Biol.*, **179** (1984) 125-42.

## Selectivity modification of chymotryptic hydrolysis of haemoglobin by its adsorption on a solid phase

Elisabeth Kosciarz, Dominique Vercaigne-Marko<sup>1</sup>, Natacha Scellier, Naïma Nedjar-Arroume and Didier Guillochon

Laboratoire de Technologie des Substances Naturelles, IUT "A" de Lille 1, BP 179, 59 653 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

A change of selectivity of the chymotryptic hydrolysis of haemoglobin was evidenced when the protein was adsorbed on to a negatively charged hydrophobic support. The hydrolysis in heterogeneous phase improved the obtaining of positively charged and hydrophobic peptides as carriers of water-insoluble molecules. Haemoglobin adsorption on Amberlyst 15Wet was carried out in 0.1 M Tris/HCl buffer at pH 6.0. Chymotryptic hydrolysis was performed for 72 h at 37°C in the same buffer. In solution, the presence of SDS was necessary to achieve the complete hydrolysis of haemoglobin chains, whereas it was not needed when haemoglobin was previously adsorbed on to the resin. The hydrolysis proceeded more slowly in heterogeneous phase than in homogeneous solution because of the diffusional restrictions but, at the end of the hydrolysis, the peptide populations were very different, as shown by reversed-phase HPLC. Moreover their functional properties were different too, since the haemoglobin hydrolysate obtained by heterogeneous catalysis had a better solubilizing ability towards the water-insoluble molecule, protoporphyrin IX, a photosensitizer for photodynamic therapy. A time-course study of the hydrolysis was performed to follow the evolution of a marker peptide (I-14x), which allowed us to explain the change in the selectivity of the chymotryptic reaction. This change could be due to a slowing down of the cut-off of some sites interacting with the support.

### Introduction

The enzymic hydrolysis of proteins is widely used in food industries to improve the protein functional properties such as taste, solubility, emulsification and gelation, or to prepare extensively hydrolysed proteins for hypoallergenic infant diets [1] and nutritional therapy [2]. More recently the pharmaceutical and food industries have shown increasing interest in peptides derived from protein hydrolysates as components of functional foods [3]. Much research has

focused on the isolation of peptides derived from various protein sources. Numerous biologically active peptides have already been identified in casein [4], soya proteins [5], gluten [6], tuna myoglobin [7] and others.

These active peptides derived from agricultural proteins are isolated from very complex peptidic hydrolysates, where their concentrations are often low. The preparation of such peptides or peptide-containing fractions has generally required laborious chromatographic steps [8,9]. So the improvement of the formation of active peptides in the hydrolysates by enzyme engineering would make their purification easier. Some workers have used membrane-ultrafiltration reactors to carry out proteolytic reactions [10]. Continuous isolation of bioactive peptides has been obtained by hydrolysing casein in a continuous stirred-tank membrane reactor [11]. In another approach, several workers have obtained a modification of the peptidic populations by hydrolysing protein in the presence of alcohols such as ethanol and glycerol. They explained these changes in protease selectivity by modification of the conformation of native proteins and of the long intermediate peptides in relation with their hydrophobicity [12,13].

Blood from slaughterhouses is an unconventional but attractive source of proteins. Haemoglobin represents up to about 90% of the total-cell-fraction proteins and is often a waste product. Consequently there have been investigations into how to increase the market value of this agricultural by-product by enzymic hydrolysis. In a previous article [14], we reported the preparation at pilot-plant scale of a peptic hydrolysate from bovine haemoglobin that was used for clinical enteric nutrition [15] and in cell-culture media [16]. Fractionation at pilot-plant scale of this hydrolysate by strong-anionic-exchange chromatography was carried out to prepare an amphiphilic peptide with a high capacity for solubilization of protoporphyrin IX (PP IX), an insoluble photosensitizer that is attractive in the framework of photodynamic therapy [17]. Preparation by ultrafiltration of

Abbreviations used: PP IX, protoporphyrin IX; RP-HPLC, reversed-phase HPLC; Suc-[Ala]<sub>2</sub>-Pro-Phe-Nan, 3-carboxypropionyl-L-alanyl-L-alanyl-L-provyl-L-phenylalanyl-pantetheinamide.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed.

a haem-iron-enriched peptidic fraction from a peptic haemoglobin hydrolysate has also been described for treatments of iron deficiency [18]. More recently we have reported the preparation of opioid peptides from bovine haemoglobin by modifying the selectivity of the peptic-hydrolysis reaction with solvents [19].

The aim of this work was to change the selectivity of a conventional protease by carrying out hydrolyses in a heterogeneous system so that the protein was absorbed on a support. The objective was to modulate the peptidic composition of the hydrolysates and to improve their functional properties. This approach was attempted to increase the porphyrin-solubilizing capacity of bovine haemoglobin chymotryptic hydrolysates for further isolation of amphiphilic peptides as carriers of PP IX. The choice of the support was directed by the physicochemical properties of the porphyrin. As PP IX is negatively charged and hydrophobic, an anionic hydrophobic resin was chosen as the support to interact with and then protect cationic and hydrophobic sites of haemoglobin chains.

## Materials and methods

### Materials

Tosyl-lysylchloromethane ('TLCK')-treated  $\alpha$ -chymotrypsin from bovine pancreas (EC 3.4.21.1), pure bovine haemoglobin, 3-Carboxypropionyl-L-alanyl-L-alanyl-L-protyl-L-phenylalanyl *p*-nitroanilide (Suc-[Ala]<sub>2</sub>-Pro-Phe-Nan) and PP IX free acid were obtained from Sigma. PMSF was purchased from Fluka (St. Quentin Fallavier, France). Amberlyst 15Wet (the anionic resin) came from Rohm & Haas Co (Paris, France).

### Chymotryptic activity

The activity of  $\alpha$ -chymotrypsin at a final concentration of  $8.3 \times 10^{-4}$  mg/ml was checked using 0.2 mM Suc-[Ala]<sub>2</sub>-Pro-Phe-Nan as a synthetic substrate in 0.1 M Tris/HCl buffer, pH 7.4, containing 0.5 M NaCl and 9% DMSO. The absorbance was followed at 410 nm. The stock solution contained 80 IU of chymotrypsin/mg of enzyme powder.

### Hydrolysis of haemoglobin in solution

Haemoglobin hydrolysis by  $\alpha$ -chymotrypsin was performed in batch at 37 °C by adding 0.65 IU of chymotrypsin, mg of haemoglobin in 0.1 M Tris/HCl buffer, pH 6.0, containing 0.1% SDS and 0.02% NaN<sub>3</sub>. The haemoglobin concentration was 2% (w/v). At the end of the incubation time, 0.2 M PMSF in isopropanol was added to a 100:1 molar excess over the original amount of enzyme to stop any further action of the

proteinas. The time-course study was followed by reversed-phase HPLC (RP-HPLC) on a C<sub>4</sub> column.

### Adsorption of haemoglobin on the resin

Amberlyst 15Wet is a strongly acid sulphonic hydrophobic resin, (pore size, 24 nm; particle size, 600–850 nm). It was used under its sodium form. An 8% (w/v; 500  $\mu$ l) haemoglobin solution in 0.1 M Tris/HCl buffer, pH 6.0, containing 0.1% SDS was added to 1 ml of resin and stirred overnight at room temperature to adsorb 20 mg of haemoglobin/ml of resin. The resin was then washed with the same buffer to remove unadsorbed haemoglobin.

### Hydrolysis of haemoglobin adsorbed on to the anionic resin

The hydrolysis by  $\alpha$ -chymotrypsin of immobilized haemoglobin was performed at 37 °C, in 0.1 M Tris/HCl buffer, pH 6.0, containing 0.1% SDS and 0.02% NaN<sub>3</sub>, with the same enzyme-to-substrate ratio as in solution, i.e. 0.65 IU/mg of haemoglobin. The hydrolysis was stopped by adding a 100 molar excess of PMSF. After a 30-min incubation with the inhibitor, the supernatant was collected and the hydrolysate was eluted from the resin by increasing the pH to 9.5 with 0.1 M Tris/HCl buffer, pH 9.5, containing 0.1% SDS and PMSF. The supernatant was removed after 2 h of stirring. This operation was carried out twice and a final washing was performed with a Tris/HCl buffer (pH 9.5)/acetonitrile mixture (1:1, v/v). It is important to notice that all the peptides generated by proteolysis on the resin were collected in this way. More than 90% of the initial nitrogen content was recovered, as verified by the Kjeldahl method (on a Gehrard apparatus Vapordest 3, OSI, Paris, France). The peptide mixtures were analysed by C<sub>4</sub> RP-HPLC.

### SDS determination

SDS concentration was determined by a test adapted from Pitt-Rivers and Impiombato [20]. An aliquot of 5–20  $\mu$ l of supernatant was diluted in a detergent-free test tube with 0.8 ml of H<sub>2</sub>O. Subsequently, 0.2 ml of 0.4 mM *p*-rosanilide hydrochloride and 1 ml of a mixture of chloroform and ethylacetate (1:1, v/v) were added. After vortexing and centrifugation, the absorbance of the organic (lower) phase was measured at 545 nm. SDS (1 mg) corresponded to an absorbance of 0.3.

### RP-HPLC analysis

Analyses of the different peptidic fractions obtained during the time-course studies were carried out by RP-HPLC. The

HPLC apparatus was a Waters 600S controller with a Waters 996 Photodiode Array Detector (Waters, St Quentin en Yvelines, France) coupled to a Digital PC. Instantaneous UV/visible-absorbance spectral scans were performed between 200 and 600 nm at a rate of one spectrum/s online. The resolution was 1.2 nm. The separation was performed using a Vydac  $C_4$  column (250 × 4.6 mm). Elution was with eluant A, 0.1% trifluoroacetic acid, and eluant B, which was a mixture of eluant A with acetonitrile (2:3, v/v). A linear A–B gradient from 0 to 67% eluant B was applied over a period of 30 min followed by a linear A–B gradient from 67 to 83% for 35 min. The flow rate was 1 ml/min. For the time-course study of the marker peptide, the first gradient was modified by adding a 15-min isocratic step at 23.5% eluant B. Peptides were monitored at 226 nm in order to visualize the true digestion patterns. Chromatographic analyses were completed by using the Millennium software (Waters Corp.) [21]. The purity of the peaks was examined by comparing the spectrum of the solution at the top of the peak with the spectra determined at each point of the peak. The principle of the method is based on a mathematical analysis in which each spectrum is substituted by a vector to quantify the spectral differences across the peak.

#### Decolouration of the peptidic haemoglobin hydrolysates

The haemoglobin hydrolysates were decolorized by treatment at 20°C with 250 ml of acetone containing 2–3 ml of 2 M HCl [22]. The hydrolysate (20 ml) was gradually added with vigorous stirring to acetone solution. Haem was solubilized in acetone and the precipitated peptidic fraction was collected by centrifugation and resolubilized in 10 mM ammonium acetate buffer, pH 7.0, at a final concentration of 10 mg/ml.

#### PP IX–peptide complex formation

The ability of peptidic hydrolysates to solubilize PP IX was investigated according to a slightly modified version of the procedure described by Cempel et al. [9]. PP IX (0.104 mg/ml) was dissolved in a mixture containing acetone and 10 mM ammonium acetate buffer, pH 7.0 (1:1, v/v). The final peptide concentration in the acetone/ammonium-buffer mixture was 0.25 mg/ml and the PP IX concentration varied from 0 to 0.1 mg/ml. Acetone was then removed by vacuum evaporation. Insoluble residues were discarded by centrifugation (5000 g for 15 min). In order to determine the PP IX quantity solubilized by the hydrolysates, 1 ml of acetone was added to 1 ml of each mixture, and the absorbance was measured at 538 nm. A calibration curve

was determined with free PP IX in the same acetone/ammonium-buffer mixture.

## Results and discussion

### Homogeneous-phase chymotryptic hydrolyses

Haemoglobin chymotryptic hydrolyses were performed at pH 6, as for heterogeneous-phase hydrolysis, because this pH allows electrostatic interactions between haemoglobin and the anionic support. As shown in Figure 1(a), the hydrolysis of native haemoglobin in solution proceeded very slowly and was incomplete. Whole  $\alpha$  and  $\beta$  chains were still visible after 72 h of hydrolysis. This is not surprising because, in general, native proteins are rather resistant to proteinase action, a consequence of the tight and compact conformations adopted by most globular proteins. Moreover, it was not possible to carry out the hydrolysis beyond 72 h because of the precipitation of haemoglobin during the incubation at 37 °C.

It was therefore necessary to hydrolyse bovine haemoglobin in denaturing conditions. Chymotryptic hydrolysis of haemoglobin in the presence of 0.1% SDS has already been reported [22]. Under these conditions the chains are dissociated [23] and completely hydrolysed by  $\alpha$ -chymotrypsin. Actually, we showed that  $\alpha$ -chymotrypsin

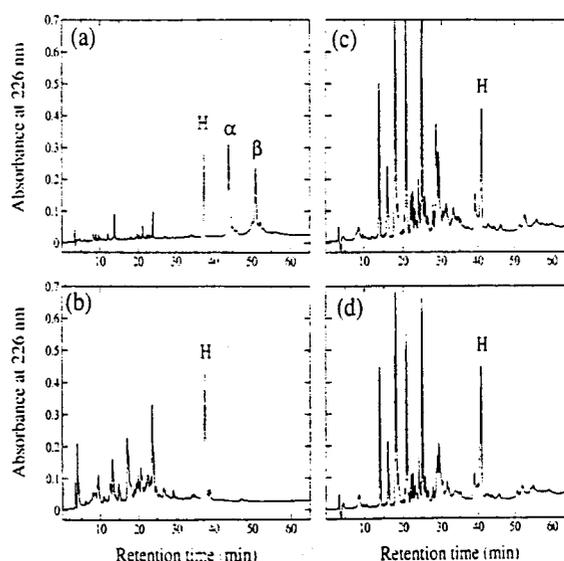


Figure 1 Comparison of peptidic populations at the end of the haemoglobin digestion in homogeneous and heterogeneous phases

Hydrolyses were performed in 0.1 M Tris/HCl buffer at pH 6.0. Haemoglobin in solution: (a) native; (b) with 0.1% SDS. Haemoglobin adsorbed on to resin: (c) native; (d) with 0.1% SDS. RP-HPLC was performed on a Vydac  $C_4$  column. H, haem;  $\alpha$  and  $\beta$ ,  $\alpha$  and  $\beta$  haemoglobin chains.

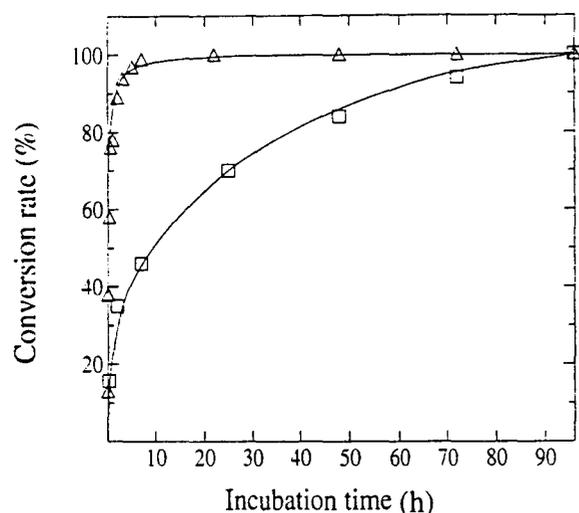


Figure 2 Time course of haemoglobin hydrolyses in homogeneous and heterogeneous phases

The graph shows the percentage of  $\alpha$ - and  $\beta$ -chain disappearance when in solution ( $\Delta$ ) and adsorbed on to resin ( $\square$ ).

alone was inactivated by 0.1% SDS at pH 6.0 within 1 min. However in the presence of haemoglobin, which acted as a protecting agent,  $\alpha$ -chymotrypsin activity was not affected, as already described in [13].

Complete disappearance of haemoglobin chains needed only 7 h at pH 6.0 (Figure 2). Moreover, the same peptidic profile in RP-HPLC was obtained after a further 24-h incubation, indicating the reaction was already finished at 7 h. A large number of peaks with short retention times were observed, indicating either small or hydrophilic peptides (Figure 1b).

#### Heterogeneous-phase chymotryptic hydrolyses

Chymotryptic hydrolysis of haemoglobin was carried out after its adsorption on a sulphonic hydrophobic support and compared with its hydrolysis in solution with SDS. As the pI of haemoglobin is 7.1 [22], at pH 6.0 the sulphonic resin used bound both basic amino acid residues and hydrophobic sites of the protein. Haemoglobin (20 mg) was allowed contact with 1 ml of resin overnight in order to achieve the equilibrium binding with the resin. We have verified that no leakage of haemoglobin occurred after binding.

As the pI of chymotrypsin is 8.6 [24], at pH 6.0 in the absence of haemoglobin we observed that bovine  $\alpha$ -chymotrypsin was totally immobilized on the sulphonic resin. However when haemoglobin was previously adsorbed on to the resin, less than 25% of the  $\alpha$ -chymotrypsin, added in the same molar ratio as in solution (i.e. 0.65 IU of chymotrypsin/mg of haemoglobin), was immobilized. Moreover, the enzyme remaining in solution was not affected by

SDS, which was completely adsorbed on to the support, as measured by the *p*-rosaniline method [20].

In Figure 2, we show that when haemoglobin was adsorbed on to the support, haemoglobin chains completely disappeared. In the same buffer conditions, this hydrolysis proceeded slower than in solution but was nevertheless complete after 72 h. The hydrolysis was slowed because diffusional restrictions greatly influenced the reaction kinetics, as usually observed in heterogeneous catalysis.

It is noteworthy that the same peptidic chromatographic profiles were observed from either native haemoglobin or SDS-denatured haemoglobin (Figures 1c and 1d). This would prove that the adsorption of haemoglobin on the resin probably results in the unfolding of the protein to the same extent as when SDS (which is hydrophobic and negatively charged) is used as the denaturing agent. Therefore, SDS was not necessary to carry out the heterogeneous-phase hydrolysis, but its presence was maintained throughout the study in order to make conditions the same as the homogeneous-phase hydrolysis.

#### Modification of the selectivity of the chymotryptic hydrolysis in the heterogeneous phase

To compare the selectivities of chymotryptic hydrolyses in homogeneous and heterogeneous phases and not to confuse the results with a selective adsorption effect of the resin towards some peptides, the peptides adsorbed on to the support and released in the solution were collected. Nitrogen determination allowed us to check the recovery of all the peptides. The peptide populations obtained with these two hydrolysis systems were very different (Figures 1b and 1d). These peptidic hydrolysates were the final products of the reactions since no evolution of the chromatograms was observed after a 24-h incubation in solution and after 96 h in the heterogeneous phase. In this last case, an overall shift of the peaks towards large hydrophobic peptides with high retention times was observed. No hydrophilic small peptides (retention time < 13 min) were found.

In order to compare the functional properties of the two hydrolysates, we studied their abilities to solubilize the water-insoluble PP IX. Figure 3 shows that the amounts of PP IX solubilized by the peptides increased as a function of the initial amount of PP IX. The maximum solubilizing capacity of the hydrolysate produced from the homogeneous-phase enzymic reaction was 100  $\mu$ g of PP IX/mg of hydrolysate. On the other hand, the peptidic hydrolysate obtained from the heterogeneous-phase reaction had a porphyrin-solubilizing capacity three times as high as the previous hydrolysate (300  $\mu$ g of PP IX/mg). These results demonstrate that the change of selectivity observed in the course of the heterogeneous-phase hydrolysis directed the chymotryptic hydrolysis towards a peptidic population with physico-chemical properties complementary to those of the support.

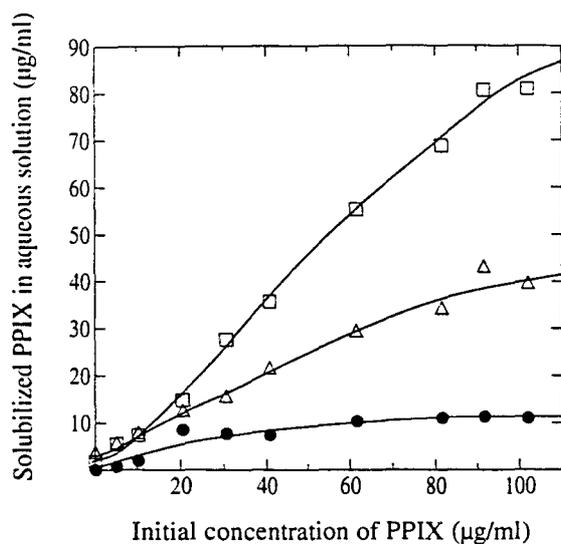


Figure 3 Solubilization of PP IX as a function of the PP IX initial concentration for a peptide concentration in acetone/buffer mixture of 0.25 mg/ml

●, No peptide; △, hydrolysate in solution; □, hydrolysate on resin.

To have a better understanding of the heterogeneous-phase chymotryptic reaction, a kinetic study of the hydrolysis was carried out. The reaction was stopped at various times by adding PMSF before the peptide mixture was chromatographed on a  $C_4$  reversed-phase column. Each peak corresponds to several peptides, so the elution gradient was modified slightly by adding an isocratic step in order to reveal one peak corresponding to a pure peptide all along the hydrolysis and to allow its quantification. Figure 4 shows a comparison of the two time-course hydrolyses at the same percentage of haemoglobin-chain disappearance (conversion rate). The peak eluted with a retention time of 52 min corresponds to haem. The height of this peak is constant, indicating a good conservation of material and equal loading throughout the experiment. It was used as internal standard. The areas of the peaks were compared by integration using the Millennium software. The evolution of the conversion rate of haemoglobin chains was slower for the heterogeneous-phase reaction than for hydrolysis in solution. However, according to Linderstrøm-Lang [25], in the two cases, kinetics seemed to proceed mostly 'one by one', in so far as whole chains disappeared slowly all along the reaction and small peptides appeared concomitantly. Consequently, haemoglobin adsorption on to the support does not seem to modify the kinetic mechanism of the reaction, but the rates of peptidic-bond hydrolysis are much slowed down.

To show that the overall change of selectivity was mainly due to a slowing down of the hydrolysis of some sites interacting with the support, we focused our attention on a marker peptide observable in both homogeneous and

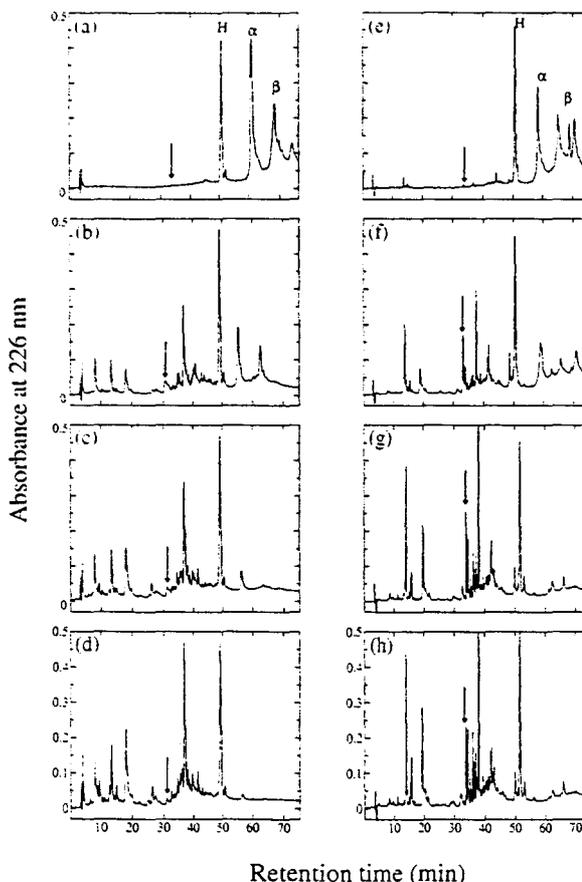


Figure 4 Time-course of haemoglobin hydrolysis studied by RP-HPLC

Incubation times had the following corresponding conversion rates (%). Denatured haemoglobin in solution: (a) 30 s, 13%; (b) 30 min, 37%; (c) 3 h, 94%; (d) 7 h, 99%. Denatured haemoglobin on resin: (e) 15 min, 15%; (f) 8 h, 35%; (g) 48 h, 93%; (h) 72 h, 99%. The arrows indicate the position of peptide 1-14x. The first elution gradient was modified by adding a 15-min isocratic step at 23.5% eluant B (see the Materials and methods section).

heterogeneous systems but with very different behaviours in each system. We chose to follow the evolution of the peak of retention time 23 min, which corresponds to a pure peptide and is shown by an arrow (Figure 4). This fraction was well defined, very well represented in the course of heterogeneous-phase kinetics and in very different quantities during hydrolysis in homogeneous solution. In solution, the shape of the peak was very wide, probably due to interactions in a different peptidic environment. The purity of the peptide was verified by integration with the Millennium software and by MS (Figure 5). The peptide was isolated by a one-step RP-HPLC. Its molecular mass, 1429 Da, was determined by matrix-assisted laser desorption ionization MS. UV-spectral determination indicated the presence of a tryptophan residue as a unique aromatic residue. According to the bovine haemoglobin sequence data bank, the isolated peptide

E. Kosciarz and others

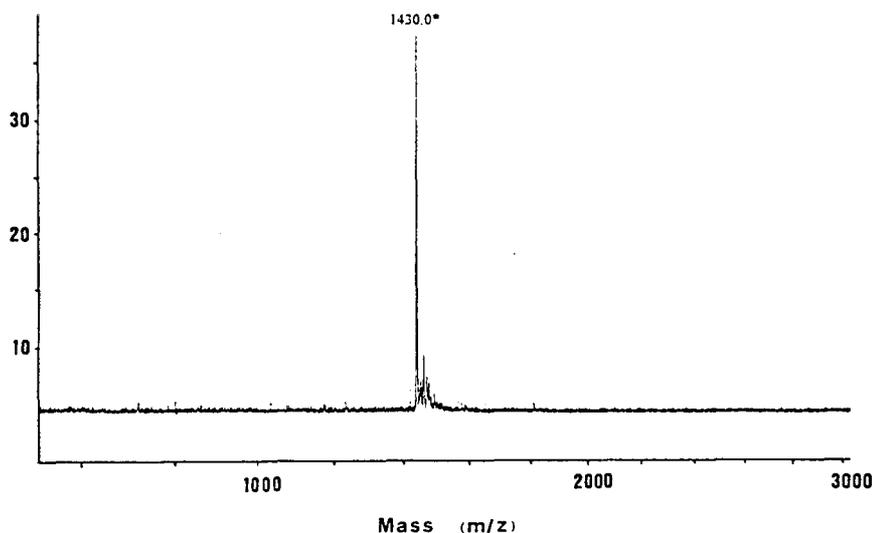


Figure 5 MALDI mass spectrum of peptide I-14x isolated by HPLC

The mass of the I-14x peptide as a positive ion is shown (\*). y-axis, signal intensity in arbitrary units.

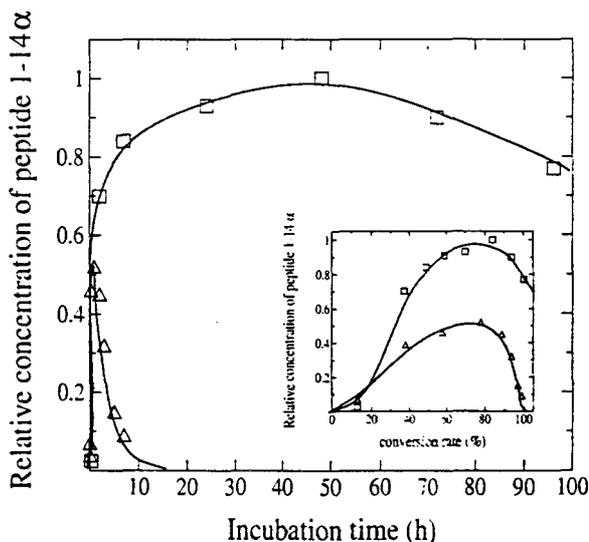
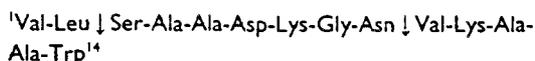


Figure 6 Time course of the relative amounts of peptide I-14x obtained in homogeneous ( $\Delta$ ) and in heterogeneous ( $\square$ ) phases

Insert: relative amounts of peptide I-14x as a function of conversion rate.

corresponds to the first 14 amino acids of the N-terminal part of the  $\alpha$  chain (I-14x):



In the course of the homogeneous-phase catalysis, the peptide I-14x is a transient intermediate (Figure 6) that is

present very early in the digestion mixture with a maximum concentration at 2 h but is subsequently proteolysed since no trace could be found after 10 h. In contrast, during the heterogeneous-phase catalysis, peptide I-14x was produced at its maximal concentration in quantities twice as high as in homogeneous-phase hydrolysis and, at the end of the hydrolysis, 80% of the peptide was remaining. The fact that curves of peptide appearance as a function of haemoglobin-chain conversion rate were similar in both homogeneous and heterogeneous phases (Figure 6, insert) confirms that the kinetic mechanism is the same in the two systems. The role of the sulphonic hydrophobic resin would be to protect some bonds from further digestion and to allow the accumulation of intermediate peptides. Such an example would be the peptide I-14x: two potential sites (indicated by arrows, see above) are present, i.e.  $\text{Leu}^2\text{-Ser}^3$  and  $\text{Asn}^9\text{-Val}^{10}$  [26], but these peptidic bonds, contrary to the hydrolysis of haemoglobin in solution, are very slowly hydrolysed in heterogeneous phase. This protection might be due to either the high hydrophobicity of the environment or the positive charges around this site.

This peptide I-14x is interesting as it contains two lysyl residues, which are positively charged at pH 6. It includes a tryptophan residue as the C-terminal amino acid, which corresponds to a normal splitting site for  $\alpha$ -chymotrypsin. It constitutes a part of peptide I-23x, which was obtained by peptic haemoglobin hydrolysis in an ultrafiltration reactor followed by a purification at pilot-plant scale and which is an effective PP IX carrier [17]. According to Eisenberg et al. [27], the mean hydrophobic moment per residue and mean hydrophobicity per residue of peptide I-14x were estimated

to be 0.22 and 0.15 respectively. As these values are slightly higher than those of the peptide 1-23x (0.05 and 0.14), peptide 1-14x would be an efficient carrier for PP IX. Experiments are currently being carried out to scale up the hydrolysis of haemoglobin in the heterogeneous phase to prepare this peptide in higher quantities and to study its capacity as a PP IX carrier.

### Conclusion

Our results prove that the hydrolysis of haemoglobin in the heterogeneous phase by its adsorption on a negatively charged hydrophobic support involved a dramatic change in the selectivity of the chymotryptic reaction. A peptidic hydrolysate with a better porphyrin-solubilizing capacity than that obtained by hydrolysing haemoglobin in solution was generated. The kinetic evolution of a marker peptide showed that this change of selectivity could be due to a slowing down of the cut-off of some sites interacting with the support. Confirmation of this suggestion would require complete analysis of all peptides of the hydrolysates.

These results show that the heterogeneous-phase enzymic hydrolysis of proteins adsorbed on to support carrying functional groups would be of great interest in enzyme engineering. Indeed, this kind of hydrolysis allows us to modify the functional properties of peptidic hydrolysates or to produce hydrolysates enriched with peptides possessing specific properties to make their preparation easier.

### References

- Jost, R., Monti, J. C. and Pahud, J. J. (1987) *Food Technol.* **41**, 118-121
- Silk, D. B. A., Grimble, G. H. and Rees, R. G. (1985) *Proc. Nutr. Soc.* **44**, 63-72
- Marshall, W. E. (1994) in *Functional Foods. Designer Foods. Pharma Foods Nutraceuticals* (Golberg, J., ed.), pp. 242-260, Chapman and Hall, New York
- Meisel, M., Frister, H. and Schlimme, E. (1989) *Z. Ernährungswiss.* **28**, 267-278
- Gunther, R. C. (1979) *J. Am. Oil Chemists Soc.* **56**, 345-349
- Zioudrou, C., Streaty, R. A. and Klee, W. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 2446-2449
- Lecoeur, C., Zhao, Q. Y., Garreau, I., Sannier, F., Maurice, M., Durand, P. and Piot, J. M. (1995) *J. Liq. Chromatogr.* **18**, 2353-2371
- Bouhallab, S. and Touzé, C. (1995) *Lait* **75**, 251-258
- Cempel, N., Aubry, J. M., Piot, J. M. and Guillochon, D. (1995) *Biotechnol. Appl. Biochem.* **21**, 287-294
- Cheryan, M. and Menais, M. A. (1986) in *Membrane Separations in Biotechnology* (McGregor, C. W., ed.), pp. 255-301, Marcel Dekker, New York
- Bouhallab, S., Mollé, D. and Léonil, J. (1993) *Biotechnol. Lett.* **15**, 697-702
- Dalgalarondo, M., Dufour, E., Chobert, J. M., Bertrand-Harb, C. and Haertlé, T. (1995) *Dairy J.* **5**, 1-14
- Houen, G. and Sandø, T. (1991) *Anal. Biochem.* **193**, 186-190
- Piot, J. M., Guillochon, D., Leconte, D. and Thomas, D. (1988) *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **42**, 147-156
- Léké, A., Piot, J. M., Sannier, F., Guillochon, D., Ricard, J. P., Postel, J. P., Risbourg, J. P. and Canarelli, J. P. (1990) *Nutr. Clin. Metabol.* **4**, 223-229
- Dive, D., Piot, J. M., Sannier, F., Guillochon, D., Charet, P. and Lustrat, S. (1989) *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 165-169
- Kosciarz, E., Rofidal, F., Dossou-Yovo, I., Vercaigne-Marko, D., Nedjar-Arroume, N., Dhulster, P. and Guillochon, D. (1998) *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **71**, 35-42
- Lebrun, F., Bazus, A., Dhulster, P. and Guillochon, D. (1998) *J. Agri. Food Chem.* **46**, 5017-5025
- Lignot, B., Froidevaux, R., Nedjar-Arroume, N. and Guillochon, D. (1999) *Biotechnol. Appl. Biochem.* **29**, 25-30
- Pitt-Rivers, R. and Impicciato, F. S. A. (1968) *Biochem. J.* **109**, 825-830
- Zhao, Q. Y., Sannier, F., Ricart, G. and Piot, J. M. (1995) *J. Liq. Chromatogr.* **18**, 1077-1092
- Antonini, E. and Brunori, M. (1971) in *Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands* (Neuberger, A. and Tatum, E. L., eds.), pp. 98-130, North Holland, Amsterdam
- Hayashi, T., Itagaki, H., Fukuda, T., Tamura, U., Sato, Y. and Suzuki, Y. (1995) *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 540-543
- Barret, A. J. and McDonald, J. K. (1980) in *Mammalian Proteases: a Glossary and Bibliography. Endopeptidases, vol. 1* (Barret, A. J. and McDonald, J. K., eds.), pp. 18-29, Academic Press, London
- Linderström-Lang, K. (1952) *Proteins and Enzymes. III. The initial stages in the breakdown of proteins by enzymes. Lane medical lectures, vol. VI*, pp. 53-72, Stanford University Press, California
- Hill, R. J. and Königsberg, W. (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 3151-3156
- Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M. and Wall, R. (1984) *J. Mol. Biol.* **179**, 125-142

Received 15 March 1999/21 June 1999; accepted 30 June 1999

