

Année : 2001

n° 2892

UNIVERSITE DE LILLE 1

**PROJET DE THESE**

Pour l'obtention



du titre de Docteur de l'université de Lille 1  
Option : Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

*par***Rénato FROIDEVAUX****Mise en œuvre de la pepsine de porc dans un système de solvants biphasiques  
pour la préparation de peptides opioïdes à partir de l'hémoglobine bovine**

Soutenance prévue le 5 janvier 2001

Préparée au Laboratoire de Technologie des Substances Naturelles  
IUT « A » - Département de Génie Biologique

Mme BIGAND M.	Maître de Conférences (Université de Lille 1)	Examineur
Mr DHULSTER P.	Professeur (Université de Lille 1)	Examineur
Mr GUILLOCHON D.	Professeur (Université de Lille 1)	Directeur de Thèse
Mlle LANGE C.	Professeur (Université de Rouen)	Rapporteur
Mr LAVAL J.M.	Professeur (Université de Technologie de Compiègne)	Rapporteur
Mme NEDJAR-ARROUME N.	Maître de Conférences (Université de Lille 1)	Examineur

# SOMMAIRE

Page

<b>ABREVIATIONS</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>2</b>
<b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES SUR LA MISE EN EVIDENCE, L'ISOLEMENT ET LA CARACTERISATION DE PEPTIDES ACTIFS A PARTIR DE L'HEMOGLOBINE BOVINE</b>	<b>7</b>
<b>I. Rappels sur la structure de l'hémoglobine bovine et de la pepsine de porc</b>	<b>8</b>
<b>II. Séquences peptidiques à activités biologiques</b>	<b>10</b>
<b>III. Séquences peptidiques possédant des propriétés amphiphiles ou organo-leptiques</b>	<b>23</b>
<b>IV. Techniques chromatographiques d'isolement et de caractérisation des peptides</b>	<b>28</b>
<b>V. Extraction liquide-liquide des peptides</b>	<b>31</b>
<b>VI. Approche méthodologique des mélanges</b>	<b>32</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>34</b>
<b>I. Dosage de l'hémoglobine</b>	<b>35</b>
<b>II. Dénaturation de l'hémoglobine par l'urée</b>	<b>35</b>
<b>III. Dosage de l'activité de la pepsine en solution</b>	<b>36</b>
<b>IV. Suivi de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine en solution</b>	<b>37</b>
<b>V. Extraction liquide/liquide des hydrolysats pepsiques</b>	<b>39</b>
<b>VI. Suivi de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine en système biphasique</b>	<b>40</b>
<b>VII. Insolubilisation de la pepsine</b>	<b>40</b>
<b>VIII. Suivi de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine insolubilisée</b>	<b>42</b>
<b>IX. Détermination du degré d'hydrolyse par la méthode au TNBS</b>	<b>42</b>
<b>X. Méthodes d'analyse des peptides</b>	<b>45</b>

<b>X.3. Couplage de la Chromatographie Liquide Haute Performance en phase inverse avec la Spectrométrie de Masse à Ionisation par ElectroSpray</b>	<b>47</b>
<b>X.4. Analyse des acides aminés par dérivation au PITC</b>	<b>48</b>
<b>XI. Détermination des coefficients de partage</b>	<b>50</b>
<b>XII. Adsorption de la LVV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-7 sur des résines</b>	<b>51</b>
<b>XIII. Plan de mélanges</b>	<b>52</b>
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>54</b>
<b>CHAPITRE I. INCIDENCE DU MECANISME DE L'HYDROLYSE PEPSIQUE SUR L'OBTENTION DES PEPTIDES ACTIFS</b>	<b>55</b>
<b>I.1. Effet de solvant sur le mécanisme d'hydrolyse</b>	<b>57</b>
<b>I.2. Effet de solvant sur les cinétiques d'apparition de peptides à activités biologiques</b>	<b>63</b>
I.2.1. Peptides opioïdes LVV-hémorphine-7 et VV-hémorphine-7	69
I.2.2. Peptide potentialisateur de la Bradykinine	75
I.2.3. Peptide analgésique néokyotorphine	78
I.2.4. Peptide opioïde VV-hémorphine-4	81
<b>CHAPITRE II. ANALYSE DE LA CINETIQUE D'APPARITION DES HEMORPHINES PAR COUPLAGE DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE AVEC LA SPECTROMETRIE DE MASSE</b>	<b>89</b>
<b>II.1. Effet de la concentration en hémoglobine sur la cinétique de la réaction d'hydrolyse à E/S constant</b>	<b>92</b>
<b>II.2. Suivi de la cinétique d'apparition des hémorphines par couplage de la CLHP en phase avec la SM-IES</b>	<b>95</b>
<b>CHAPITRE III ANALYSE QUANTITATIVE : MISE AU POINT D'UNE PROCEDURE DE QUANTIFICATION DES HEMORPHINES</b>	<b>107</b>
<b>III.1. Séparation des hémorphines à l'échelle préparative</b>	<b>109</b>
<b>III.2. Analyse spectrale des hémorphines</b>	<b>114</b>

III.2.1. Spectrométrie UV des acides aminés aromatiques	114
III.2.2. Spectrométrie UV des hémorphines	115
III.2.3. Détermination de la proportion d'acides aminés aromatiques dans les hémorphines	118
<b>III.3. Analyse quantitative des hémorphines</b>	<b>123</b>
<b>III.4. Identification et dosage des hémorphines dans un hydrolysate d'hémoglobine</b>	<b>125</b>
<b>CHAPITRE IV . MISE EN ŒUVRE DE L'HYDROLYSE PEPSIQUE DE L'HEMOGLOBINE DANS UN SYSTEME DE SOLVANTS BIPHASIQUES POUR LA PREPARATION DES HEMORPHINES</b>	<b>130</b>
<b>IV.1 Extraction de la LVV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-7 à partir d'hydrolysats peptiques de l'hémoglobine bovine</b>	<b>133</b>
<b>IV.2. Etude de l'extraction de la LVV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-7 au cours de la réaction enzymatique par le système octan-1-ol / butan-2-ol</b>	<b>140</b>
IV.2.1. Etude de la dénaturation de l'hémoglobine dans le système biphasique tampon / butan-2-ol	140
IV.2.2. Etude de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine dans le système tampon / butan-2-ol	142
IV.2.3. Etude de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine dans le système tampon / octan-1-ol	147
IV.2.4. Etude de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine dans le système tampon / octan-1-ol / butan-2-ol	152
<b>CHAPITRE V. UTILISATION D'UN PLAN DE MELANGES POUR LA MISE AU POINT D'UN REACTEUR AVEC LA PEPSINE INSOLUBILISEE DANS UN SYSTEME DE SOLVANTS BIPHASIQUES POUR LA PREPARATION DES HEMORPHINES</b>	<b>160</b>
<b>V.1. Optimisation de l'extraction de la LVV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-7 au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine insolubilisée</b>	<b>163</b>
V.1.1. Insolubilisation de la pepsine	163
V.1.2. Mise en place des plans de mélanges pour l'optimisation de l'extraction de la LVV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-7	167

<i>V.1.2.1. Domaine expérimental</i>	167
<i>V.1.2.2. Modèles de surfaces de réponses</i>	168
<i>V.1.2.3. Avantages et inconvénients</i>	169
<i>V.1.2.4. Les Réseaux Simplexes Centrés de Scheffé</i>	171
<i>V.1.2.5. Points tests</i>	172
<i>V.1.2.6. Mélanges avec contraintes</i>	172
V.1.3. Mise en application des plans de mélanges pour optimiser l'extraction des hémorphines au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine insolubilisée	175
<b>V.2. Mise au point d'une méthode de récupération des hémorphines à partir du mélange butan-2-ol / octan-1-ol</b>	<b>187</b>
V.2.1. Etude de l'adsorption de la LVV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-7 par des résines hydrophobes	187
V.2.2. Etude de l'adsorption de la LVV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-7 sur l'alumine	191
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>195</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>200</b>

## PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES

TFA	Acide TriFluoroAcétique
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
SM	Spectrométrie de Masse
IES	Ionisation ElectroSpray
LVVh-7	LVV-hémorphine-7
VVh-7	VV-hémorphine-7
VVh-4	VV-hémorphine-4
DH	Degré d'Hydrolyse
DHc	Degré d'Hydrolyse Corrigé

## **INTRODUCTION GENERALE**

L'hydrolyse enzymatique ménagée des protéines est pratiquée depuis longtemps, dans les industries alimentaires pour améliorer leurs propriétés organoleptiques ou fonctionnelles telles que la solubilité, les propriétés émulsifiantes, gélifiantes etc. L'hydrolyse plus poussée des protéines a également pris de l'importance avec la préparation d'hydrolysats peptidiques à destination des aliments et des boissons, de la formulation d'aliments infantiles hypoallergéniques (Cordle et coll. 1991 et 1994 ; Kleinmann et coll., 1991) et de la nutrition thérapeutique (Cordano et Cook, 1985). Plus récemment de nouvelles approches se sont développées pour identifier et isoler, à partir de protéines agro-alimentaires, des peptides à activités biologiques. Ces peptides, purifiés ou au sein de fractions peptidiques, intéressent les industries pharmaceutiques et l'alimentation fonctionnelle (aliments-santé). Ainsi, des peptides ont été isolés à partir d'hydrolysats de caséines (Schlimme et Meisel, 1995), de protéines de soja (Gunther, 1979), de gluten (Zioudrou et coll., 1979) etc.... Ces séquences peptidiques recouvrent de nombreuses activités telles que immunostimulantes (Werner et coll., 1986), antithrombotiques (Bouhallab et Touzé, 1995), anti-microbiennes (Bellamy et coll., 1993), opioïdes (Fiat et Jolles, 1989) etc...

A coté des sources protéiques classiques comme le lait, le soja et les céréales, le sang des abattoirs représente pour l'industrie une source non conventionnelle, très attrayante. L'hémoglobine bovine est une protéine abondante (30000 tonnes produites chaque année en France), mal valorisée et qui constitue encore un déchet très polluant. Mais c'est aussi un substrat protéique exceptionnel par son homogénéité (le cruor, fraction globulaire du sang des abattoirs, comprend plus de 90 % d'hémoglobine) et sa définition ; l'hémoglobine est l'une des protéines les mieux caractérisées de la nature. Des études menées dans notre laboratoire sur la préparation à l'échelle pilote d'un hydrolysat pepsique d'hémoglobine bovine (Piot et coll., 1988), et sur son utilisation pour la nutrition thérapeutique des prématurés (Léké, 1994), ont montré l'intérêt des hydrolysats peptidiques d'hémoglobine. Ces dernières années, il a été montré que l'hémoglobine bovine donne, après hydrolyse par la pepsine ou la trypsine, des peptides qui présentent des activités analgésiques, potentialisateur de la Bradykinine, opioïdes etc... (Ivanov et coll., 1997). Au laboratoire, nous avons mis en évidence et caractérisé, dans un hydrolysat pepsique d'hémoglobine, également obtenu à pH 2, deux peptides opioïdes nommés la LVV-hémorphine-7 ( $\beta(31-40)$ ) et la VV-hémorphine-7 ( $\beta(32-40)$ ) (Piot et coll., 1992a).

La préparation de peptides à activités biologiques, ou de fractions peptidiques enrichies en ces peptides, à partir de protéines issues de l'agriculture, présente un grand

intérêt industriel. Cependant cet objectif est difficile à atteindre, car généralement l'obtention de ces peptides est mal maîtrisée. En effet ces peptides actifs sont fréquemment des peptides intermédiaires et leurs concentrations dans les hydrolysats protéiques finaux sont faibles ; de plus leur isolement, à partir d'hydrolysats protéiques complexes, contenant souvent plus d'une centaine de peptides, doit être réalisé par des techniques de fractionnement et de purification lourdes mettant en oeuvre plusieurs étapes chromatographiques. Aussi des recherches ont été entreprises pour essayer de lever ces obstacles. Bouhallab et coll. (1992) ont étudié la production de peptides présentant une activité antithrombotique par hydrolyse du caséinomacropéptide de la caséine K par la trypsine dans un réacteur à ultrafiltration. Afin de simplifier les étapes de purification, certains auteurs ont extrait des peptides amers (Aubes-Dufau et coll. 1995, Aubes-Dufau et Combes, 1997) et des peptides opioïdes (Piot et coll., 1998) à partir d'hydrolysats pepsiques d'hémoglobine par le butan-1-ol et le butan-2-ol. Enfin d'autres auteurs ont étudié la modification de la sélectivité de la réaction protéasique afin de stabiliser des peptides intermédiaires par des solvants miscibles à l'eau tels que l'éthanol et le glycérol lors de l'hydrolyse de la  $\beta$ -lactoglobuline (Dalgalarondo et coll., 1995), de l'albumine bovine (Houen et Sando, 1991), des caséines (Tchorbanov et Iliev, 1993) ou du gluten (Hertmanni et coll., 1991).

L'objectif de nos recherches s'inscrit dans la même perspective ; essayer d'orienter la sélectivité de la réaction protéasique vers l'obtention de deux peptides opioïdes la LVV-hémorphine-7 et la VV-hémorphine-7, par hydrolyse pepsique de l'hémoglobine dans un système de solvants biphasiques. L'hydrolyse de l'hémoglobine comprend de nombreuses étapes irréversibles consécutives ou parallèles ; en milieu aqueux la composition de la population peptidique finale obtenue est sous contrôle cinétique. L'introduction de phénomènes de partage au cours de la cinétique, grâce à l'emploi de solvants non miscibles à l'eau, et solubilisant des peptides intermédiaires, pourrait permettre de favoriser, à la fois la formation et l'extraction de ces peptides. Les hémorphines sont des peptides hydrophobes et se prêtent bien à cette démarche. Nous avons suivi les cinétiques d'apparition de ces peptides intermédiaires au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine dans des solvants biphasiques eau-alcools, puis optimisé leur mise en oeuvre avec la pepsine insolubilisée dans la perspective de constituer un réacteur ouvert.

Après des rappels bibliographiques relatifs à la mise en évidence, l'isolement et la caractérisation de séquences peptidiques de l'hémoglobine bovine ayant des activités biologiques, nous avons développé notre approche en cinq parties.

Dans le premier chapitre, nous avons étudié les cinétiques d'apparition de peptides à activités biologiques libérés au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine par Chromatographie Liquide Haute Performance. Après une étude de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine dans un tampon à pH 4,5 en présence de 20 % (v/v) d'éthanol, un solvant stabilisant de l'hémoglobine ou en présence d'urée, un agent dénaturant, nous avons montré que la dénaturation de l'hémoglobine par l'urée permet l'apparition optimale de tous ces peptides. Cet effet est particulièrement marqué dans le cas de deux peptides opioïdes : la LVV-hémorphine-7 et la VV-hémorphine-7. A partir de ces hydrolysats pepsiques, nous avons isolé en une seule étape de Chromatographie Liquide Haute Performance en phase inverse, cinq peptides à activités biologiques. Parmi ces cinq peptides, un peptide opioïde nommé la VV-hémorphine-4 ( $\beta(32-37)$ ) a été isolé pour la première fois par hydrolyse de l'hémoglobine bovine. Ces travaux ont fait l'objet de deux articles parus dans *Biotechnology and Applied Biochemistry*.

Les procédures de préparation de ces peptides à activité opioïde nécessitent leur isolement par des techniques séparatives de chromatographies liquides, puis leur identification par les techniques de spectrométrie de masse du type FAB, MALDI ou encore IES (Ionisation par ElectroSpray). Ces procédures restent laborieuses et demandent du temps.

Le second chapitre décrit le couplage de la chromatographie liquide haute performance en phase inverse avec la spectrométrie de masse à ionisation par électrospray, appliqué au suivi de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine dénaturée par l'urée. Cette technique nous a permis d'isoler et de caractériser en une seule étape les trois peptides opioïdes la LVVh-7, la VVh-7 et la VVh-4, qui apparaissent successivement au cours de l'hydrolyse. Nous avons ensuite déterminé les conditions optimales permettant l'obtention de ces trois hémorphines. Ces travaux ont fait l'objet d'un article paru dans *Journal of Chromatography A*.

Le troisième chapitre décrit l'isolement de ces trois hémorphines par CLHP en phase inverse à l'échelle préparative et la construction d'une librairie spectrale, grâce à l'emploi d'un détecteur à barrettes de diodes. Nous avons établi à partir de cette librairie une procédure d'identification et de quantification rapide de chaque hémorphine apparaissant au cours de l'hydrolyse pepsique. Cette approche a permis de suivre les concentrations des trois peptides opioïdes au cours de l'avancement de la réaction enzymatique et de mettre en évidence pour chacun d'eux le degré d'hydrolyse correspondant à leur concentration maximale.

Dans le quatrième chapitre nous décrivons la mise au point d'un système de solvants biphasiques permettant l'extraction de la LVV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-7 au cours de la réaction d'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine. Ce système devait permettre à la fois d'extraire efficacement ces hémorphines pour faciliter l'accumulation de ces peptides-intermédiaires d'hydrolyse et de préserver la stabilité et l'activité de la pepsine. Cette approche constitue une étape vers la conception d'un futur réacteur ouvert pour la production de ces hémorphines. Le mélange non miscible à l'eau constitué de butan-2-ol et d'octan-1-ol s'est avéré le plus efficace vis à vis de l'ensemble des ces objectifs.

Dans le dernier chapitre, nous avons utilisé la technique des plans d'expériences pour optimiser le mélange tampon/butan-2-ol/octan-1-ol vis à vis de l'extraction de la LVVh-7 et de la VVh-7, au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine immobilisée sur une résine échangeuse d'ions, toujours dans l'optique de la conception d'un futur réacteur. Ces travaux ont fait l'objet d'un article accepté pour publication dans *Biotechnology and Applied Biochemistry*.

La récupération des hémorphines par évaporation des deux solvants organiques est rendue impossible à cause de leur point d'ébullition trop élevé. Nous avons donc recherché un moyen d'adsorber les deux hémorphines sur un support solide. Ce support nous a permis de recouvrer totalement et rapidement les deux peptides actifs, et d'envisager le couplage de l'extraction des deux hémorphines au cours de la réaction enzymatique, leur recouvrement par adsorption sur le support et enfin le recyclage du solvant.

**Rappels bibliographiques sur la mise en évidence,  
l'isolement et la caractérisation de peptides actifs à  
partir de l'hémoglobine bovine**

## **I. Rappels sur la structure de l'hémoglobine bovine et de la pepsine de porc.**

L'hémoglobine bovine est une protéine globulaire de masse moléculaire 64500 Daltons. C'est un tétramère qui comprend deux protomères  $\alpha$  et deux protomères  $\beta$ . Chaque protomère contient un hème à protoporphyrine IX complexé à un atome de fer; une molécule d'hémoglobine peut ainsi fixer quatre molécules d'oxygène. La chaîne  $\alpha$  est constituée de 141 acides aminés et la chaîne  $\beta$  de 145 acides aminés. La figure 1 illustre les séquences en acides aminés des deux chaînes polypeptidiques  $\alpha$  et  $\beta$ . Nous avons résumé les propriétés physico-chimiques des chaînes latérales des acides aminés en distinguant les acides aminés hydrophobes, hydrophiles basiques et acides. Les acides aminés ont été considérés comme hydrophobes pour une hydrophobicité supérieure à 1500 cal/mol par référence à l'échelle de C.C. Bigelow (1967). Il est ainsi possible de se rendre compte grossièrement de la répartition des résidus en fonction de leurs caractères hydrophobes et hydrophiles, le long des chaînes peptidiques.

### Chaîne $\alpha$

V<sup>1</sup>LSAADKGNV<sup>10</sup>KAAWGKVGGH<sup>20</sup>AAEYGAEALE<sup>30</sup>RMFLSFPTTK<sup>40</sup>TYFPHF  
DLSH<sup>50</sup>GSAQVKGHGA<sup>60</sup>KVAAALTKAV<sup>70</sup>EHLDDLPGAL<sup>80</sup>SELSDLHAHK<sup>90</sup>LR  
VDPVNFKL<sup>100</sup>LSHLLVTLA<sup>110</sup>SHLPSDFTPA<sup>120</sup>VHASLDKFLA<sup>130</sup>NVSTVLTSK  
Y<sup>140</sup>R

### Chaîne $\beta$

M<sup>1</sup>LTAEKAAV<sup>10</sup>TAFWGKVKVD<sup>20</sup>EVGGEALGRL<sup>30</sup>LVVYPWTQRF<sup>40</sup>FESFGD  
LSTA<sup>50</sup>DAVMNPNKVK<sup>60</sup>AHGKVKLDSP<sup>70</sup>SNGMKGLDDL<sup>80</sup>KGTFAAELSEL<sup>90</sup>HC  
DKLHVDPE<sup>100</sup>NFKLLGNVLV<sup>110</sup>VVLARNFGKF<sup>120</sup>FTPVLQADFQ<sup>130</sup>KVVAGVA  
NAL<sup>140</sup>AHRYH

V : Val ; L : Leu ; S : Ser ; A : Ala ; D : Asp ; K : Lys ; G : Gly ; N : Asn ; T : Thr ; H : His ;  
E : Glu ; F : Phe ; R : Arg ; Q : Gln ; W : Trp ; Y : Tyr ; P : Pro ; M : Met ; C : Cys.

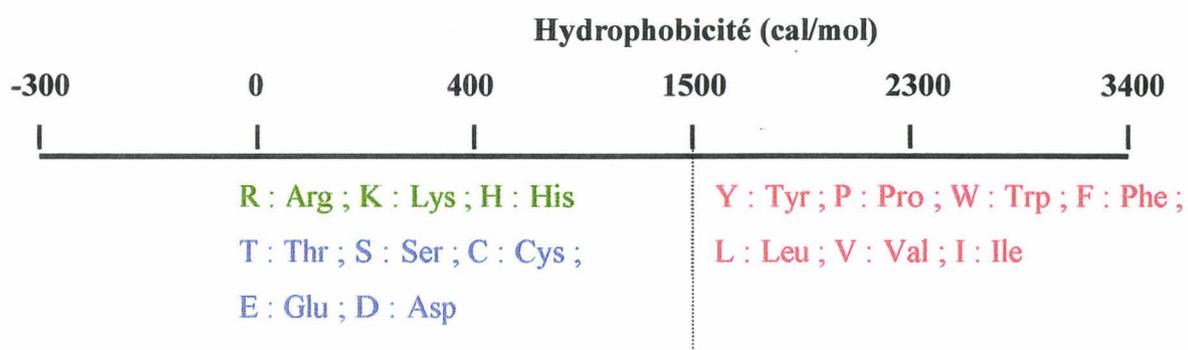


Figure 1. Séquence en acides aminés des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine bovine.

**La pepsine A de porc** est une endoprotéase de masse moléculaire 35400 Daltons et qui appartient à la famille des protéases à acide aspartique, incluant la chymosine, la rénine, la cathepsine D et des enzymes microbiales apparentées telles que l'endothiapepsine et la penicillopepsine (J. Tang 1977). Elle est constituée d'une chaîne protéique repliée formant deux lobes, le lobe *pep* et le lobe *sin*. Elle est structurellement caractérisée par l'existence de deux domaines, chacun impliqué dans le site actif via la triade invariable Asp-Thr-Gly. Le substrat se loge dans une crevasse et les résidus aspartiques catalytiques sont situés entre les deux domaines (DR. Davies 1990). L'activité catalytique maximale de la pepsine se situe à pH acide (pH 2). En milieu alcalin le lobe *pep* est dénaturé provoquant la dénaturation de la pepsine et la perte de l'activité pepsique.

## **II. Séquences peptidiques à activités biologiques.**

Des équipes (Schally et coll. 1978, Ivanov et coll. 1993) ont mené des travaux sur l'isolement de nouveaux peptides actifs, à partir d'extraits d'organes de porcs ou de bovins (hypothalamus, cerveau...). Leurs investigations se situaient dans le cadre de la recherche d'un lien entre ces peptides et une fonction de l'organe, dans le but de produire un test pour évaluer la fonction de l'organe, après fractionnement des extraits contenant ces peptides actifs.

Cette démarche leur a permis d'isoler et d'identifier de nombreux peptides à activités biologiques (analgésique, opioïde...).

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

Après les découvertes de Brantl et coll. (1986) d'autres équipes ont isolé des peptides actifs, à partir de l'hydrolyse *in vitro* de l'hémoglobine bovine (Piot et coll. 1992a, Ivanov et coll. 1997, Zhao et coll. 1998a, Vercaigne-Marko et coll. 2000).

Aujourd'hui, à partir de l'hémoglobine plus de 150 fragments ont été isolés, et les activités biologiques de plus de 18 d'entre eux ont été déterminées (A.A. Karelin et coll. 1995). Les études systématiques sur la reconnaissance de fragments actifs dans l'hémoglobine sont résumées dans les tableaux suivants. Ces tableaux décrivent : la séquence du peptide actif et la chaîne où cette séquence est retrouvée dans l'hémoglobine ; la source à l'origine de son

premier isolement ; si le peptide a déjà été isolé à partir de l'hémoglobine bovine ; le mode d'hydrolyse (enzymatique ou chimique) utilisé pour son isolement. Dans ces tableaux, les séquences mises en évidence à ce jour ont été données par grandes familles d'activités biologiques.

## II.1 Famille des kyotorphines

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

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

## II.2. Peptides potentialisateurs de la Bradykinine

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

Séquence	Fragment dans l'hémoglobine bovine	Première source d'isolement	Mode d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine pour son isolement	Activité(s)	Références
ASHLPSDFTPAVHASL	$\alpha$ 110-125	Hémoglobine bovine	Pepsine	-Potentialise l'action de la quinine (test réalisé sur l'iléon de cobaye)	Ivanov et coll. (1997)
LANVST	$\alpha$ 129-134	Hémoglobine bovine	Pepsine	-Potentialise l'action de la quinine (test réalisé sur l'iléon de cobaye)	Piot et coll. (1992b)

## II.3. Peptide hypolipidémiant

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

Séquence	Fragment dans l'hémoglobine bovine	Première source d'isolement	Mode d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine pour son isolement	Activité(s)	Références
VVYP	$\beta$ 32-35	Hémoglobine bovine <sup>a</sup>	Protéase acide <sup>a</sup>	-Inhibe l'adsorption des graisses au niveau de l'appareil digestif <sup>b</sup> -Engendre l'activité de la lipase hépatique (EC 3.1.1.3) sur les triglycérides chez les souris <sup>a</sup>	<sup>a</sup> Kagawa et coll. (1996) <sup>b</sup> Kagawa et coll. (1998)

## II.4. Peptides hématopoïétiques

L'appellation "hématopoïétique" est liée au rôle de ces peptides dans l'hématopoïèse, c'est-à-dire la formation des globules rouges du sang, qui a lieu principalement dans la moelle rouge des os. La majeure partie des peptides hématopoïétiques sont issus d'une hydrolyse chimique de la chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine.

Séquence	Fragment dans l'hémoglobine bovine	Première source d'isolement	Mode d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine pour son isolement	Activité(s)	Références
LPGALSE KLHVDPE	$\alpha$ 76-82 $\beta$ 94-100	Hémoglobine bovine <sup>a</sup>	Protéase V8 de <i>Staphylococcus aureus</i> <sup>a</sup>	-Restauration de la fonction hématopoïétique de souris soumises à des radiations ou traitées au 5-fluorouracile <sup>b</sup>	<sup>a</sup> Vercaigne-Marko et coll. (2000) <sup>b</sup> Ivanov et coll. (1997)
VLSAADKG VLSAADKGNVKAA VLSAADKGNVKAAWGK SAADKGNV KVGGHAAEYGAEA VGGHAAEYGAEAL VGGHAAEYGAEA AEYGAEAL GAEALER EALE MLTAEKAAVT MLTAEKAA MLTAEKA GKVKVDEVGGEALGRL EVGGEALGRL ARNFGKFF	$\alpha$ 1-8 $\alpha$ 1-13 $\alpha$ 1-16 $\alpha$ 3-10 $\alpha$ 16-28 $\alpha$ 17-29 $\alpha$ 17-28 $\alpha$ 22-29 $\alpha$ 25-31 $\alpha$ 27-30 $\beta$ 2-12 $\beta$ 2-11 $\beta$ 2-10 $\beta$ 16-31 $\beta$ 22-31 $\beta$ 115-122	Moelle rouge des os	Non isolé	-Restauration de la fonction hématopoïétique de souris soumises à des radiations ou traitées au 5-fluorouracile	Ivanov et coll. (1992b)

## II.5. Peptide antimicrobien

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

Séquence	Fragment dans l'hémoglobine bovine	Première source d'isolement	Mode d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine pour son isolement	Activité(s)	Références
FLSFPTTKTYFPFDL SHGSAQVKGHGAK	$\alpha$ 33-61	Intestin du tique <i>Boophilus microplus</i>	Non isolé	-Antimicrobien (bactéries Gram positive <i>M. luteus</i> , <i>S. epidermidis</i> ; champignons <i>C. albicans</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>S. cerevisiae</i> )	Fogaça et coll. (1999)

## II.6. Peptides coronaro-constricteurs

Ces peptides vont provoquer l'oblitération des artères coronaires du muscle cardiaque, d'où la dénomination de peptides "coronaro-constricteurs". Parmi ces quatre peptides, aucun n'a été isolé à partir d'une hydrolyse, enzymatique ou chimique, de l'hémoglobine bovine in vitro.

Séquence	Fragment dans l'hémoglobine bovine	Première source d'isolement	Mode d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine pour son isolement	Activité(s)	Références
VVYPW	β 32-36	Hypothalamus bovin	Non isolé	-Coronaro-constricteur	Barkhudaryan et coll. (1992)
VLSAADKGNVKA AW GKVGGA VAGVANALAHRYH	α 1-21  β 133-145	Hypothalamus bovin	Non isolé	-Coronaro-constricteur	Barkhudaryan et coll. (1993)

## II.7. Peptide stimulateur de la croissance bactérienne

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

Séquence	Fragment dans l'hémoglobine bovine	Première source d'isolement	Mode d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine pour son isolement	Activité	Référence
STADA	β 48-52	Hémoglobine bovine	Pepsine	- Stimule la croissance des bactéries Gram négative	Zhao et coll. (1996a)

## II.8. Famille des hémorphines

La dénomination "hémorphines" est due à l'appellation des peptides présentant une activité opiacée, à partir de l'hémoglobine bovine. Ces peptides actifs forment la famille des hémorphines car ils proviennent tous, par clivages successifs, du segment 31-40 de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine.

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

Séquence	Fragment dans l'hémoglobine bovine	Première source d'isolement	Mode d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine pour son isolement	Activité(s)	Références
LVVYPWTQRF (LVV-hémorphine-7)	$\beta$ 31-40	Hypophalamus de cochon (in vivo) <sup>a</sup>	Pepsine (in vitro) <sup>b</sup>	-Fixation sur un récepteur opiacé spécifique <sup>c</sup> -Inhibition des contractions électriques de l'iléon de cobaye <sup>b</sup> -Inhibition de l'enzyme responsable de la conversion de l'Angiotensine I en Angiotensine II <sup>d</sup> -Coronaro-constricteur <sup>e</sup>	<sup>a</sup> Chang et coll. (1980) <sup>c</sup> Glämsta et coll. (1991) <sup>b</sup> Piot et coll. (1992a) <sup>e</sup> Barkhudaryan et coll. (1993) <sup>d</sup> Zhao et coll. (1994)
VVYPWTQRF (VV-hémorphine-7)	$\beta$ 32-40	Hypophalamus de cochon (in vivo) <sup>a</sup>	Pepsine (in vitro) <sup>b</sup>	-Fixation sur un récepteur opiacé spécifique <sup>c</sup> -Inhibition des contractions électriques de l'iléon de cobaye <sup>b</sup> -Inhibition de l'enzyme responsable de la conversion de l'Angiotensine I en Angiotensine II <sup>d</sup> -Amertume <sup>e</sup>	<sup>a</sup> Chang et coll. (1980) <sup>c</sup> Glämsta et coll. (1991) <sup>b</sup> Piot et coll. (1992a) <sup>d</sup> Zhao et coll. (1994) <sup>e</sup> Aubes-Dufau et coll. (1995)

## Hémorphines (suite)

Séquence	Fragment dans l'hémoglobine bovine	Première source d'isolement	Mode d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine pour son isolement	Activité(s)	Références
LVVYPWTQR (LVV-hémorphine-6)	β 31-39	Glande pituitaire humaine (in vivo) <sup>a</sup>	Non isolé in vitro	-Fixation sur un récepteur opiacé spécifique <sup>a</sup> -Inhibition des contractions électriques de l'iléon de cobaye <sup>a</sup> -Inhibition de l'enzyme responsable de la conversion de l'Angiotensine I en Angiotensine II <sup>b</sup>	<sup>a</sup> Glämsta et coll. (1991) <sup>b</sup> Lantz et coll. (1991)
VVYPWTQR (VV-hémorphine-6)	β 32-39	Hypothalamus bovin (in vivo) <sup>a</sup>	Non isolé in vitro	-Fixation sur un récepteur opiacé spécifique <sup>b</sup> -Coronaro-constricteur <sup>c</sup> -Amertume <sup>d</sup>	<sup>c</sup> Barkhudaryan et coll. (1992) <sup>a</sup> Galoyan (1997) <sup>d</sup> Aubes-Dufau et Combes (1997) <sup>b</sup> Nyberg et coll. (1997)
YPWTQR (hémorphine-6)	β 34-39	Glande pituitaire humaine (in vivo) <sup>a</sup>	Non isolé in vitro	-Fixation sur un récepteur opiacé spécifique <sup>b</sup> -Inhibition des contractions électriques de l'iléon de cobaye <sup>a</sup> -Inhibition de l'enzyme responsable de la conversion de l'Angiotensine I en Angiotensine II <sup>c</sup>	<sup>a</sup> Glämsta et coll. (1991) <sup>b</sup> Nyberg et coll. (1997) <sup>c</sup> Lantz et coll. (1991)
LVVYPWTQ (LVV-hémorphine-5)	β 31-38	Cerveau bovin (in vivo) <sup>a</sup>	Pepsine (in vitro) <sup>b</sup>	-Inhibition des contractions électriques de l'iléon de cobaye <sup>b</sup> -Inhibition de l'enzyme responsable de la conversion de l'Angiotensine I en Angiotensine II <sup>b</sup>	<sup>a</sup> Karelín et coll. (1994) <sup>b</sup> Zhao et Piot (1997b)

## Hémorphines (suite et fin)

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

## II.9. Autres activités

Séquence	Fragment dans l'hémoglobine bovine	Première source d'isolement	Mode d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine pour son isolement	Activité(s)	Références
FLSFPTTKTYFPHF	$\alpha$ 33-46 (1)	Hypothalamus de cochon	Non isolé	-Libération de la corticotropine	Schally et coll. (1978)
FLSFPTTKTYFPHF DL SHGSAQV?	$\alpha$ 33-55? (1)	Cervelet humain	Non isolé	-Marqueur de la maladie d'Alzheimer	Slemmon et coll. (1994)
FLSFPTTKTYFPHF DL SH?	$\alpha$ 33-50? (1)				
FLSFPTTK?	$\alpha$ 33-40? (1)				

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

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

## Conclusion

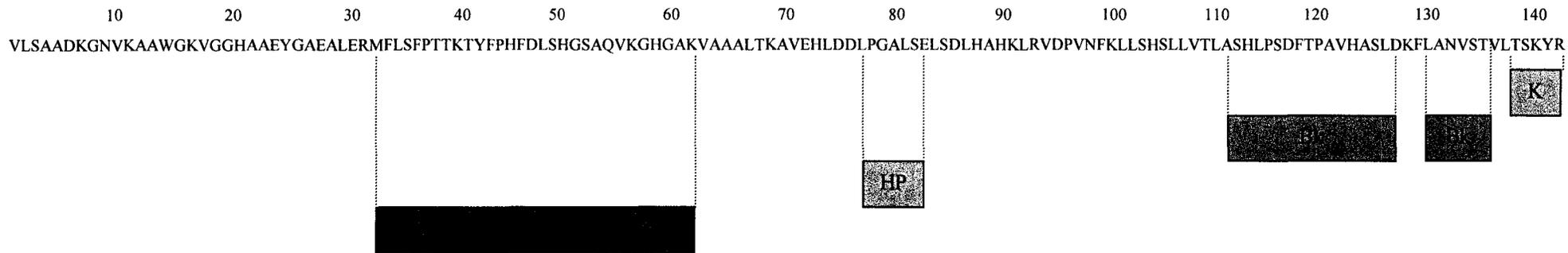
Les figures 3 et 4 récapitulent les régions peptidiques des deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine bovine où ont été isolés les peptides à activité(s) biologique(s): les kyotorphines, les peptides potentialisateurs de la Bradykinine, les peptides hématopoïétiques, les peptides anti microbiens, le peptide hypolipidémiant, les hémorphines et les peptides coronaro-constricteurs.

L'hydrolyse enzymatique de la chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine bovine est génératrice:

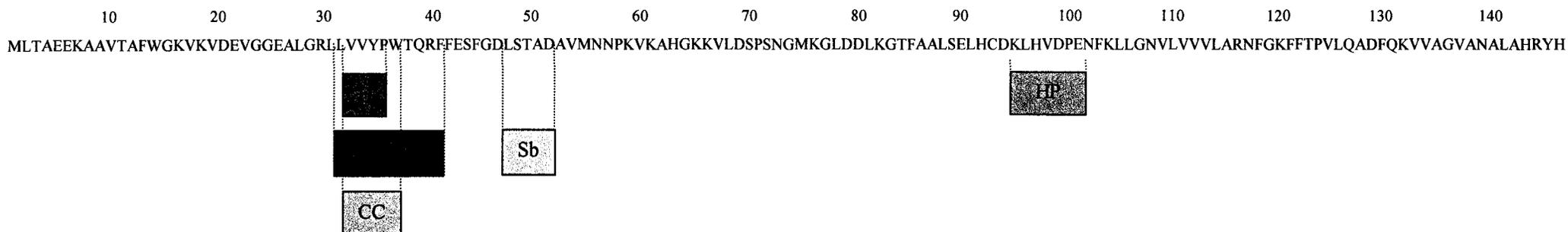
- de la kyotorphine  $\alpha(137-140)$ ;
- des deux peptides potentialisateurs de la Bradykinine  $\alpha(110-125)$  et  $\alpha(129-134)$ ;
- du peptide hématopoïétique  $\alpha(76-82)$ ;

L'hydrolyse enzymatique de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine est génératrice:

- d'un peptide hypolipidémiant  $\beta(32-35)$ ;
- d'un peptide hématopoïétique  $\beta(94-100)$ ;
- d'un peptide stimulateur de la croissance bactérienne  $\beta(48-52)$ ;
- de six hémorphines  $\beta(31-40)$ ,  $\beta(32-40)$ ,  $\beta(31-38)$ ,  $\beta(32-38)$ ,  $\beta(34-38)$  et  $\beta(34-37)$ ;
- de trois peptides amères  $\beta(32-40)$ ,  $\beta(32-39)$  et  $\beta(32-36)$ ;
- et d'un peptide amphiphile  $\beta(1-30)$ .



**Figure 2. Régions de la chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine bovine où sont situées les séquences à activité(s) biologique(s) isolés : la kyotorphine (K), les deux peptides potentialisateurs de la Brabycinine (Bk), le peptide hématopoïétique (HP), le peptide antimicrobien (AM).**



**Figure 3. Régions de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine où sont situées les séquences à activité(s) biologique(s) isolés : le peptide hématopoïétique (HP), le peptide hypolipidémiant (H), le peptide stimulateur de la croissance bactérienne (Sb) et les six hémorphines (HMP).**

### **III. Séquences peptidiques possédant des propriétés amphiphiles ou organoleptiques.**

De même que pour les peptides actifs, nous avons inventorié les peptides possédant des propriétés amphiphiles ou organoleptique(s), qui ont été isolés à partir de l'hémoglobine bovine. Les tableaux suivants sont construits sur les mêmes critères que les tableaux réalisés pour le répertoire des peptides actifs.

### III.1. Peptides à propriétés amphiphiles

Ces peptides sont dits "amphiphiles" car leurs séquences peptidiques possèdent des acides aminés hydrophobes et des acides aminés chargés, conférant à ces peptides une certaine hydrophilie. Cette double caractéristique va leur permettre de solubiliser et de transporter des molécules insolubles. Ces peptides ont tous été isolés dans notre laboratoire, à partir d'hydrolysats protéasiques des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine bovine.

Séquence	Fragment dans l'hémoglobine bovine	Première source d'isolement	Mode d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine pour son isolement	Activité(s)	Références
ASHLPSDFTPAVHASL	$\alpha$ 110-125	Hémoglobine bovine <sup>a</sup>	Pepsine	-Transporteur d'agents photosensibilisants (porphyrines): application en photochimiothérapie des tumeurs	Cempel et coll. (1995)
VLSAADKGNVKAAWGKVGGA AE	$\alpha$ 1-23	Hémoglobine bovine	Pepsine	-Transporteur d'agents photosensibilisants (porphyrines): application en photochimiothérapie des tumeurs	Kosciarz et coll. (1998)
VLSAADKGNVKAAW	$\alpha$ 1-14	Hémoglobine bovine	Chymotrypsine	-Transporteur d'agents photosensibilisants (porphyrines): application en photochimiothérapie des tumeurs	Kosciarz et coll. (1999)
VLSAADKGNVKAAWGKVGGA AEYGAEALE	$\beta$ 1-30	Hémoglobine bovine	Pepsine	-Solubilisation de l'hème	Lebrun et coll. (1998)

### III.2. Peptides à propriétés organoleptiques

« Organoleptiques » se dit des substances (en majorité adsorbées par voie buccale) capables d'impressionner un récepteur sensoriel. Ces facteurs concernent donc l'odeur et le goût (sapidité) mais aussi l'aspect (forme et couleur), et la texture (craquant, mou, fibreux,...).

Trois peptides amers ont été répertoriés et proviennent tous de l'hydrolyse protéasique de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine.

Séquence	Fragment dans l'hémoglobine bovine	Première source d'isolement	Mode d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine pour son isolement	Activité(s)	Références
VVYPWTQRF	$\beta$ 32-40	Hémoglobine bovine	Pepsine	-Amertume	Aubes-Dufau et coll. (1995)
VVYPWTQR	$\beta$ 32-39	Hémoglobine bovine	Protéase (aspergillopepsine)	-Amertume	Aubes-Dufau et Combes (1997)
VVYPW	$\beta$ 32-36	Hémoglobine bovine	Protéase (subtilisine)	-Amertume	Aubes-Dufau et Combes (1997)

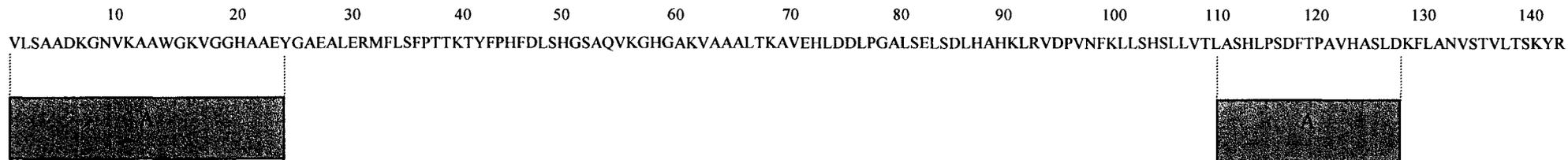
## Conclusion

Les figures 5 et 6 récapitulent les régions peptidiques des deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine bovine où ont été isolés les peptides possédant des propriétés amphiphiles et organoleptiques.

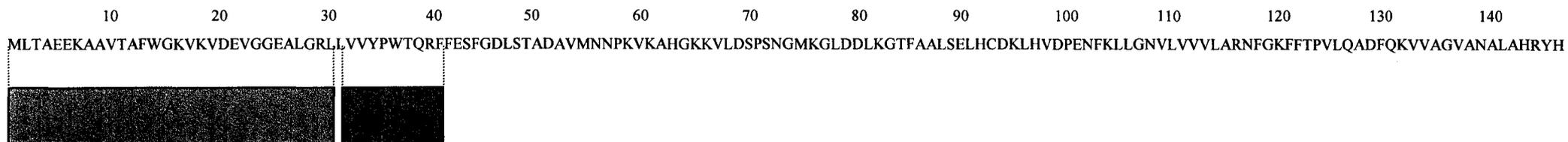
L'hydrolyse des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine bovine est génératrice:

- des trois peptides amphiphiles  $\alpha(1-14)$ ,  $\alpha(1-23)$  et  $\alpha(110-125)$ , en ce qui concerne la chaîne  $\alpha$ ;
- des peptides amères  $\beta(32-40)$ ,  $\beta(32-39)$  et  $\beta(32-36)$ , et du peptide amphiphile  $\beta(1-30)$ , en ce qui concerne la chaîne  $\beta$ .

Tous ces peptides proviennent d'une hydrolyse de l'hémoglobine par des protéases, telles que l'alcalase, la chymotrypsine ou la pepsine.



**Figure 4. Régions de la chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine bovine où sont situées les séquences à propriétés amphiphiles et organoleptiques isolés : les peptides amphiphiles (A).**



**Figure 5. Régions de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine où sont situées les séquences à propriétés amphiphiles et organoleptiques isolés : les peptides amers (AMR) et amphiphile (A).**

#### **IV. Techniques chromatographiques d'isolement et de caractérisation des peptides.**

Les hydrolysats enzymatiques de protéines végétales ou animales (telle que l'hémoglobine bovine), malgré l'emploi de méthodes de contrôle des conditions d'hydrolyse, demeurent souvent des mélanges complexes de peptides difficiles à résoudre. Dans le domaine analytique, ce sont surtout les progrès réalisés en matière de chromatographie qui ont été déterminants pour l'étude de tels mélanges.

Traditionnellement, jusque vers la fin des années soixante, les mélanges peptidiques complexes, produits par hydrolyse enzymatique de protéines, étaient séparés par des techniques bien connues telles que la chromatographie d'échange d'ions (Hill et Delaney, 1967; Schroeder, 1967a, 1967b), la chromatographie bi-dimensionnelle sur papier ainsi que par électrophorèse (Bennett, 1967). Bien souvent, la séparation de peptides de petites ou moyennes tailles (moins de 40 résidus) était réalisée de façon empirique (Fullmer et Wasserman, 1979) en employant ces techniques d'isolement ou en associant certaines d'entre elles. Les problèmes les plus souvent rencontrés étaient la faible résolution et le faible rendement de récupération des produits séparés (Böhlen et Kleeman, 1981). Par exemple, l'utilisation de "peptide mapping" sur papier comme technique préparative est quasiment impossible à cause de l'emploi de réactifs chromogéniques qui réagissent de façon irréversible avec les fonctions aminées (Hancock et coll. 1978). De plus, ces procédés sont souvent longs et laborieux. Un problème majeur est aussi posé par la séparation et la détection de quantités de peptides souvent faibles, surtout lorsqu'il s'agit de repérer seulement un ou quelques peptides dans un hydrolysat complexe.

Piot et coll. (1988b et 1989a) ont purifié dans notre laboratoire des peptides à partir d'un hydrolysat pepsique d'hémoglobine bovine, par la combinaison de la chromatographie d'exclusion stérique à basse pression et de la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) en phase inverse. L'hydrolysat peptidique provenait de l'hydrolyse pepsique à pH 2 de l'hémoglobine bovine dans un réacteur à membranes minérales ; l'ultrafiltrat peptidique subissait ensuite une décoloration par adsorption de l'hème sur de la magnésie. L'élution des peptides de la colonne CLHP en phase inverse était réalisée par un gradient d'acétonitrile et d'un tampon volatil d'acétate d'ammonium.

La détermination de la composition en acides aminés et de la masse moléculaire des peptides était réalisée respectivement par la méthode Picotag (Bidlingmeyer et coll. 1984) et la spectrométrie de masse en mode FAB (Fast Atom Bombardment) (Piot et coll. 1988b et 1989a). Ces techniques chromatographiques apparaissaient très importantes stratégiquement pour le fractionnement d'un mélange peptidique aussi complexe dans le but d'isoler des peptides purs et la recherche de peptides d'intérêt. Piot et coll. (1989b) ont ensuite substitué la chromatographie d'exclusion stérique à haute pression à la chromatographie de basse pression. Cela a permis un gain de temps pour l'isolement des peptides ainsi qu'une meilleure résolution lors de cette étape de pré-fractionnement.

L'utilisation de ces techniques chromatographiques de basse et haute pression a permis l'isolement de la LVV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-7 dans notre laboratoire par Piot et coll. (1992a), ainsi que de la LVV-hémorphine-5 et de la VV-hémorphine-5 par Karelin et coll. (1994) et de la néokyotorphine (1-4) par Blishchenko et coll. en 1996.

L'utilisation de la spectrométrie de masse en mode FAB et de la méthode Picotag a été employée, dans un second temps, pour caractériser les masses moléculaires et les séquences en acides aminés des peptides actifs isolés.

La combinaison de la moyenne pression (FPLC) appliquée à la filtration sur gel et de la CLHP en phase inverse a été employée pour l'isolement de peptides à propriétés amères tels que le  $\beta$  32-40 (Aubes-Dufau et coll. 1995) ou les peptides  $\beta$  32-39 et  $\beta$  32-36 (Aubes-Dufau et Combes 1997). Kosciarz et coll. en 1998 ont isolé, dans notre laboratoire, un peptide amphiphile issu de l'hydrolyse de la chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine bovine ( $\alpha$  1-23), par un pré-fractionnement en chromatographie FPLC sur un échangeur d'anions, suivi par une séparation en CLHP en phase inverse.

Une ultime étape consistait à caractériser ces peptides par spectrométrie de masse en mode MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) ou par détermination de la composition en acides aminés selon la méthode Picotag. La désorption-ionisation par impact laser est une méthode d'ionisation pulsée. Elle permet d'analyser plus facilement les mélanges de peptides et elle est moins sensible à la présence de sels dans les milieux telle que la technique FAB. Une autre caractéristique, et certainement la plus importante, concerne le domaine de masses moléculaires accessibles de l'analyseur associé à ce mode de spectrométrie de masse. Alors que les analyseurs magnétiques, spécifiques à la spectrométrie de masse en mode FAB, couvrent quelques kilodaltons (Kda), l'analyseur par temps de vol

(ou Time Of Flight, TOF), plus spécifique au mode MALDI, couvre le domaine de masse accessible de 100 Kda et au-delà, ce qui correspond au domaine de masse de la plupart des protéines.

En 1991, Zavitsanos et Goetz ont décrit une méthode CLHP couplée à un détecteur à barrettes de diodes. Cette technique permet une analyse spectrale en temps réel des peptides élués de la colonne. Même si les spectrophotomètres UV-Visible sont capables de générer des spectres de peptides et de protéines, leur application utile est franchement limitée à des échantillons purs. Des systèmes de détection à barrettes de diodes, couplés à un ordinateur, permettent une acquisition instantanée de spectres UV-Visible pendant toute la durée de la séparation chromatographique. Cette analyse spectrale en temps réel est extrêmement utile pour la résolution d'hydrolysats peptidiques complexes. En effet, chaque fraction élue au cours de la chromatographie peut faire l'objet d'une analyse spectrale. Les données spectrales sont alors automatiquement prises en compte pour accéder aux spectres dérivés du second ordre. Ceux-ci vont permettre l'identification des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) au sein des peptides (Black et Hodges 1991, Palladino et Cohen 1991 et Rao et coll. 1991). Le logiciel et la base de données Millennium, développés par la société Waters® et couplés au système CLHP à barrettes de diodes, vont permettre l'acquisition et le traitement des spectres et des chromatogrammes pour l'analyse qualitative et quantitative d'hydrolysats peptidiques.

*D'un point de vue qualitatif*, le développement d'une méthode de traitement va permettre d'évaluer la pureté des pics issus du fractionnement d'un hydrolysate, c'est-à-dire déterminer si ces pics sont homogènes à partir de l'analyse des spectres UV. Une hétérogénéité spectrale pourra indiquer la présence d'une co-élution. En effet, la co-élution de deux ou plusieurs composés de spectres distincts sera à l'origine de pics spectralement hétérogènes. Ce logiciel va également servir à la construction d'une librairie où le spectre d'un étalon standard, tel qu'un peptide actif, sera répertorié. Il sera alors possible de rechercher la correspondance d'un spectre inconnu avec celui du peptide actif présent dans la librairie spectrale.

*D'un point de vue quantitatif*, le calibrage d'un étalon standard, tel qu'un peptide d'intérêt, va permettre d'accéder à la quantité de ce peptide, après avoir vérifié s'il était pur, au sein d'un hydrolysate peptidique complexe.

La détermination du rapport entre les acides aminés aromatiques au sein d'un peptide fut décrite par Miclo et coll. (1995). Cette méthode est aujourd'hui applicable à la quantification des acides aminés aromatiques dans les protéines (Zhao et coll. 1996d), et à l'isolement et la quantification des hémorphines (Zhao et coll. 1996b, 1996c ; Zhao et Piot 1997b), et de la néokyotorphine (Zhao et Piot 1998a) au sein d'hydrolysats peptidiques d'hémoglobine.

Le couplage de la CLHP en phase inverse et d'un détecteur à barrettes de diodes a également permis à Zhao et coll. (1996c) de mesurer les cinétiques d'apparition de quatre hémorphines (la LVV-hémorphine-7, la VV-hémorphine-7, la LVV-hémorphine-5 et la VV-hémorphine-5) au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine à pH 2. Cela leur a permis d'en déduire le rôle précurseur de la LVV-hémorphine-7 et de la LVV-hémorphine-5 respectivement dans la formation de la VV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-5.

## **V. Extraction liquide-liquide des peptides.**

Les propriétés hydrophobes de certains peptides vont permettre leur solubilisation dans un solvant organique non miscible à l'eau. Le partage de tels peptides, issus d'hydrolysats protéiques complexes, entre deux phases non miscibles, constitue une étape complémentaire rapide dans la procédure de purification de ces biomolécules.

Aubes-Dufau et coll. (1995) ont utilisé le butan-2-ol pour extraire une fraction contenant un peptide amer, à partir d'un hydrolysat pepsique d'hémoglobine bovine provenant d'une étape séparative sur membrane par ultrafiltration.

Ce peptide a ensuite été isolé par chromatographie de filtration sur gel puis par CLHP en phase inverse. Ce peptide amer a été identifié en déterminant sa composition en acides aminés par la méthode Picotag. Il correspond au fragment 32-40 de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine.

Aubes-Dufau et Combes (1997) ont ensuite testé différentes protéases (subtilisine, aspergillopepsine, papaïne) pour la production de peptides amers à partir de l'hémoglobine bovine. L'extraction biphasique par le butan-2-ol a permis d'isoler une fraction peptidique issue de l'hydrolyse de l'hémoglobine par l'aspergillopepsine et une fraction issue de

l'hydrolyse de l'hémoglobine par la subtilisine. Chacune de ces fractions contenait un peptide hydrophobe et amer (Aubes-Dufau et Combes 1997). Après isolement par filtration sur gel à moyenne pression et caractérisation de la composition en acides aminés par la méthode Picotag, une fraction provenant de l'hydrolyse de l'hémoglobine par l'aspergillopepsine s'est révélée contenir le peptide amer 32-39 de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine, et une fraction provenant de la digestion de l'hémoglobine par la subtilisine contenait le peptide amer 32-36 de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine (Aubes-Dufau et Combes (1997).

Zhao et Piot (1998b) ont testé différentes classes de solvants organiques non miscibles à l'eau (alcools aliphatiques, cétone, éther, ester et hydrocarbures) pour l'extraction de deux hémorphines, la LVV-hémorphine-7 (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe ; fragment 31-40 de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine) et la VV-hémorphine-7 (Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe ; fragment 32-40 de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine). Ces deux peptides hydrophobes ont été isolés à partir de l'hydrolysate pepsique produit dans le réacteur enzymatique à membrane (voir chapitre IV) (Zhao et Piot 1998b). Les alcools aliphatiques, et notamment le butan-1-ol et le butan-2-ol ont montré la meilleure sélectivité vis à vis de l'extraction biphasique de ces deux hémorphines. L'isolement et la caractérisation de ces peptides opioïdes ont été réalisés respectivement par chromatographie haute performance de filtration sur gel puis en phase inverse et enfin par spectrométrie de masse en mode MALDI (Zhao et Piot 1998b).

## **VI. Approche méthodologique des mélanges**

Les propriétés d'un mélange dépendant généralement de sa composition, il est fréquent que l'on veuille traduire les variations d'une propriété en fonction de la concentration des divers constituants.

Soit un mélange de  $k$  constituants en proportions  $x_1, x_2, \dots, x_k$  et  $Y$ , la propriété qui nous intéresse. Le problème se pose souvent en ces termes: quelle composition donner au mélange pour que  $Y$  satisfasse une spécification (par exemple,  $Y$  supérieur à  $Y_{\min}$  ou à  $Y_{\text{optimale}}$ ) ?

Une première démarche consiste à réaliser différents mélanges, à les tester jusqu'à ce que certains répondent au problème. Il faudra ensuite réaliser d'autres mélanges de compositions voisines pour voir dans quelle mesure nous pouvons faire varier les compositions sans sortir des spécifications.

Une autre démarche, plus sûre et dans l'ensemble plus économe en nombre d'essais à faire, revient à traduire les variations de Y en fonction de la composition du mélange par une relation  $Y=f(x_i)$ . Cette relation devra être valide, c'est-à-dire traduire fidèlement les variations de Y en fonction des  $x_i$ , et aussi simple que possible car le nombre de mélanges à réaliser croît avec la complexité de la relation. Lorsque cette équation est à disposition, le tracé des courbes isoréponses donne la région des mélanges conforme à la spécification, telle que la détermination d'un mélange optimum recherché.

Cette seconde démarche expérimentale nécessite l'utilisation des matrices d'expériences appliquées aux mélanges et rend de ce fait cette méthode plus rationnelle que la première démarche décrite auparavant. Ces matrices d'expériences ont été décrites par Scheffé en 1958 et en 1962 sous le nom de réseaux-simplex.

Cette approche méthodologique des mélanges a des applications dans divers domaines (Sado et Sado, 1991) tels que le génie civil pour la mise au point des bétons afin de leur offrir une bonne résistance, la malterie-brasserie dans la conception des brassins par différentes variétés de malts, l'industrie du textile dans la mise au point de formulations pour l'obtention de qualités de douceur et d'hydrophilie. La pharmacie fait aussi appel aux plans d'expériences appliqués aux mélanges, pour la formulation de produits pharmaceutiques et notamment l'utilisation de systèmes de cosolvants pour solubiliser des drogues faiblement solubles dans l'eau et permettre leur dosage (Anik et Sukumar 1981, Vojnovic et Chicco 1997).

Cependant, à notre connaissance, aucune étude faisant appel aux plans d'expériences appliqués aux mélanges n'a été réalisée sur l'extraction de peptides actifs par un système de solvants apolaires, à partir d'hydrolysats enzymatiques de protéines.

## **MATERIELS ET METHODES**

## I. Dosage de l'hémoglobine.

15 g d'hémoglobine (Sigma, ref. H-2625) en poudre sont dissous dans de l'eau. Cette solution concentrée est ensuite centrifugée pendant 15 minutes à 4000 trs/min afin d'éliminer la fraction insoluble. La concentration exacte du surnageant est alors déterminée par la méthode décrite par Crosby et coll. (1954). Les solutions d'hémoglobine à 0,2 % (p/v) utilisées pour les hydrolyses ont été réalisées par dilution d'une même solution mère d'hémoglobine concentrée.

### Principe

En présence de cyanures et de ferricyanures (réactif de DRABKIN), l'hémoglobine se transforme en cyanmethémoglobine stable qui présente un maximum d'absorption dans le visible à 546 nm.

### Mode opératoire

- 50  $\mu$ l de la solution d'hémoglobine à doser sont ajoutés à 12,5 ml de réactif de DRABKIN (phosphate monopotassique 1 mM, cyanure de potassium 0,75 mM, et ferricyanure de potassium 0,6 mM en solution aqueuse).
- Après 10 minutes de réaction à température ambiante, l'absorbance (A) de l'échantillon est lue à 546 nm contre le réactif de DRABKIN.

Sachant qu'une solution standard d'hémoglobine à 14,7 % (p/v) donne une A de 0,4 par cette méthode, la concentration en hémoglobine Y de la solution à doser est obtenue en % (p/v) par la relation suivante :

$$Y = 14,7 \times \frac{A}{0,4} \text{ g/100 ml}$$

## II. Dénaturation de l'hémoglobine par l'urée.

### II.1. Solution d'hémoglobine à 2 % dénaturée par l'urée à pH 2.

Une solution d'hémoglobine concentrée (de concentration Y) est préparée et dosée selon la méthode décrite précédemment. Un volume V de solution concentrée d'hémoglobine contenant 5 g d'hémoglobine est ajouté à une solution de 80 g d'urée dans (80-V) ml d'eau. Après incubation de ce mélange à 37°C pendant 1 heure, 50 ml d'une solution tampon HCl/KCl 0,25 M à pH 2 sont ajoutés. Le pH est alors réajusté à 2 par ajout d'une solution

d'acide chlorhydrique concentrée. Le volume de la solution est ensuite ajusté à 250 ml avec de l'eau.

## **II.2. Solution d'hémoglobine de 0,2 à 5 % dénaturée par l'urée à pH 4,5.**

Une solution d'hémoglobine concentrée (de concentration Y) est préparée et dosée selon la méthode décrite précédemment. Un volume V de solution concentrée d'hémoglobine contenant de 0,2 g à 5 g d'hémoglobine est ajouté à une solution de 32 g d'urée dans (32-V) ml d'eau. Après incubation de ce mélange à 37°C pendant 1 heure, 20 ml d'une solution tampon acétate 0,5 M pH 4,5 sont ajoutés. Le pH est alors ajusté à 4,5 par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique concentrée. Le volume de la solution est ajusté à 100 ml avec de l'eau.

## **III. Dosage de l'activité de la pepsine en solution**

### **Solutions**

Une solution d'hémoglobine à 2 % (p/v) dénaturée à l'urée est préparée suivant le protocole fourni précédemment dans du tampon HCl/KCl 0,25 M à pH 2. 56 mg de pepsine de porc [E.C. 3.4.23.1.] purifiée (Sigma, ref. P-6887) sont dissous dans 20 ml d'une solution tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1 M pH 4,5. Cette solution est diluée au 1/200<sup>ème</sup> dans l'eau pour la mesure d'activité.

### **Protocole de dosage**

- La solution d'hémoglobine à 2% (p/v) dénaturée à l'urée et la solution diluée précédente de pepsine sont équilibrées à 37°C.
- A 5 ml de la solution d'hémoglobine est ajouté 1 ml de la solution diluée de pepsine. Après agitation, ce mélange est incubé à 37°C pendant 10 minutes exactement.
- La réaction est alors arrêtée en ajoutant au mélange 10 ml d'une solution d'acide trichloroacétique (TCA) à 5% (p/v). Un blanc est préparé en mélangeant les 10 ml de solution de TCA à 1 ml de solution d'enzyme et en ajoutant par la suite les 5 ml de solution d'hémoglobine.
- L'essai et le blanc sont laissés pendant 30 minutes à température ambiante. Les solutions sont alors centrifugées pendant 15 minutes à 4500 trs/min (Universal 16 A Hettich Zentrifugen) afin d'éliminer une grande partie du précipité formé puis filtrées avec un filtre en acétate de cellulose 0,45 µm.
- L'absorbance de la solution filtrée est lue à 280 nm avec le blanc comme référence ( $\Delta A_{280}$ ).

Une unité d'activité enzymatique (U.A.) est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à provoquer une augmentation  $\Delta A$  d'absorbance à 280 nm de 0,001/min avec un trajet optique de 1 cm. La solution de pepsine concentrée contient donc  $(\Delta A_{280 \text{ nm}}/10) \times 1000 \times 200$  U.A./ml.

## **IV. Suivi de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine en solution.**

### **IV.1. Suivi de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine native à 0,2 % en milieu aqueux.**

#### **Solutions**

- Préparation d'une solution de pepsine concentrée et dosage de son activité enzymatique selon le protocole donné en III.
- Préparation et dosage d'une solution d'hémoglobine concentrée à environs 15 % (voir protocole I)
- La solution d'hémoglobine à 0,2 % (p/v) est préparée dans un tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 par dilution de la solution concentrée d'hémoglobine.
- Préparation d'une solution de tampon borax 0,32 M à pH 12,7 (solution d'arrêt)

#### **Protocole**

- Les préparations d'hémoglobine et de pepsine sont incubées à 23°C.
  - A 100 ml d'une solution d'hémoglobine à 0,2 % sont ajoutés  $4 \cdot 10^5$  U.A. de pepsine (A.S.=3600 U.A./mg) correspondant à un rapport E/S $\approx$ 1/11 (mole/mole). Après homogénéisation, ce mélange est incubé à 23°C.
- Des prélèvements de 2,5 ml d'hydrolysats sont effectués à intervalles de temps réguliers et mélangés à 1 ml de solution d'arrêt. Le pH de l'échantillon atteint alors une valeur de 10 ce qui permet d'inactiver la pepsine. Les échantillons à pH 10 sont conservés dans de l'azote liquide afin d'éviter l'hydrolyse basique des peptides. Ces échantillons seront ensuite analysés par CLHP en phase inverse.

## **IV.2. Suivi de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine native à 0,2 % en présence de 20 % d'éthanol.**

### **Solutions**

- Préparation d'une solution de pepsine concentrée et dosage de son activité enzymatique selon le protocole donné en III.
- Préparation et dosage d'une solution d'hémoglobine concentrée à environs 15 % (voir protocole I)
- L'hydrolyse en milieu hydro-organique est réalisée avec la solution d'hémoglobine à 0,2 % (p/v) préparée dans un tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 contenant 20 % (v/v) d'éthanol.
- Préparation d'une solution de tampon borax 0,32 M à pH 12,7 (solution d'arrêt)

### **Protocole**

- Les préparations d'hémoglobine et de pepsine sont incubées à 23°C.
  - A 100 ml d'une solution d'hémoglobine à 0,2 % contenant 20 % (v/v) d'éthanol sont ajoutés  $4 \cdot 10^5$  U.A. de pepsine (A.S.=3600 U.A./mg) correspondant à un rapport E/S $\approx$ 1/11 (mole/mole). Après homogénéisation, ce mélange est incubé à 23°C.
- Des prélèvements de 2,5 ml d'hydrolysats sont effectués à intervalles de temps réguliers et mélangés à 1 ml de solution d'arrêt. Le pH de l'échantillon atteint alors une valeur de 10 ce qui permet d'inactiver la pepsine. Les échantillons à pH 10 sont conservés dans de l'azote liquide afin d'éviter l'hydrolyse basique des peptides. Ces échantillons seront ensuite analysés par CLHP en phase inverse.

### **IV.3. Suivi de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine dénaturée pour des concentrations entre 0,2 et 5 %.**

#### **Solutions**

- Préparation d'une solution de pepsine concentrée et dosage de son activité enzymatique selon le protocole donné en III.
- Préparation et dosage d'une solution d'hémoglobine concentrée à environs 15 % (voir protocole I)
- Les solutions d'hémoglobine dénaturée à l'urée à 0,2 % (p/v), 0,5 % (p/v), 1 % (p/v), 3 % (p/v) et 5 % (p/v) sont préparées à partir de la solution concentrée d'hémoglobine selon le protocole de dénaturation donné en II.2.
- Préparation d'une solution de tampon borax 0,32 M à pH 12,7 (solution d'arrêt)

#### **Protocole**

- Les préparations d'hémoglobine et de pepsine sont incubées à 23°C.
  - A 100 ml des solutions d'hémoglobine (de 0,2 à 5 %) sont respectivement ajoutés  $4.10^5$ ,  $1.10^6$ ,  $2.10^6$ ,  $6.10^6$  et  $1.10^7$  U.A. de pepsine (A.S.=3600 U.A./mg) correspondant à un rapport E/S $\approx$ 1/11 (mole/mole). Après homogénéisation, ce mélange est incubé à 23°C.
- Des prélèvements de 2,5 ml d'hydrolysats sont effectués à intervalles de temps réguliers et mélangés à 1 ml de solution d'arrêt. Le pH de l'échantillon atteint alors une valeur de 10 ce qui permet d'inactiver la pepsine. Les échantillons à pH 10 sont conservés dans de l'azote liquide afin d'éviter l'hydrolyse basique des peptides. Ces échantillons seront ensuite analysés par CLHP de phase inverse.

### **V. Extraction liquide/liquide des hydrolysats pepsiques.**

Deux solvants organiques de la classe des alcools (butan-1-ol et butan-2-ol) sont testés sur un hydrolysats à 5 % (p/v) d'hémoglobine dénaturée par l'urée, après 2,5 minutes d'hydrolyse pour l'extraction de la LVV-hémorphine-7, et après 3 heures pour l'extraction de la VV-hémorphine-7. Chaque solvant est préalablement saturé en tampon acide acétique / acétate de sodium 0,1 M pH 4,5.

## **Protocole**

1 ml de l'hydrolysate est ajouté à 1 ml (v/v) de chaque solvant organique dans un tube à hémolyse. Une émulsion est crée par une forte agitation pendant 10 minutes (Vortex Heidolph) puis l'ensemble est centrifugé (Universal 16 A Hettich Zentrifugen) pendant 10 minutes à 3000 tours/min.

Les phases organiques et aqueuses sont s  par  es puis analys  es par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) en phase inverse sur une colonne analytique de type C4 (injection de 50   l pour les phases aqueuses dilu  es au 1/25<sup>  me</sup> dans l'eau et de 30   l pour les phases organiques).

## **VI. Suivi de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine en système biphasique.**

L'hydrolyse de l'hémoglobine à 1 % (50 ml) par la pepsine ( $1 \cdot 10^6$  U.A., environ 2 ml de solution à 150 mg/ml) est men  e dans un réacteur thermostaté (23  C) sous forte agitation, à l'aide d'un agitateur mécanique afin de former une émulsion, et en présence soit de butan-2-ol (50/50 v/v) soit de l'octan-1-ol (50/50 v/v), soit du mélange butan-2-ol/octan-1-ol (35/10 v/v). Les deux solvants sont préalablement saturés en tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5.

Des fractions de 0,5 ml sont pr  lev  es à des temps différents pendant 24 heures et ajout  es au tampon borate 0,32 M pH 12,7 (0,4 ml) pour amener la phase aqueuse à pH 10 inactivant ainsi la pepsine.

Après centrifugation (Universal 16 A Hettich Zentrifugen) 10 minutes à 3000 trs/min, les phases aqueuses et organiques sont s  par  es. Chaque phase est ensuite analys  e en CLHP en phase inverse (injection de 50   l pour les phases aqueuses dilu  es au 1/5<sup>  me</sup> dans l'eau et de 100   l pour les phases organiques).

## **VII. Insolubilisation de la pepsine.**

### ***Immobilisation de la pepsine sur la Duolite A568 (Rohm et Haas S.A.)***

La Duolite A568 est un polymère formophénolé hydrophobe et poreux, greffé par des fonctions amine tertiaire. C'est donc un échangeur faiblement basique.

Pour préparer 25 ml de résine le protocole suivant a été employé :

Environ 7 g de résine sous forme de billes sont hydratés avec 100 ml d'eau pendant 2 heures à température ambiante sous agitation douce. La résine est ensuite neutralisée par addition d'HCl 1 N jusqu'à l'obtention d'un pH voisin de 3,2. Cette opération doit être progressive car la Duolite A568 ne supporte pas un pH inférieur à 3. La résine est ensuite lavée avec 100 ml de tampon acétate de sodium 0,2 M à pH 4,5 et 3 fois avec 100 ml de tampon acétate de sodium 0,05 M à pH 4,5.

L'immobilisation de la pepsine se fait par la remise en suspension des billes dans 50 ml de tampon acétate de sodium 0,05 M à pH 4,5 contenant 600 mg de pepsine, ce qui correspond à 24 mg d'enzyme par ml de résine. La réaction se déroule sous agitation douce pendant une nuit et à 4°C.

La résine est ensuite lavée 3 fois avec 100 ml de tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5.

Le pourcentage de pepsine non fixée est déterminé par le dosage de son activité à pH 2 avec de l'hémoglobine 2 %, dans les tampons de lavage et le surnageant.

### ***Dosage de l'activité de la pepsine insolubilisée***

L'activité de la pepsine immobilisée sur Duolite A568 est déterminée. Une solution d'hémoglobine à 1,67 % (p/v) dénaturée à l'urée est préparée suivant le protocole fourni dans le chapitre II, mais dans du tampon acide acétique / acétate de sodium 0,1 M pH 4,5.

### **Protocole de dosage**

- La solution d'hémoglobine à 1,67 % dénaturée par l'urée est équilibrée à 37°C.
- La pepsine, immobilisée sur la Duolite A568 (1 ml de résine), est ajoutée à 100 ml d'hémoglobine à 1,67 %. L'ensemble est agitée lentement, à 37°C et pendant 90 minutes.

- Des prélèvements (1,5 ml) sont effectués toutes les 5 minutes et ajoutés à 2,5 ml de TCA à 5 % afin de précipiter l'hémoglobine. Un blanc est préparé en ajoutant 2,5 ml de solution de TCA à 1,5 ml de solution d'hémoglobine seule à 1,67 %.
- Chaque mélange est ensuite laissé pendant 30 minutes à température ambiante. Chaque solution est alors centrifugée (Universal 16 A Hettich Zentrifugen) pendant 15 minutes à 4500 trs/min afin d'éliminer une grande partie du précipité formé puis filtrée sur 0,45 µm.
- L'absorbance de chaque solution filtrée est lue à 280 nm avec le blanc comme référence ( $\Delta A_{280}$ )

### **VIII. Suivi de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine insolubilisée.**

La pepsine insolubilisée ( $1 \cdot 10^6$  U.A.) est incubée dans un réacteur thermostaté (23°C) contenant l'hémoglobine 1 % (50 ml) dénaturée à l'urée. Des prélèvements de 1 ml sont effectués aux temps d'hydrolyse T0 (avant l'ajout de l'enzyme), 15 minutes, 1, 3, 4, 7, 10, 24 et 48 heures et ajoutés à du tampon borate 0,32 M pH 12,7 (800 µl) afin d'amener la phase aqueuse à pH 10, qui inactive l'éventuelle pepsine relarguée de la résine en cours d'hydrolyse.

Les échantillons sont centrifugés (3000 tours/min pendant 10 minutes) (Universal 16 A Hettich Zentrifugen) puis analysés (injection de 100 µg) en CLHP en phase inverse.

L'hydrolyse de l'hémoglobine à 1 %, en présence de différentes proportions en butan-2-ol et octan-1-ol, est menée à 23°C pendant 3 heures et à une vitesse d'agitation faible (pas d'émulsion) dans le même tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5. 1 ml de chaque phase est prélevé, celui de la phase aqueuse est ajoutée à 400 µl de tampon borate 0,32 M pH 12,7 pour inactiver l'éventuelle pepsine relarguée de la résine en cours d'hydrolyse.

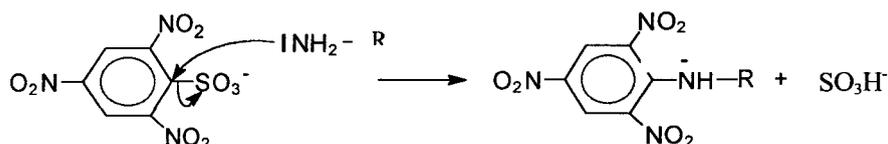
Les phases aqueuses et organiques sont centrifugées (Universal 16 A Hettich Zentrifugen) pendant 10 minutes à 3000 tours/min, de façon à précipiter les éventuels insolubles formés pendant l'hydrolyse. Chaque phase est analysée en CLHP en phase inverse (injection de 50 µl pour les phases aqueuses diluées au  $1/5^{\text{ème}}$  dans l'eau et de 200 µl pour les phases organiques).

### **IX. Détermination du degré d'hydrolyse de l'hémoglobine par la méthode au TNBS.**

Le degré d'hydrolyse est déterminé par le nombre de liaisons peptidiques coupées sur le nombre total de liaisons.

#### **Principe**

Le degré d'hydrolyse, exprimé en %, des hydrolysats est déterminé d'après la méthode d'Adler-Nissen (1979). Cette méthode consiste en un dosage par spectrophotométrie du chromophore formé lors de la réaction de l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) avec les amines primaires (Figure 1).



**Figure 6 : Réaction du TNBS avec les groupements amine.**

### Réactifs nécessaires

- Solution d'acide chlorhydrique 0,1 N
- Solution de tampon phosphate de sodium 0,2125 M à pH 8,2
- Solution de leucine 0,5 mM dans du tampon phosphate de sodium 0,2125 M à pH 8,2
- Solution d'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS, Sigma ref. P-2297) à 0,033 % (v/v) dans l'eau (à préparer juste avant le dosage)

### Préparation d'une gamme étalon de leucine

Tube n°	V (ml) de solution de tampon phosphate 0.2125 M, pH 8.2	V (ml) d'une solution de Leucine 0.5 mM	nmoles de leucine
1	2	0	0
2	1,8	0,2	100
3	1,6	0,4	200
4	1,4	0,6	300
5	1,2	0,8	400
6	1	1	500

**Tableau 1. Description de la gamme étalon de leucine.**

A chacun des 6 tubes de la gamme étalon est ajouté 0,25 ml du milieu solvant dans lequel l'hydrolysate à doser est présent.

## Préparation des échantillons à doser

Prélever 0,25 ml des divers hydrolysats et blancs (mélange de 2,5 ml de la solution d'hémoglobine initiale ou hydrolysée avec 1 ml de solution d'arrêt)

Ajouter 2 ml tampon phosphate 0,2125 M, pH 8,2.

## Réaction

- Ajouter 2 ml de la solution de TNBS à 0,1% dans chaque tube de la gamme étalon (tableau 1) et dans chacun des tubes d'échantillons à doser.
- Incuber 60 min à 50°C et à l'obscurité.
- Arrêter la réaction par ajout de 4 ml de solution d'HCl 0,1 N.
- Lire l'absorbance à 340 nm contre le blanc.

$$DH = \frac{\text{absorbance échantillon} \times \text{nombre Leu} \times \text{dilution}}{\text{masse d'hémoglobine} \times 0,00025 \times (568/64500)}$$

Le nombre de leucine ( $.10^{-9}$  moles) est déterminé via la gamme d'étalonnage ;

la masse d'hémoglobine est exprimée en g/l ;

le volume de l'échantillon dosé est de  $25.10^{-5}$  l ;

les valeurs 568 et 64500 correspondent respectivement au nombre de liaisons total dans une molécule d'hémoglobine et la masse moléculaire de l'hémoglobine bovine.

## Calcul d'un degré d'hydrolyse corrigé.

Afin que le DH représente bien le pourcentage de liaisons hydrolysées de l'hémoglobine ayant réagi et de s'affranchir du mécanisme de la réaction, un degré d'hydrolyse corrigé a été introduit, qui tient compte de la proportion des chaînes ayant effectivement été hydrolysées.

Le degré d'hydrolyse corrigé est défini par la relation :

$$DH \text{ corrigé} = DH_{\text{TNBS}} * \frac{\left[ \text{Chaîne } \alpha + \text{Chaîne } \beta \right]_{\text{départ}}}{\left[ \text{Chaîne } \alpha + \text{Chaîne } \beta \right]_{\text{départ}} - \left[ \text{Chaîne } \alpha + \text{Chaîne } \beta \right]_{\text{restant}}}$$

L'aire des pics contenant les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  a été considérée comme représentative de leur concentration et a été relevée au cours du temps sur les chromatogrammes en CLHP de phase inverse.

## **X. Méthodes d'analyse des peptides.**

### **X.1. Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) en phase inverse.**

#### **Principe**

Cette technique de chromatographie sur colonne est basée sur la différence d'affinité des molécules à séparer vis-à-vis d'une phase stationnaire hydrophobe et d'une phase mobile plus ou moins hydrophile selon le gradient de solvants utilisé.

En ce qui concerne la phase stationnaire, elle est le plus souvent constituée d'un support de particules de silice de 5 ou 10  $\mu\text{m}$  de diamètre, très poreuses, le diamètre des pores étant le plus souvent de 60 à 100  $\text{\AA}$ , et d'un revêtement greffé de chaînes aliphatiques de 4 (C4), 8 (C8) ou 18 (C18) atomes de carbone qui sont responsables de l'hydrophobicité.

#### **Matériels et méthodes**

L'appareillage de CLHP analytique est constitué d'un contrôleur de pompe Waters<sup>TM</sup> 600, d'un détecteur Waters 996 (réglé à une longueur d'onde de 226 nm). Une colonne Vydak C4 (0,46  $\times$  25 cm) a été utilisée pour la séparation car elle est recommandée pour la chromatographie des gros peptides (de plus de 20 à 30 acides aminés) et de la plupart des protéines. Schroeder et coll. (1985) ont souligné son efficacité pour la séparation des chaînes de globine dans le cas d'hémoglobines non humaines. La colonne C4 nous a permis d'analyser la totalité des phases organiques et des phases aqueuses, des chaînes d'hémoglobine et de l'hème, sans avoir de problèmes d'adsorption irréversible.

La phase mobile est constituée d'un éluant A, composé d'eau et de TFA dans des proportions 1000/1 (v/v), et d'un éluant B, composé d'acétonitrile, d'eau et de TFA dans des proportions 600/400/1 (v/v). Les deux phases sont dégazées en continu à l'hélium. Le débit est réglé à 1 ml/min. Avant injection, l'hydrolysate ou la phase aqueuse est filtrée sur un filtre en acétate de cellulose 0,2  $\mu\text{m}$  (AIT Chromato), la phase organique quant à elle est filtrée sur un filtre en PTFE 0,22  $\mu\text{m}$  (Sartorius) pour les solvants et échantillons non-aqueux. 50  $\mu\text{l}$  d'hydrolysats et des phases aqueuses dilués, et 30  $\mu\text{l}$  à 200  $\mu\text{l}$  des phases organiques sont injectés sur la colonne. Le gradient appliqué consiste en une augmentation linéaire de la proportion en éluant B dans la phase mobile de 0 à 67% sur les 30 premières minutes puis de 67 à 87% les 35 minutes suivantes.

En ce qui concerne la CLHP à l'échelle préparative, l'appareillage est constitué d'un contrôleur de pompe Waters<sup>TM</sup> 600, d'un détecteur Waters 486 (réglé à une longueur d'onde de 226 nm) et d'un enregistreur Waters 745 (réglé à une atténuation de 256). Une colonne Vydak C4 (2,2 × 25 cm) a été utilisée pour la préparation de la LVV-hémorphine-7, de la VV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-4. 25 mg de l'hydrolysate peptidique d'hémoglobine à 5 % (p/v) et dénaturée par l'urée sont déposées sur la CLHP de phase inverse. La phase mobile et le gradient appliqué sur la colonne sont identiques à ceux utilisés pour la colonne C4 analytique, tandis que le débit est de 15 ml/min. L'hydrolysate est filtré sur un filtre en acétate de cellulose 0,2 µm (AIT Chromato).

37 % (v/v), 36 % (v/v) et 32 % (v/v) en acétonitrile sont nécessaires pour éluer respectivement la LVVh-7 (cas du fractionnement de l'hydrolysate à 3 % de degré d'hydrolyse de l'hémoglobine dénaturée), la VVh-7 (cas du fractionnement de l'hydrolysate à 11 % de degré d'hydrolyse de l'hémoglobine dénaturée) et la VVh-4 (cas du fractionnement de l'hydrolysate à 21 % de degré d'hydrolyse de l'hémoglobine dénaturée).

## **X.2. Analyse des peptides par spectrométrie de masse en désorption laser (MALDI).**

Le contenu de chacune des fractions obtenues par CLHP en phase inverse a été caractérisé par spectrométrie de masse afin d'évaluer leur pureté et de déterminer la masse du ou des peptide(s) présent(s) dans les phases organiques et aqueuses. La technique d'ionisation par désorption laser a été retenue parce qu'elle permet d'analyser plus facilement 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'autre part, elle permet une acquisition rapide des spectres et l'interprétation de ces spectres est facilitée par l'absence de fragments.

Les spectres de masse ont été réalisés en collaboration avec le Centre Commun de mesure de Spectrométrie de masse de Lille I, avec la précieuse collaboration de Monsieur Guy RICART.

### *X.2.1 Principe de la désorption laser*

Un laser émettant dans l'ultraviolet (UV) ou l'infra-rouge (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 unes 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 cationisation  $(M+Na)^+$ ,  $(M+K)^+$ , et  $(M+Na+K-H)^+$  sont néanmoins détectables.

### *X.2.2. Conditions opératoires*

#### *Appareillage*

Les spectres de masse ont été réalisés avec un spectromètre de masse VISION 2000 MALDI TOF (FINNIGHAN MAT) de résolution de masse 2000 Da. 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.

#### *Préparation de l'échantillon*

1  $\mu$ l de matrice et 0,25 ou 0,5  $\mu$ l de chaque fraction CLHP sont déposés sur les cibles. Les échantillons sont séchés avant d'être analysés.

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

20 tirs au laser 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%.

### **X.3. Couplage de la Chromatographie Liquide Haute Performance en phase inverse avec la Spectrométrie de Masse à Ionisation par ElectroSpray.**

Toutes les mesures spectrophotométriques ont été réalisées en mode ionique positif sur un triple quadrupôle de type Quattro II (Micromass Ltd., Altrincham, Royaume-Uni) équipé d'une source ionique électrospray. Les gaz utilisés pour la nébulisation et le séchage sortaient à des

débits respectifs de 0,3 et 6,7 L/min, tandis que la température était maintenue à 110°C. Un mélange polypropylène glycol (PPG) était utilisé pour calibrer le quadrapôle du spectromètre de masse.

Le fractionnement des échantillons a été réalisé sur un système CLHP Hewlett-Packard 1100, équipé d'une colonne C3 de type Zorbax (0,21 × 20 cm, 5 µm), directement couplé à un détecteur UV. L'éluion était menée à un débit de  $0,170 \times 10^{-3}$  L/min avec un gradient eau-acétonitrile. Le solvant A était composé d'eau et de 0,1 % TFA tandis que le solvant B était composé d'un mélange eau-acétonitrile en proportion 60 % / 40 % (v/v) et de 0,1 % TFA. Le gradient linéaire appliqué sur la colonne était : 0 à 67 % de solvant B pendant 30 minutes puis de 67 à 87 % de solvant B pendant 35 minutes. La détection se faisait à 215 nm. Le quadrapôle du spectromètre de masse était calibré pour un balayage de 400 à 1750 daltons avec une durée de 3,2 secondes et un délai de 0,1 secondes entre chaque balayage.

#### X.4 Analyse des acides aminés par dérivation au PITC.

##### Description de la méthode

La technique d'analyse des acides aminés comprend trois étapes: l'hydrolyse acide du peptide afin de libérer les aminoacides, la dérivation des acides aminés, et l'analyse par CLHP en phase inverse.

L'hydrolyse des peptides a été réalisée en utilisant une station PICOTAG (Waters). Elle est effectuée en présence de vapeurs d'acide chlorhydrique (6 N) et de 1 % de phénol pendant 24 H à 110°C. Les acides aminés sont ensuite dérivés par réaction avec le phénylisothiocyanate (PITC). Les phénylthiocarbamyl (PTC) aminoacides (Figure 2) ainsi formés sont alors analysés par CLHP sur une colonne Picotag de phase inverse du type C18 (0,39 × 15 cm, Waters) selon la méthode de Bidlingmeyer et coll. (1984).

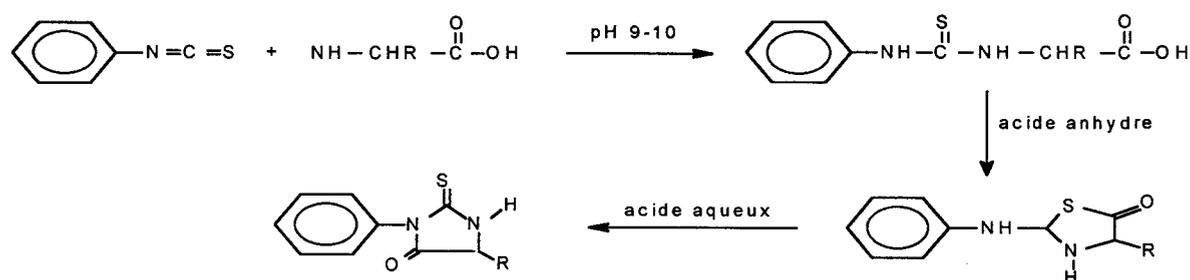


Figure 7 : Production des PTC aminoacides

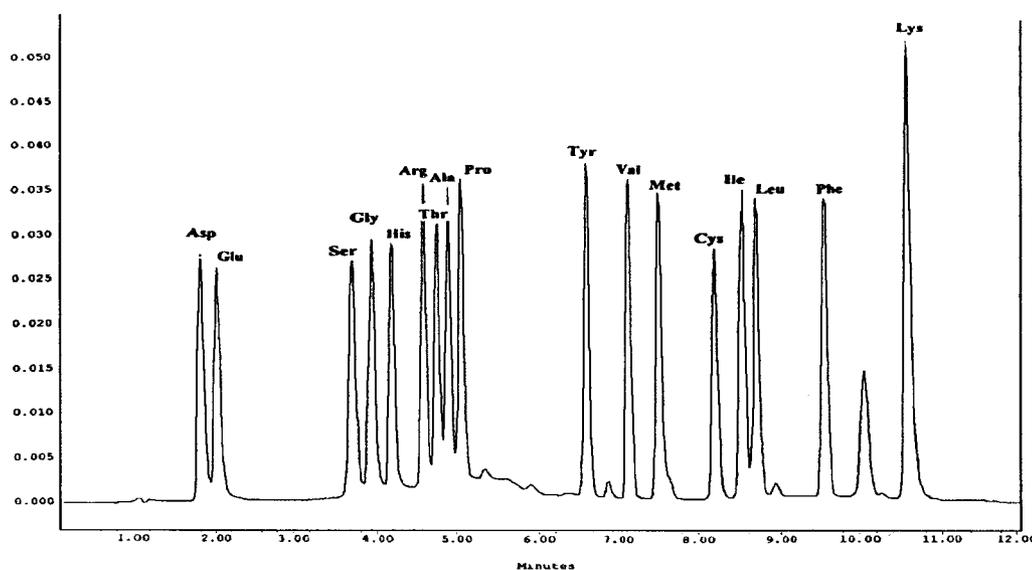
## Conditions de séparation

Le gradient utilisé pour la séparation est présenté sur le tableau 2. L'injection du standard permet d'obtenir un chromatogramme type (figure 3). Les profils chromatographiques des différents échantillons sont déterminés et les proportions relatives des différents acides aminés sont obtenues par comparaison avec le standard.

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
12,0	1,5	0	100
12,5	1,5	100	0
20	1,5	100	0
20,5	1	100	0

**Tableau 2 : Gradient appliqué lors de la séparation des acides aminés dérivés au PITC.**

Chaque peptide est recueilli à partir d'un volume d'hydrolysate de 240  $\mu$ l et est analysé, après hydrolyse et dérivation, en totalité sur la colonne Picotag.



**Figure 8 : Profil chromatographique obtenu pour 250 pmol de 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 quantité équimolaire) avec la colonne PICO-TAG en appliquant le gradient décrit dans le tableau 2.**

## XI. Détermination des coefficients de partage.

### *Coefficient de partage du butan-2-ol par rapport à l'octan-1-ol.*

Le butan-2-ol est titré par oxydo-réduction avec la dichromate de potassium ( $K_2Cr_2O_7$ ) en présence d'acide sulfurique (Hart et Conia, 1987). L'oxydation du butan-2-ol est menée par l'incubation de 100  $\mu$ l d'alcool avec 2 ml de solution de dichromate de potassium en présence d'acide sulfurique (26 g de  $K_2Cr_2O_7$  dans 24 ml d' $H_2SO_4$  concentré et complété à 200 ml avec de l'eau). Après 30 minutes d'oxydation totale de l'alcool à température ambiante, l'absorbance est lue à 590 nm. La quantité de butan-2-ol est déterminée grâce à une gamme d'étalonnage donnant la variation de l'absorbance à 590 nm en fonction de la quantité ( $\mu$ g) de butan-2-ol. Cette droite d'étalonnage est montrée sur la figure 5.

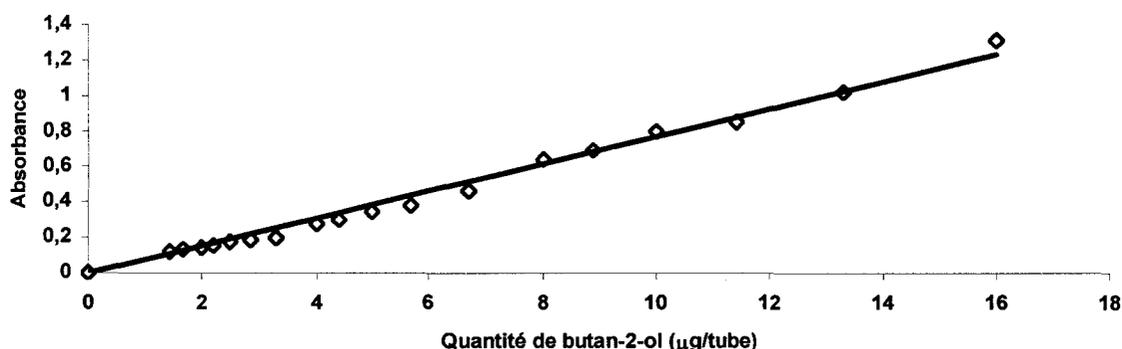


Figure 9. Absorbance mesurée à 590 nm en fonction de la quantité ( $\mu$ g) de butan-2-ol .

Coefficient de régression  $r=0,995$ .

La concentration (M) en butan-2-ol a été déterminée dans les phases aqueuses et organiques du plan de mélanges. Ainsi, le coefficient de partage du butan-2-ol de part et d'autre la phase tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 et la phase octan-1-ol a été déduit par le rapport des concentrations :  $(\text{butan-2-ol})_{\text{octan-1-ol}} / (\text{butan-2-ol})_{\text{tampon}}$ .

### *Coefficient de partage de la LVV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-7 par rapport au mélange tampon / butan-2-ol / octan-1-ol optimal.*

Les hydrolysats peptidiques résultant de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine à 1 % (p/v) dénaturée par l'urée (5,3 M) sont utilisés pour calculer le coefficient de partage de la LVVh-7 et VVh-7. L'hydrolysats à 3 % de degré d'hydrolyse corrigé correspond au degré

d'hydrolyse optimum de formation de la LVVh-7. L'hydrolysate à 11 % de degré d'hydrolyse corrigé correspond au degré d'hydrolyse optimum de formation de la VVh-7.

## **Protocole**

1 ml de l'hydrolysate est ajouté à 1 ml (v/v) du système tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 / butan-2-ol / octan-1-ol présent en proportion 45/45/10 (v/v/v). Une émulsion est créée par une forte agitation pendant 30 minutes puis l'ensemble est centrifugé (Universal 16 A Hettich Zentrifugen) pendant 10 minutes à 3000 tours/min.

Les phases organiques et aqueuses sont séparées puis analysées (10 µl pour les phases aqueuses et 30 µl pour les phases organiques) en Chromatographie Liquide Haute Performance en phase inverse sur une colonne de type C4.

## **XII. Adsorption de la LVV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-7 sur des résines.**

### **XII.1. Adsorbants hydrophobes.**

#### **Protocole d'adsorption**

1 gramme des résines Amberlite XAD 4, XAD 16, XAD 1180, XAD 7 HP et XAD 761 sont incubés en réacteur fermé à 23°C dans 10 ml de la phase organique issue du système optimal d'extraction de la LVVh-7 et de la VVh-7, c'est-à-dire 45 % (v/v) de tampon / 45 % (v/v) de butan-2-ol / 10 % (v/v) d'octan-1-ol. Des prélèvements (500 µl) sont effectués après 1, 2, 6 et 12 heures d'agitation du système réactionnel.

Les échantillons sont centrifugés (Universal 16 A Hettich Zentrifugen) à 3000 tours/min pendant 10 minutes de façon à précipiter les éventuels insolubles formés, puis fractionnés (injection de 200 µl) par CLHP de phase inverse sur une colonne de type C4.

#### **Protocole de désorption sur la résine XAD 761**

La résine (1 gramme) est récupérée après centrifugation à 3000 tours/min pendant 10 minutes.

Différents moyens d'élution sont utilisés en réacteur fermé et à 23°C : incubation de la résine dans l'éthanol (10 ml) ou dans l'acétone (10 ml) ou dans l'acétonitrile (10 ml). Des prélèvements (500 µl) sont effectués à 1, 3 et 24 heures puis centrifugés (Universal 16 A

Hettich Zentrifugen) à 3000 tours/min pendant 10 minutes. Les échantillons sont analysés (injection de 200 µl) par CLHP en phase inverse (colonne de type C4).

## **XII.2. Adsorbant hydrophile.**

### **Protocole d'adsorption**

5 grammes d'oxyde d'aluminium ( $Al_2O_3$ , oxyde d'aluminium 90 activé acide, Merck Ref. TA 673378 ; taille des particules 0,0063-0,200 mm) sont incubés en réacteur fermé et à 23°C dans 10 ml de la phase organique issue du système optimal d'extraction de la LVVh-7 et de la VVh-7, c'est-à-dire 45 % (v/v) de tampon / 45 % (v/v) de butan-2-ol / 10 % (v/v) d'octan-1-ol. Des prélèvements (500 µl) sont effectués après 1, 2, 4 et 12 heures d'agitation du système réactionnel, puis centrifugés (Universal 16 A Hettich Zentrifugen) à 3000 tours/min pendant 10 minutes. Les échantillons sont analysés (injection de 200 µl) sur CLHP en phase inverse (colonne de type C4).

### **Protocole de désorption**

Après centrifugation (Universal 16 A Hettich Zentrifugen) à 3000 tours/min pendant dix minutes, le support d'oxyde d'aluminium (5 grammes) est récupéré. Afin de retirer les éventuelles traces de solvants organiques butan-2-ol et octan-1-ol encore présentes à la surface du support, celui-ci est incubé avec de l'éthanol (20 ml) pendant deux heures. La totalité du support est incubé en réacteur fermé et à 23°C avec l'éthanolamine (100 mM, 20 ml), solvant aqueux basique. Des prélèvements sont effectués (4 et 8 heures) puis centrifugés à 3000 tours/min pendant 10 minutes de façon à précipiter les insolubles éventuellement présents. Les échantillons sont fractionnés (injection de 200 µl) par CLHP en phase inverse sur une colonne de type C4, après filtration sur un filtre en acétate de cellulose.

## **XIII. Plan de mélanges.**

L'hydrolyse pepsique est réalisée avec de l'hémoglobine bovine à 1 % (p/v) dans les 10 expériences qui constituent le plan de mélanges de l'extraction de la LVVh-7 et de la VVh-7, avec le système tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 / butan-2-ol / octan-1-ol (volume du réacteur 100 ml). L'hydrolyse est réalisée pendant 3 heures à 23°C avec la pepsine insolubilisée sur la Duolite A568 (180 mg de pepsine / 7 g de résine, qui correspondent environs à  $6.10^5$  U.A.E.) et sous une faible vitesse d'agitation, de façon à ne pas créer d'émulsion.

Au bout des 3 heures de réaction protéolytique, les phases aqueuse et organique sont centrifugées (Universal 16 A Hettich Zentrifugen) à 3000 tours/min pendant 10 minutes. Après séparation des deux phases, la phase organique est filtrée puis analysées (injection de 200  $\mu$ l) par CLHP en phase inverse (colonne de type C4).

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

## **CHAPITRE I.**

# **INCIDENCE DU MECANISME DE L'HYDROLYSE PEPSIQUE SUR L'OBTENTION DES PEPTIDES ACTIFS.**

Notre but, dans ce premier chapitre, était de montrer l'influence du mécanisme d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine à pH 4,5 sur l'obtention des peptides à activités biologiques. Notre étude s'appuie également sur les travaux réalisés par B. Lignot (1998), auxquels j'ai participé, sur les effets de solvant (impact de l'éthanol et de l'urée) sur la sélectivité de la réaction pepsique.

Nous avons analysé et comparé, dans une première partie, l'évolution des profils chromatographiques au cours de l'avancement de la réaction d'hydrolyse de l'hémoglobine native, de l'hémoglobine en présence de 20 % d'éthanol, et de l'hémoglobine dénaturée par l'urée, à pH 4,5. Ceci nous a permis de suivre l'évolution de la concentration d'hémoglobine (chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ ) au cours de l'avancement de la réaction. Nous avons alors tenté de caractériser le mode d'action de la pepsine sur l'hémoglobine native dont la structure repliée ne laisse que très peu de sites directement accessibles à l'enzyme, et sur l'hémoglobine dénaturée pour laquelle l'ensemble des liaisons peptidiques sont exposées.

Dans une seconde partie, nous avons mis en évidence des peptides à activités biologiques, déjà répertoriés dans la littérature, parmi l'ensemble des peptides obtenus au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine à pH 4,5 dans les trois conditions d'hydrolyse citées.

Nous avons évalué l'impact de ces trois milieux sur la cinétique d'apparition des peptides actifs et ainsi montré l'importance de la conformation de l'hémoglobine sur leur cinétique d'apparition.

Ces travaux ont fait l'objet de deux articles parus dans *Biotechnology and Applied Biochemistry*: Articles 1 et 2.

## I.1. Effet de solvant sur le mécanisme d'hydrolyse de l'hémoglobine.

L'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine a été réalisée à pH 4,5 et à 23°C dans trois milieux différents: dans le "milieu tampon" (hémoglobine native à 0,2 % (p/v) dans un tampon acétate de sodium 0,1 M), dans le "milieu éthanol" (hémoglobine native à 0,2 % (p/v) dans le même tampon en présence de 20 % (v/v) d'éthanol), et dans le "milieu urée" (hémoglobine dénaturée à 0,2 % (p/v) dans le tampon acétate 0,1 M). Le rapport enzyme / substrat était de 1/11 (mol/mol). Des prélèvements ont été effectués à intervalles réguliers sur une période de trois jours. Les différents prélèvements ont subi un fractionnement par CLHP sur une colonne de phase inverse du type C4. La figure 10 montre l'évolution de l'hémoglobine, en pourcentage de chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  non hydrolysée, en fonction du temps d'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine dans les trois milieux.

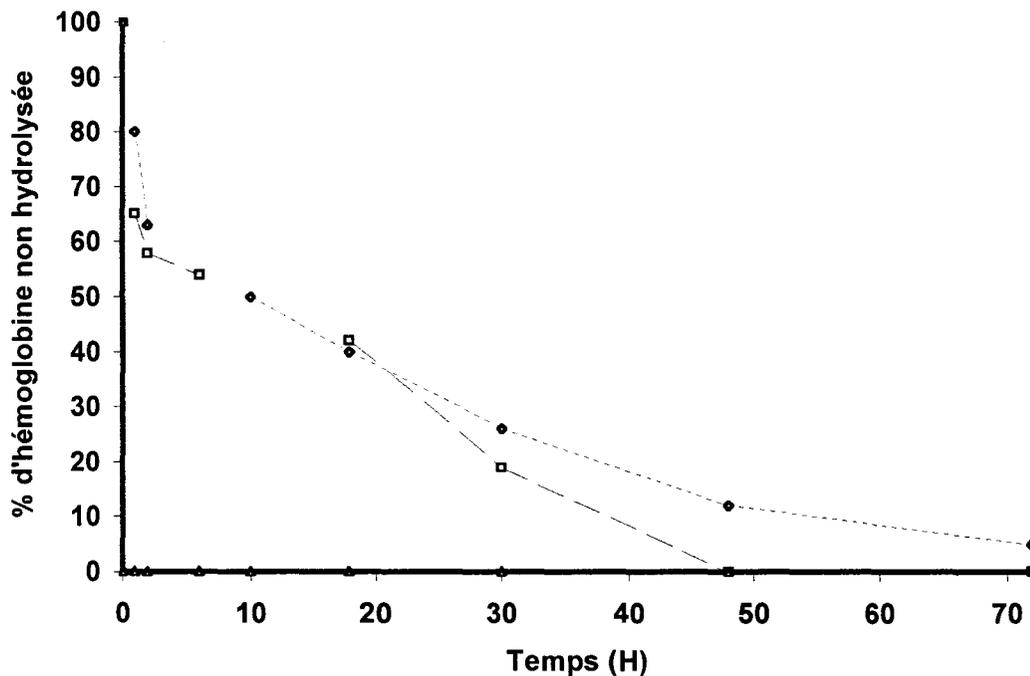


Figure 10. Evolution du pourcentage d'hémoglobine restant en fonction du temps (Heures) d'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine native (◇), native en présence de 20 % d'éthanol (□), et dénaturée à l'urée (△).

Ces courbes montrent distinctement que l'hydrolyse de l'hémoglobine procède bien plus rapidement dans le milieu urée que dans les milieux tampon et éthanol. Dans le milieu urée, les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont intégralement consommées dès le début de la réaction d'hydrolyse alors que dans le milieu tampon ou éthanol des chaînes d'hémoglobine intactes sont encore présentes, même après 24 heures d'hydrolyse. Elles disparaissent néanmoins plus rapidement dans le milieu hydro-alcoolique : elles sont entièrement consommées après 48 heures de réaction alors qu'à ce stade de l'hydrolyse, des chaînes d'hémoglobine subsistent encore dans le milieu tampon.

Les figures 11 à 13 présentent l'évolution des profils chromatographiques au cours du temps, obtenus à partir des hydrolysats pepsiques de l'hémoglobine native (figure 11), native en présence de 20 % (v/v) d'éthanol (figure 12) et dénaturée par l'urée (figure 13)

Dans les milieux urée et éthanol, on assiste à un déplacement progressif du massif de pics vers des temps de rétention plus courts au fur et à mesure que progresse l'hydrolyse: les macropeptides hydrophobes initialement créés sont clivés en peptides de plus en plus hydrophiles. Le milieu tampon présente, par contre, une population en peptides dont les temps de rétention sont majoritairement invariants. L'hydrolyse de l'hémoglobine native semble consister davantage en l'accumulation progressive d'une population donnée de peptides et ce dès le début de la protéolyse.

Les gros peptides hydrophobes, générés en début d'hydrolyse dans le milieu urée, sont repérables dans le milieu éthanol (signalés en rouge sur les figures 12 et 13). Ils s'y accumulent en quantité plus faible mais restent stables sur une plus longue période. Par contre, ils ne sont pas ou peu formés lors de l'hydrolyse de l'hémoglobine native.

Cette première analyse montre que la conformation dénaturée de l'hémoglobine est intéressante d'un point de vue de l'obtention de macropeptides intermédiaires hydrophobes. Ces derniers sont visibles et légèrement stabilisés lorsque l'hémoglobine est hydrolysée en présence d'éthanol, alcool aliphatique miscible à l'eau.

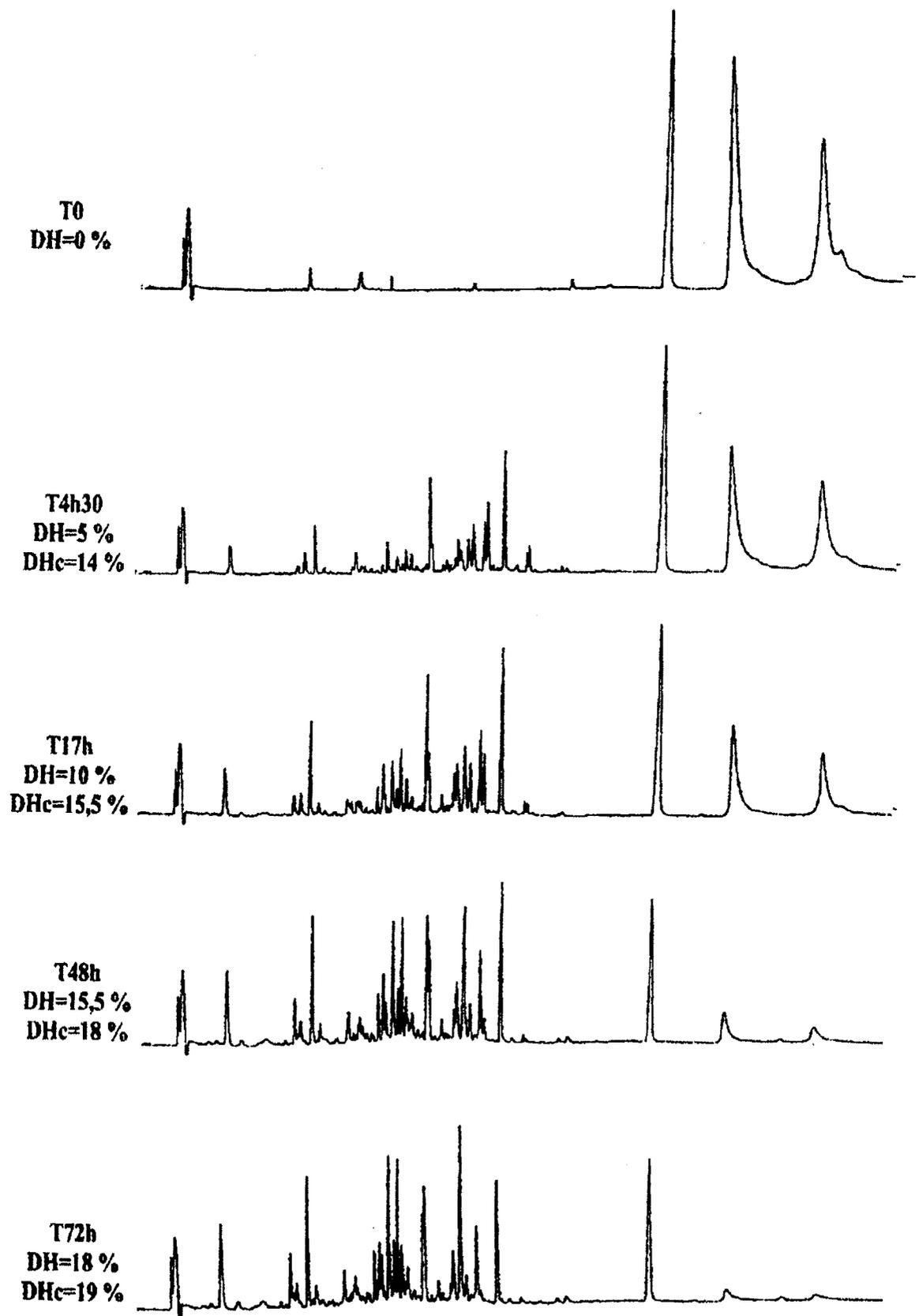


Figure 11. Evolution des profils chromatographiques au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine native à pH 4,5.

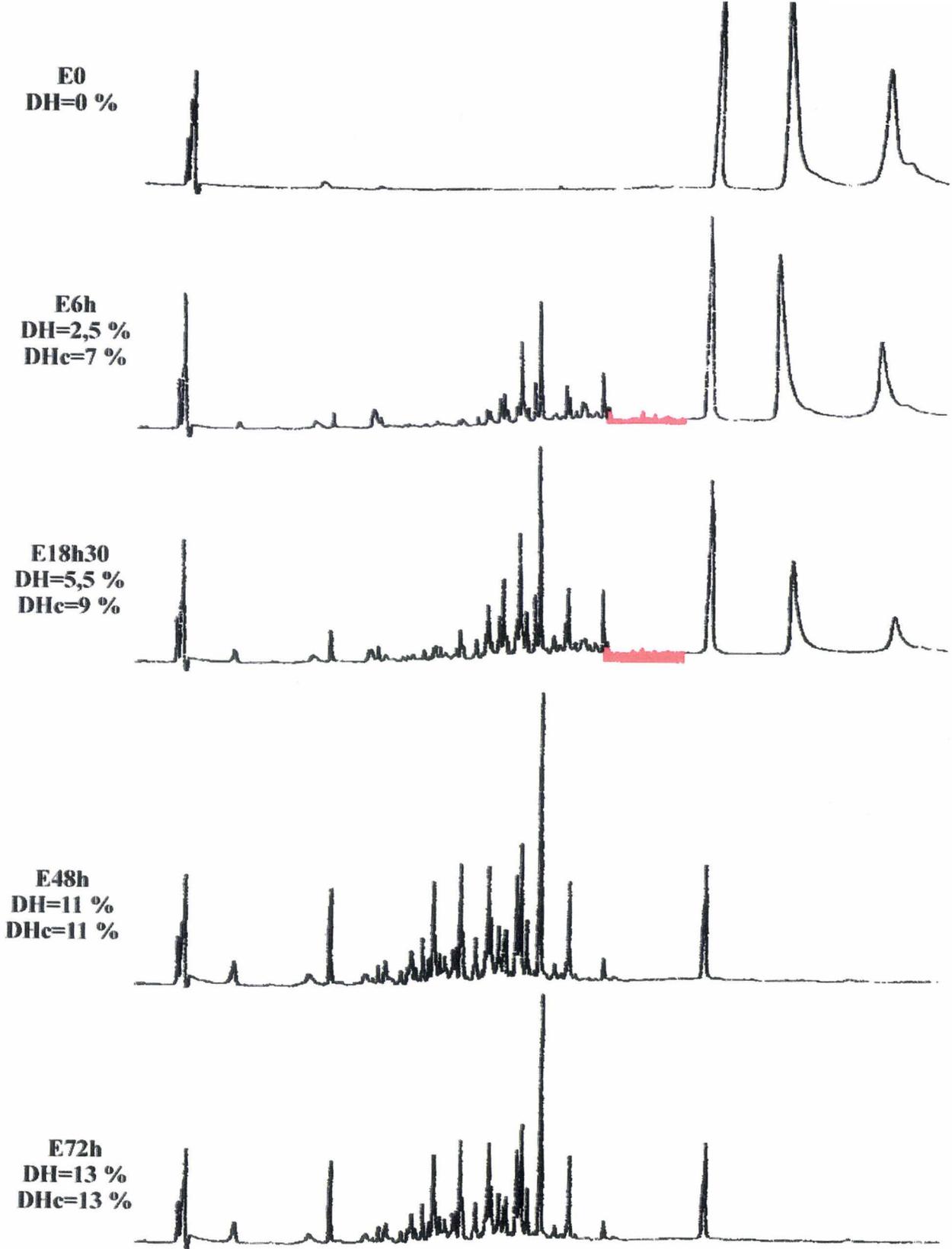


Figure 12. Evolution des profils chromatographiques au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine native en présence de 20 % (v/v) d'éthanol à pH 4,5.

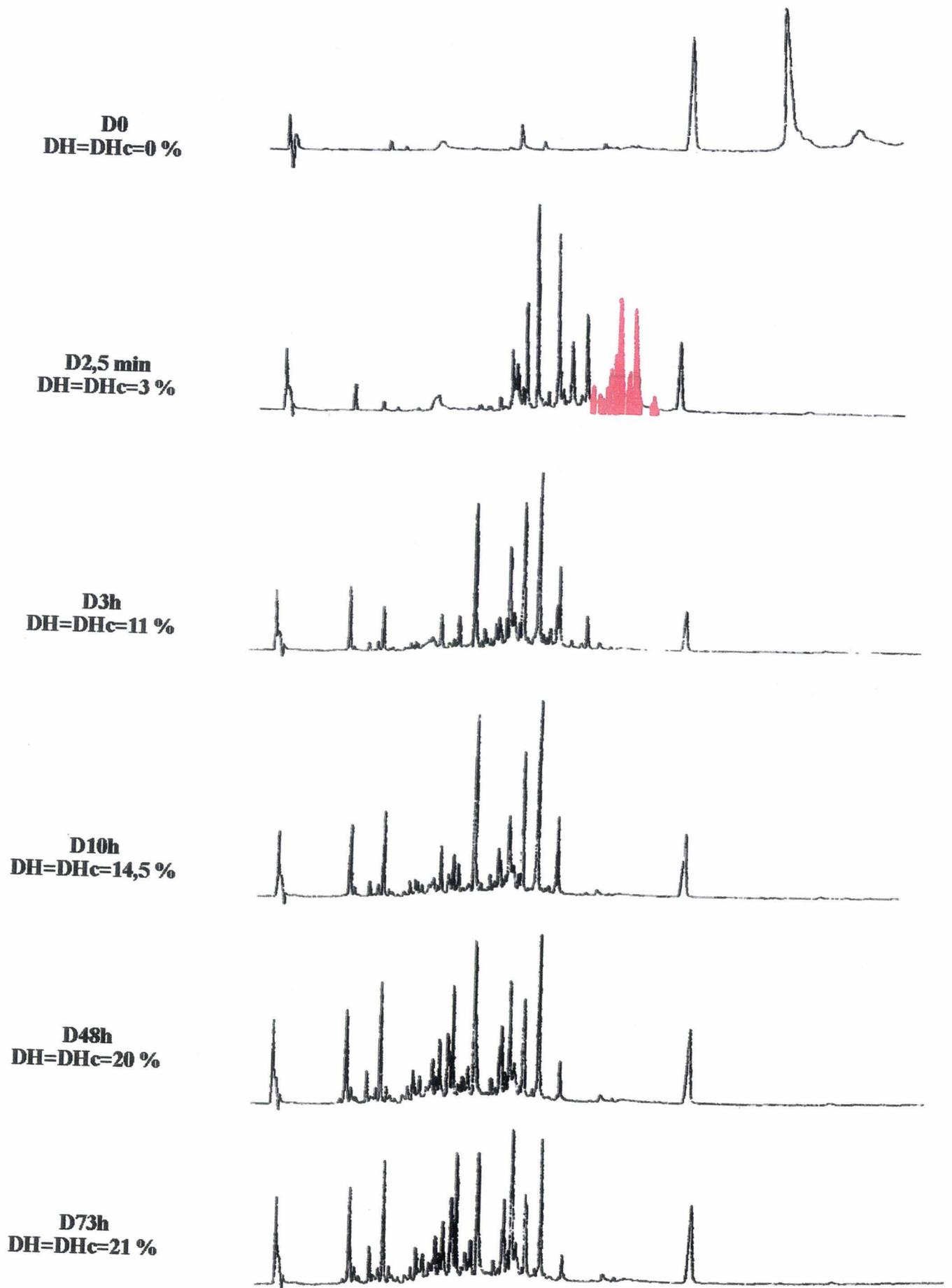
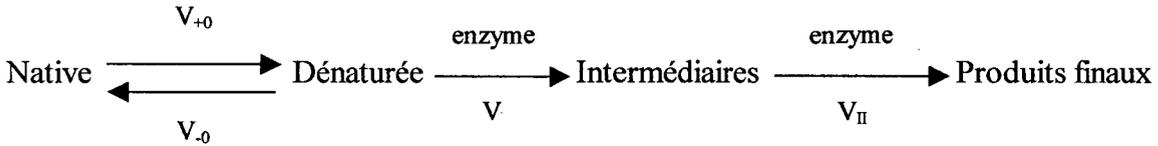


Figure 13. Evolution des profils chromatographiques au cours de l'hydrolyse pepsique à pH 4,5 de l'hémoglobine dénaturée à l'urée.

L'hémoglobine native est hydrolysée immédiatement en peptides de petites tailles alors que l'hydrolyse de l'hémoglobine dénaturée procède plutôt par la formation et le clivage d'une succession de peptides intermédiaires plus ou moins stables. Linderstrom-Lang a établi un modèle simplifié pour expliquer ces phénomènes fréquemment observés lors de l'hydrolyse de protéines globulaires :



avec une constante d'équilibre pour la dénaturation réversible:  $K_0 = k_{-0}/k_{+0}$  et une vitesse de réaction pour la dénaturation:  $v_0 = v_{+0} - v_{-0}$ .

Lors de l'hydrolyse de l'hémoglobine native, la réaction de dénaturation constitue l'étape limitante car  $v_0 \ll v_1$ . La protéolyse procède donc à une vitesse déterminée par  $v_0$ . Aucune quantité appréciable d'intermédiaires n'est présente et le mélange se compose essentiellement de la protéine native et des produits finaux. La pepsine hydrolyserait donc l'hémoglobine native par un mécanisme appelé "one by one" par Linderstrom-Lang. Cela signifie que la protéase dégrade une molécule d'hémoglobine à la fois.

Dans le cas de l'hémoglobine dénaturée  $v_1$  constitue alors, au moins initialement, l'étape limitante. En début de protéolyse, la pepsine coupe l'hémoglobine bovine dénaturée en très gros peptides qui sont par la suite progressivement transformés en des peptides de plus petite taille. La pepsine hydrolyserait donc l'hémoglobine dénaturée selon un mécanisme appelé "zipper" par Linderstrom-Lang, mécanisme qui suppose une conversion rapide de la protéine en des produits de dégradation intermédiaires et consiste en un clivage progressif (par étapes) des intermédiaires formés.

Globalement, l'hydrolyse de l'hémoglobine en présence d'éthanol se caractérise par une consommation plus rapide des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  par rapport au « milieu tampon », révélée par la figure 1, une stabilisation des fragments d'hydrolyse intermédiaires et un clivage moins intensif des chaînes. La présence d'éthanol permettrait non seulement d'améliorer l'accessibilité des sites de clivage présents sur l'hémoglobine bovine mais aussi de restreindre l'étendue de la protéolyse pepsique. En présence d'éthanol, la pepsine hydrolyse l'hémoglobine bovine native par un mécanisme intermédiaire entre le mécanisme "one by one" et le mécanisme "zipper". Le mécanisme "one by one" implique uniquement la présence

de la protéine native et des produits finaux dans le milieu réactionnel (cas de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine native dans le tampon). Or, des fragments d'hydrolyse intermédiaires sont visualisés en présence d'éthanol. D'autre part, de l'hémoglobine intacte subsiste lors de l'hydrolyse en présence d'éthanol, ce qui se caractérise par la conversion de la protéine en des produits de dégradation intermédiaires.

Le modèle de Linderstrom-Lang nous a permis d'interpréter qualitativement les différences de population peptidique initiale dans les différents milieux étudiés. Les mêmes travaux menés par B. Lignot (1998) ont ensuite permis l'identification des populations peptidiques présentes dans chaque milieu.

## **I.2. Effet de solvant sur les cinétiques d'apparition de peptides à activités biologiques.**

### *Isolement des peptides à activités biologiques.*

Les fractions séparées par CLHP en phase inverse ont été récoltées et analysées par spectrométrie de masse à ionisation par désorption laser afin de vérifier la pureté et la masse moléculaire du ou des peptides les constituant. Les composants majoritaires des fractions purifiées ont été recueillis et leur composition en acides aminés a été déterminée. Les peptides correspondant à chacun des pics ont ainsi pu être identifiés.

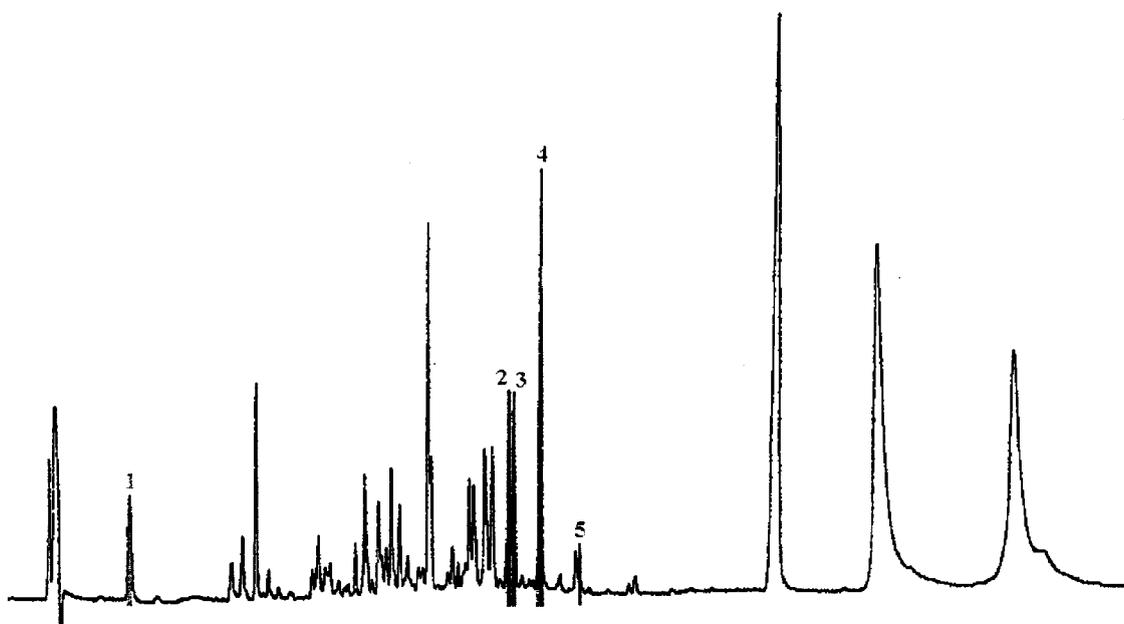
Ainsi nous avons repéré cinq peptides à activités biologiques, dans les fractions numérotées de 1 à 5 (figure 14). Ces peptides ont été isolés en une seule étape chromatographique par CLHP en phase inverse au sein d'un hydrolysate pepsique d'hémoglobine bovine à 0,2 % (p/v) obtenu après 10 heures d'hydrolyse dans le tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5. Parmi ces cinq peptides, quatre ont déjà été isolés à partir d'un hydrolysate pepsique d'hémoglobine bovine à pH 2.

- Les fractions 4 et 5 renferment chacune un peptide opioïde : la **VV-hémorphine-7** ( $\beta$ 31-40) est contenue dans la fraction 4 et est éluée avec un temps de rétention de 27,2 minutes, et la **LVV-hémorphine-7** est présente dans la fraction 5 avec un temps de rétention de 28,9 minutes. Ces deux peptides ont été isolés au sein de notre laboratoire par Piot et coll. (1992a), par la succession de la chromatographie d'exclusion stérique et de la CLHP en phase inverse.

- La fraction 3 contient un **peptide potentialisateur de la Bradykinine** ( $\alpha$ 110-125) avec un temps de rétention de 24,9 minutes. Ce peptide a également été identifié dans notre laboratoire par Piot et coll. (1992b), grâce à la combinaison de la filtration sur gel et de la CLHP en phase inverse.

- Un peptide analgésique, la **néokyotorphine** ( $\alpha$ 137-141), qui est élué avec un temps de rétention de 6,6 minutes et présent dans la fraction 1.. Ce peptide a été isolé par Zhao et coll. (1998a) à partir de l'hémoglobine bovine.

- Un troisième peptide opioïde, la **VV-hémorphine-4** ( $\beta$ 32-37) est présent dans la fraction 2 avec un temps de rétention de 24,5 minutes. Ce peptide a été identifié par Barkhudaryan et coll. (1992), à partir de l'hypothalamus bovin. Il n'a jamais été isolé à partir d'un hydrolysat peptidique d'hémoglobine bovine.



**Figure 14. Mise en évidence de peptides à activités biologiques au sein d'un hydrolysat pepsique d'hémoglobine obtenu après 10 heures d'hydrolyse dans le milieu tampon acétate de sodium 0,1 M (E/S=1/11 mol/mol).**

Les spectres de masse de ces cinq fractions sont représentés dans les figures 15 à 19. Ces spectres révèlent que chaque peptide actif, cité auparavant et présent dans une des cinq fractions, était pur.

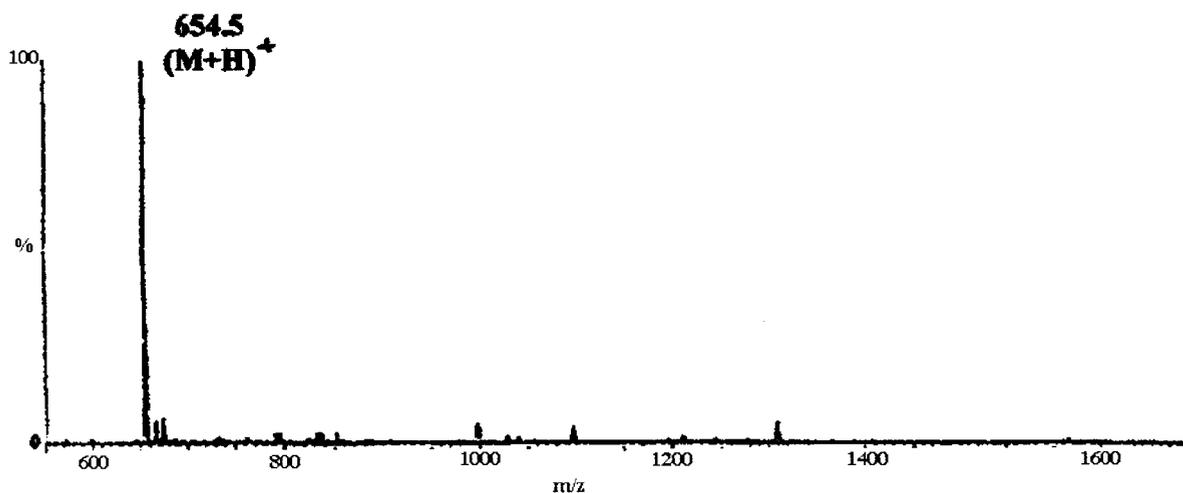


Figure 15. Spectre de masse en désorption laser de la fraction 1 (alkylmorphine).

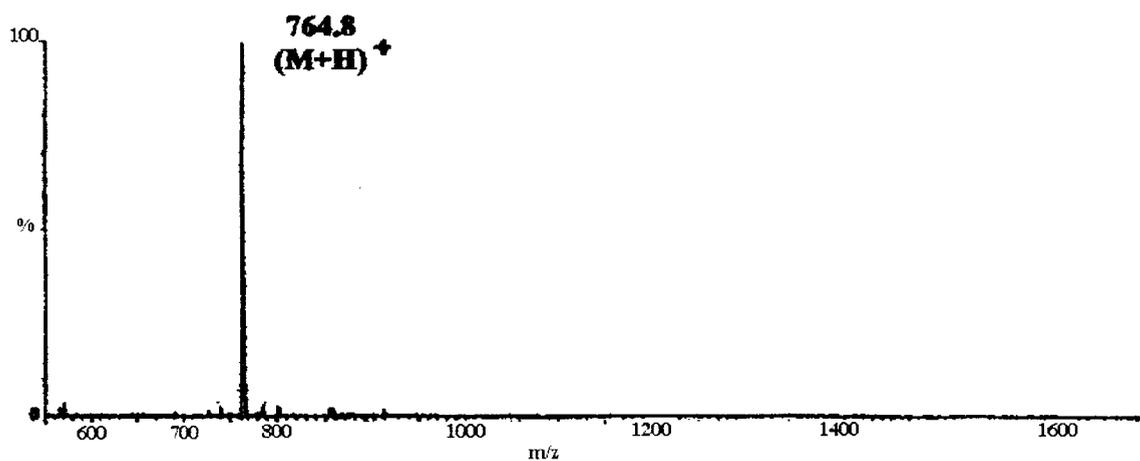


Figure 16. Spectre de masse en désorption laser de la fraction 2 (VV-hémorphine-4).

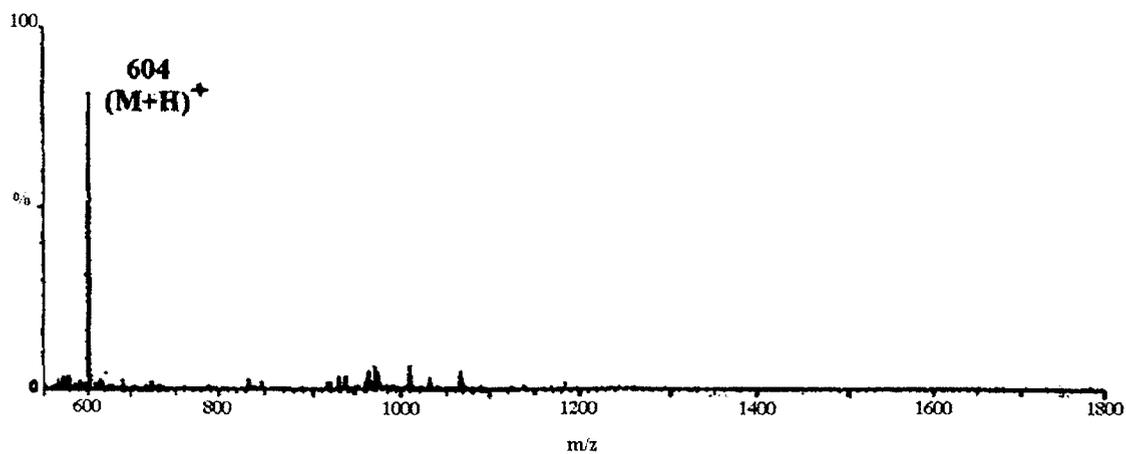


Figure 17. Spectre de masse en désorption laser de la fraction 3 (peptide potentialisateur de la Bradykinine).

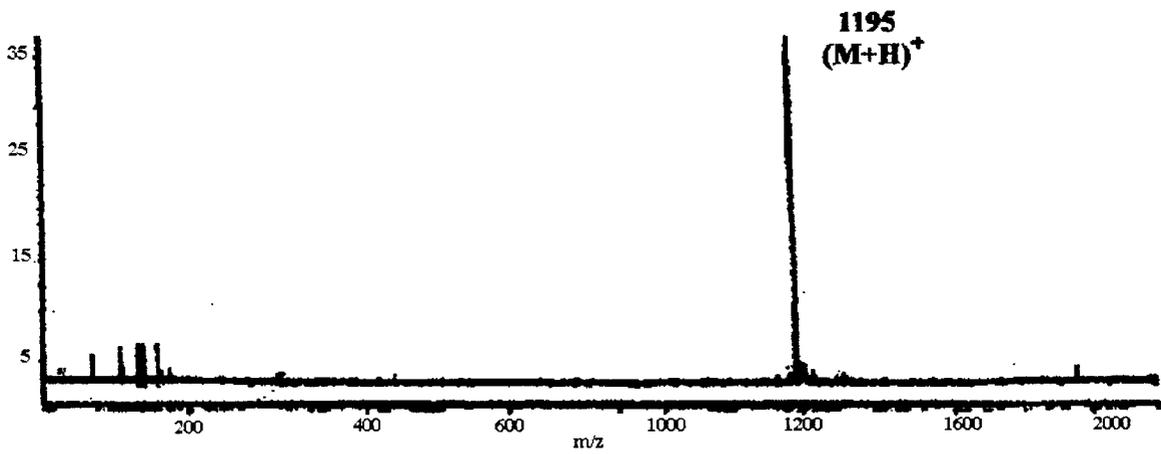


Figure 18. Spectre de masse en désorption laser de la fraction 4 (VV-hémorphine-7).

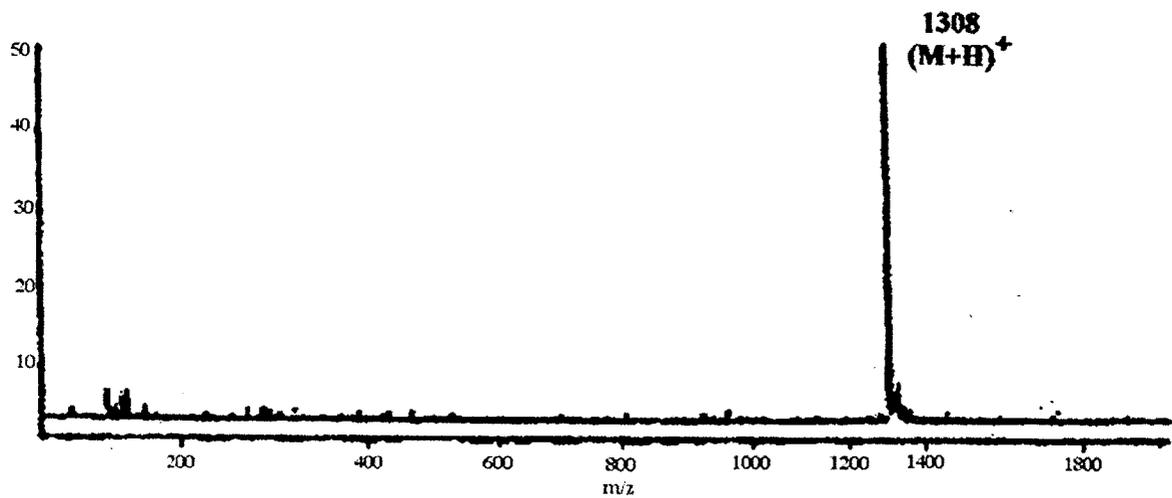


Figure 19. Spectre de masse en désorption laser de la fraction 5 (LVV-hémorphine-7).

### **Caractérisation de la VV-hémorphine-4.**

Nous avons caractérisé ce peptide opioïde par spectrométrie de masse en mode MALDI. La figure 16 montre le spectre de masse correspondant : la masse moléculaire protonée du peptide est de 764,8 Da. Selon cette masse moléculaire, et en tenant compte de la composition en acides aminés d'une chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine, nous avons déduit que ce peptide correspondait au fragment 32-37 de la chaîne  $\beta$ , c'est-à-dire  $^{32}\text{Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr}^{37}$ . Nous avons vérifié la structure primaire de ce peptide grâce à une fragmentation par la spectrométrie de masse à ionisation électrospray en tandem (SM-IES/SM). Le principe est le suivant : dans la cellule de collision du spectromètre de masse, la dissociation de l'ion précurseur  $[\text{M}+\text{H}]^+$  à analyser est provoquée par la collision des particules d'électrons produisant ainsi des fragments ioniques multichargés. La figure 11 montre le spectre de ces ions multichargés, résultant de la collision, ainsi que la taille des fragments correspondants. L'interprétation de cette fragmentation résultait dans la reconnaissance de cette série d'ions, qui a permis d'en déduire la séquence primaire :  $^{32}\text{Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr}^{37}$ . En tenant compte de cette séquence, le peptide analysé correspondait bien au fragment 32-37 de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine. Ce résultat était d'ailleurs confirmé par l'analyse des acides aminés du peptide selon la méthode Picotag, indiquée dans le tableau 1. La composition en acides aminés était totalement en accord avec l'analyse comparative du spectre de la fragmentation en spectrométrie de masse. Ces résultats ont prouvé sans ambiguïté que la VVh-4 (Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr) est bien générée à partir d'un hydrolysate pepsique de l'hémoglobine bovine à pH 4,5.

Acide aminé	Proportion dans la VV-hémorphine-4	Acide aminé	Proportion dans la VV-hémorphine-4
Asp	0	Tyr	1,00
Glu	0	Val	1,96
Ser	0	Met	0
Gly	0	Cys	0
His	0	Ile	0
Arg	0	Leu	0
Thr	0,94	Phe	0
Ala	0	Lys	0
Pro	1,05	Trp	Non déterminé

**Tableau 3. Proportion de chaque résidu dans le peptide identifié comme la VV-hémorphine-4, issue de la méthode Picotag.**

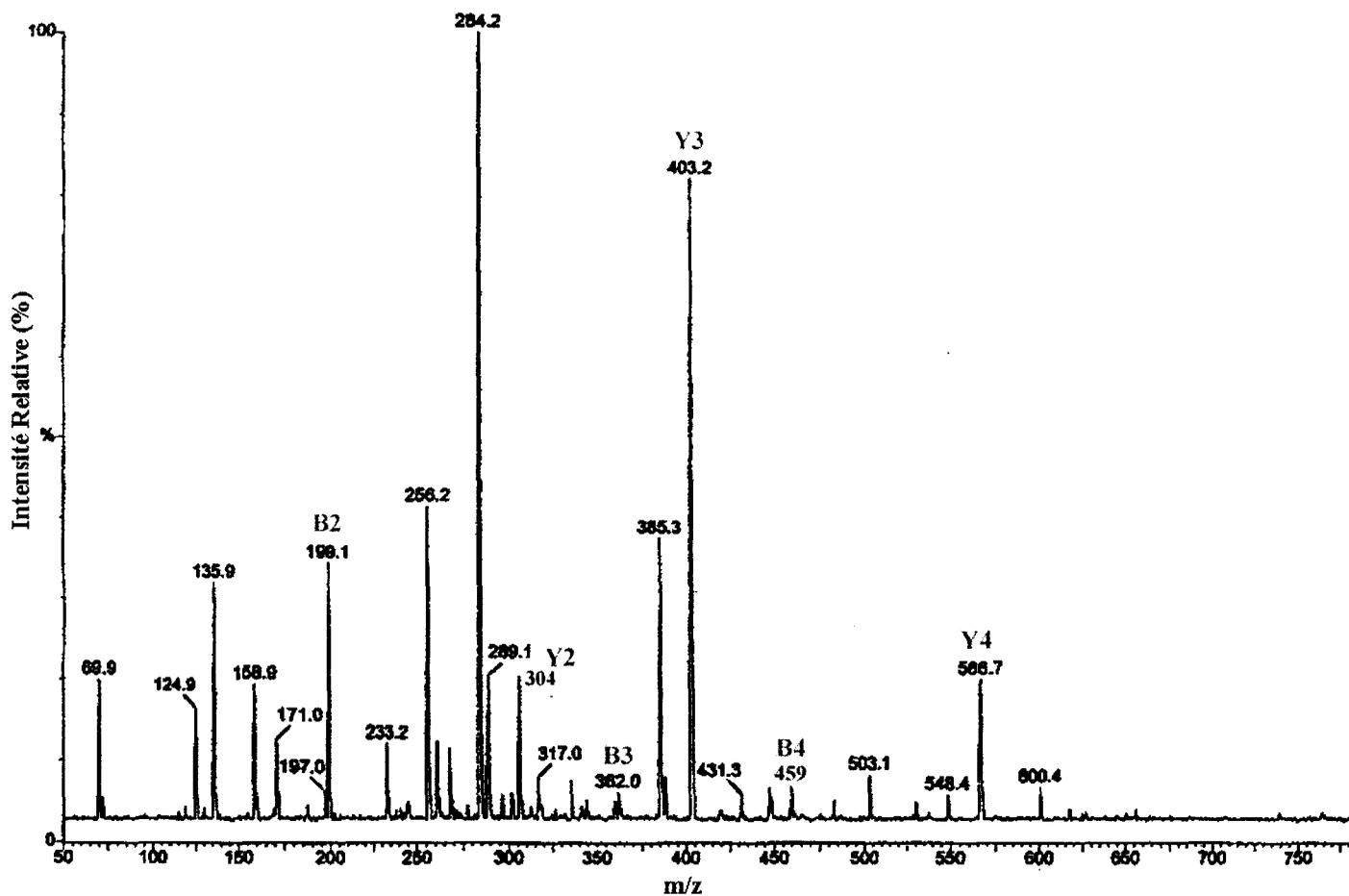
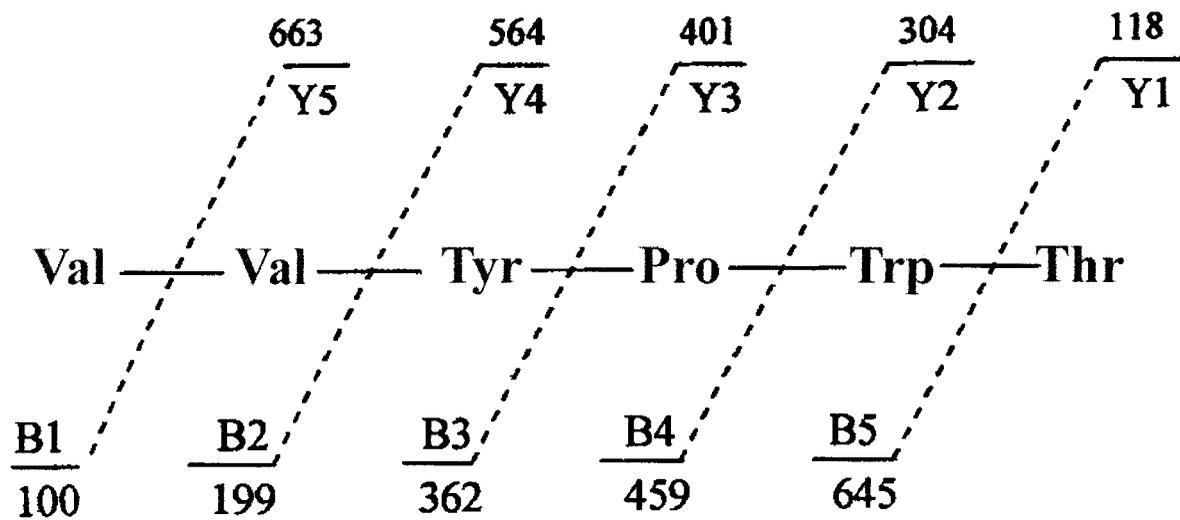


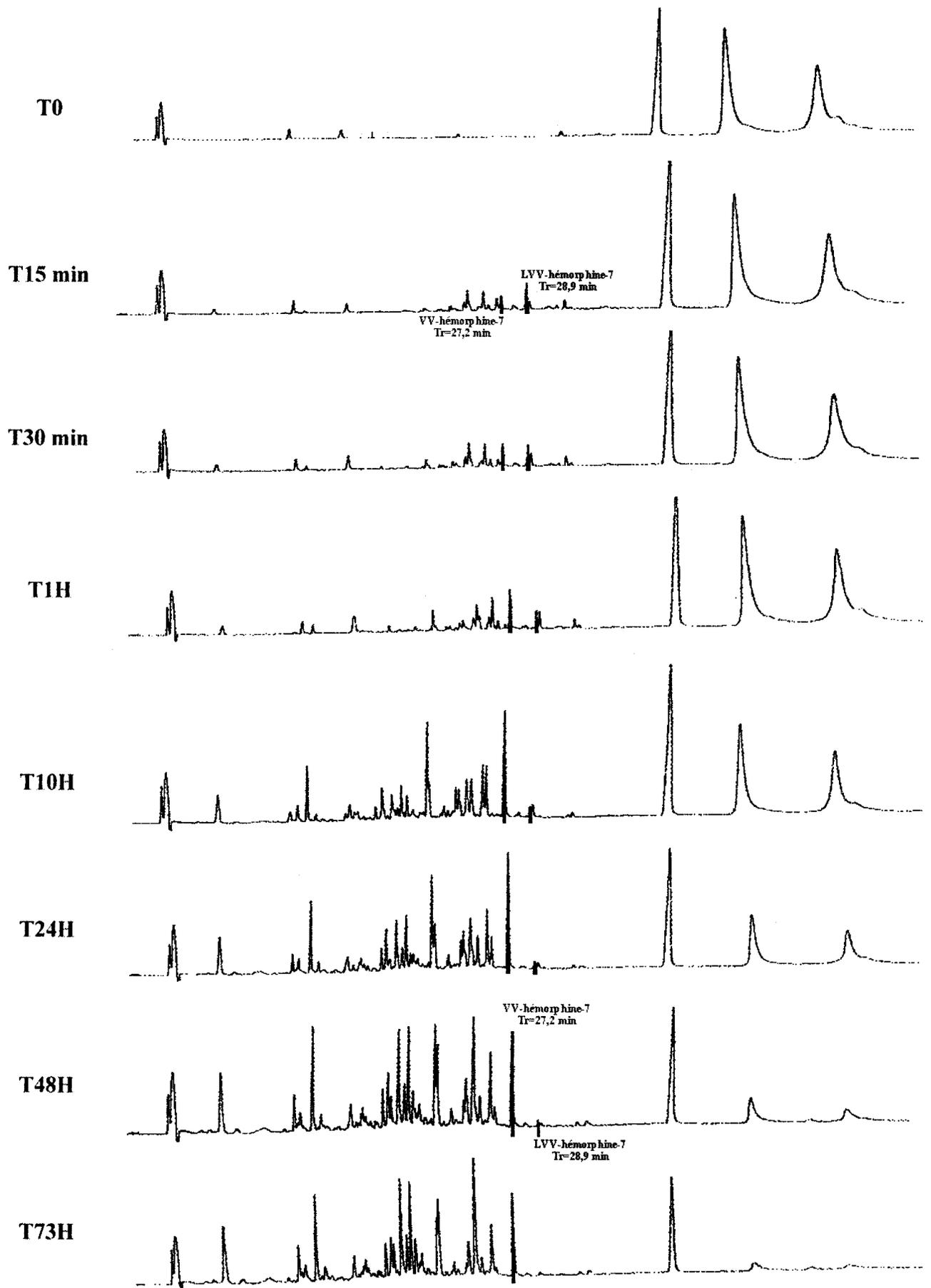
Figure 20. Fragmentation de la VV-hémorphine-4.

## I.2.1. Peptides opioïdes LVV-hémorphine-7 et VV-hémorphine-7

### *I.2.1.1. Cinétique d'apparition de la LVV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-7 dans le tampon*

Les cinétiques d'évolution des deux hémorphines au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine dans le tampon acétate 0,1 M pH 4,5 ont été suivies pendant 73 heures. La VVh-7 et la LVVh-7 ont été détectées sur les profils chromatographiques de la figure 21.

Les temps de rétention de chaque hémorphine sont restés inchangés pendant toute la durée de l'hydrolyse de l'hémoglobine à pH 4,5, c'est-à-dire 27,2 minutes pour la VVh-7 et 28,9 minutes pour la LVVh-7. D'après la figure 21, la concentration de la LVVh-7 croît jusqu'à environs une heure d'hydrolyse pour ensuite diminuer : ce peptide n'est plus détecté qu'à l'état de traces après 24 heures. La VVh-7 voit également sa concentration croître jusqu'à un optimum d'environs 24 heures de réaction protéolytique, puis elle diminue : elle est néanmoins toujours détectée, même après 73 heures d'hydrolyse. Ces deux peptides opioïdes correspondent donc à des peptides intermédiaires de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine à pH 4,5 : après l'atteinte d'un optimum de production, ils deviennent à leur tour substrat de la pepsine.



**Figure 21. Cinétique d'apparition de la LVV-hémorphine-7 et VV-hémorphine-7 au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine à pH 4,5 dans le tampon acétate de sodium 0,1 M (E/S=1/11, mol/mol).**

### I.2.1.2. Effet de solvant sur la production et les cinétiques d'apparition de la LVV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-7

Nous avons comparé les cinétiques d'apparition des deux hémorphines pendant l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine, dans le solvant acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 ("milieu tampon"), et dans le même tampon contenant soit de l'urée (5,3 M, "milieu urée"), qui engendre la dénaturation de l'hémoglobine, soit 20 % (v/v) d'éthanol ("milieu éthanol"), dont nous avons démontré au préalable son effet stabilisant sur la conformation de l'hémoglobine (Nedjar-Arroume et coll. 1993).

L'impact de ces trois milieux a été déterminé en mesurant l'évolution de l'aire de la LVVh-7 (figure 22) et de la VVh-7 (figure 23) en fonction du degré d'hydrolyse corrigé (DHc).

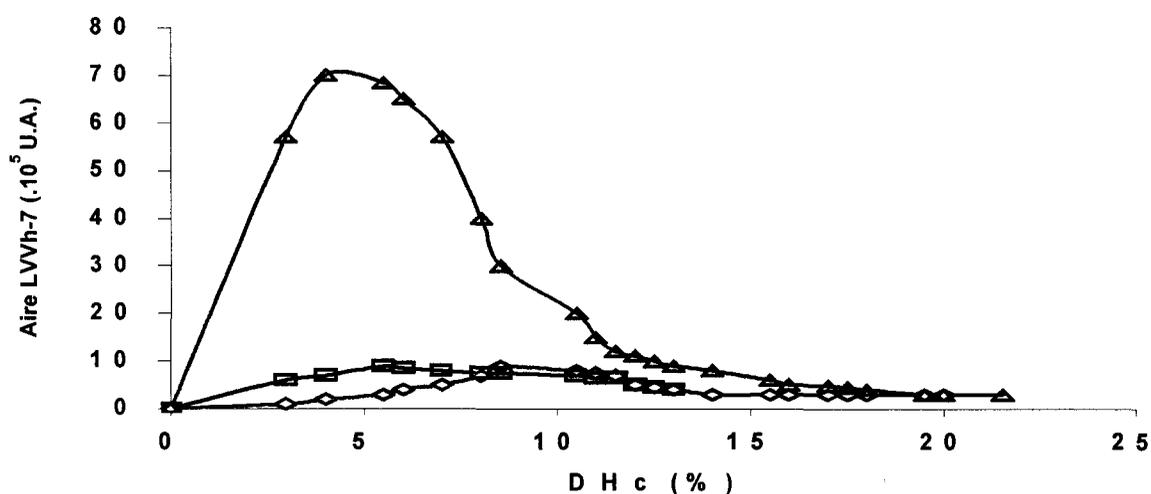
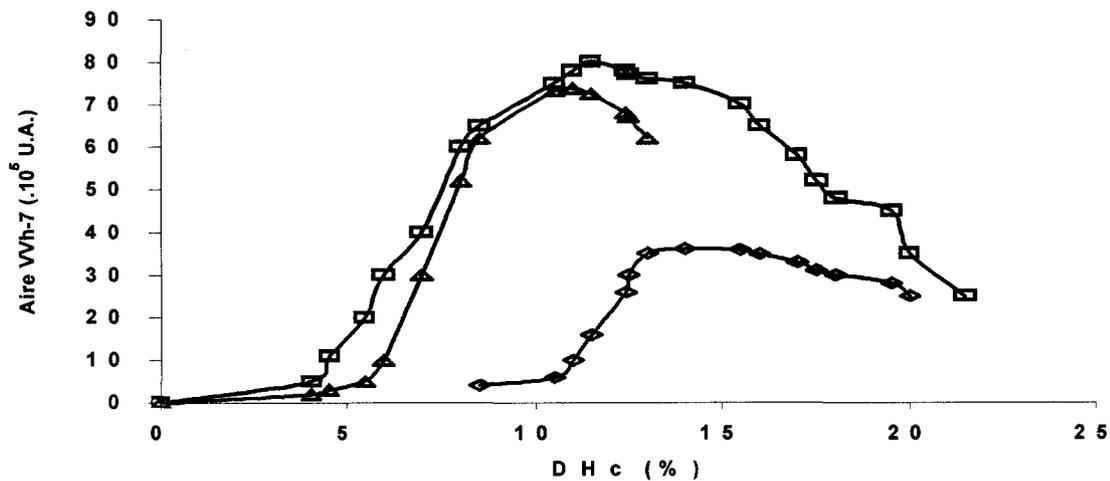


Figure 22. Evolution de l'aire de la LVV-hémorphine-7 en fonction du degré d'hydrolyse corrigé (DHc) de l'hémoglobine à 0,2 % (p/v), dans les milieux tampon (◇), éthanol (□) et urée (Δ), à 23°C et à pH 4,5.



**Figure 23. Evolution de l'aire de la VV-hémorphine-7 en fonction du degré d'hydrolyse corrigé (DHc) de l'hémoglobine à 0,2 % (p/v), dans les milieux tampon (◇), éthanol (□) et urée (Δ), à 23°C et à pH 4,5.**

En présence d'éthanol les concentrations optimales des deux hémorphines sont observées à des DHc faibles (6 % pour la LVVh-7 et 11 % pour la VVh-7), comparée à celles observées dans le tampon. La présence de ce solvant augmente le taux de VVh-7, tandis qu'un faible impact est constaté sur l'accumulation de la LVVh-7 qui n'est observée qu'à l'état de traces aussi bien dans le "milieu tampon" que dans le "milieu éthanol".

Contrairement au solvant éthanol, la dénaturation de l'hémoglobine, due à la présence d'urée, augmente de manière significative les taux des deux hémorphines. L'optimum de concentration est observé à faible DHc, comme dans le cas du "milieu éthanol", contrairement au "milieu tampon". L'aire de la LVVh-7 est sept fois plus importante dans le "milieu urée" que dans le "milieu tampon", et celle de la VVh-7 est 2,5 fois plus grande. Le tampon contenant l'urée apparaît donc le meilleur solvant pour la préparation des deux hémorphines, probablement due à l'exposition des liaisons peptidiques Leu<sup>30</sup>-Leu<sup>31</sup>, Phe<sup>40</sup>-Phe<sup>41</sup> et Leu<sup>31</sup>-Val<sup>32</sup>, liaisons génératrices de la LVVh-7 et de la VVh-7, à la digestion pepsique.

Nous avons comparé, grâce à la figure 24, les cinétiques d'apparition des deux hémorphines pendant l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine, en fonction du DHc, dans le

"milieu tampon " (figure 24a), dans le "milieu éthanol" (figure 24b) et dans le "milieu urée" (figure 24c), à pH 4,5.

Nous pouvons observer que l'éthanol ou l'urée ne modifient pas l'ordre d'apparition de la LVVh-7 et VVh-7, mais que les concentrations de ces deux peptides sont les plus élevées dans le milieu urée, contrairement au "milieu tampon". Pour la préparation des deux hémorphines, les conditions optimales sont l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine dénaturée par l'urée : la LVVh-7 est en concentration optimale pour un DHc de 3 %, tandis que la VVh-7 atteint son maximum de concentration à 11 % de DHc (figure 24c).

Nous avons également remarqué que la VVh-7 est générée en grande quantité seulement lorsque la concentration de la LVVh-7 diminue. Ce résultat suggère que les deux hémorphines sont produites successivement pendant l'hydrolyse de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine. Zhao et coll. (1996b) ont observé la disparition de la LVVh-7 et l'augmentation consécutive de la VVh-7, pendant l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine à pH 2. Ils ont ainsi déduit que la LVVh-7 était un précurseur de la formation de la VVh-7.

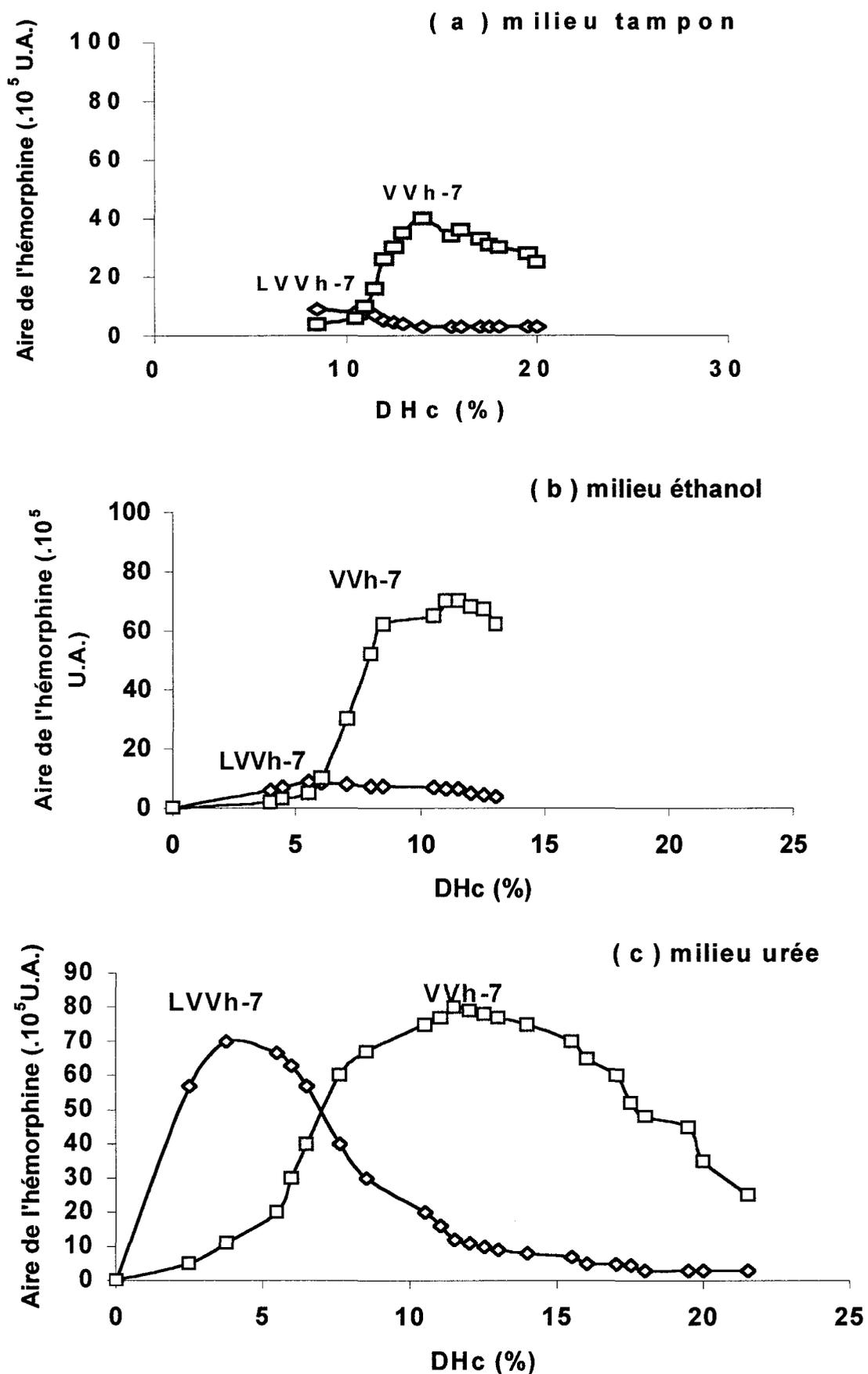


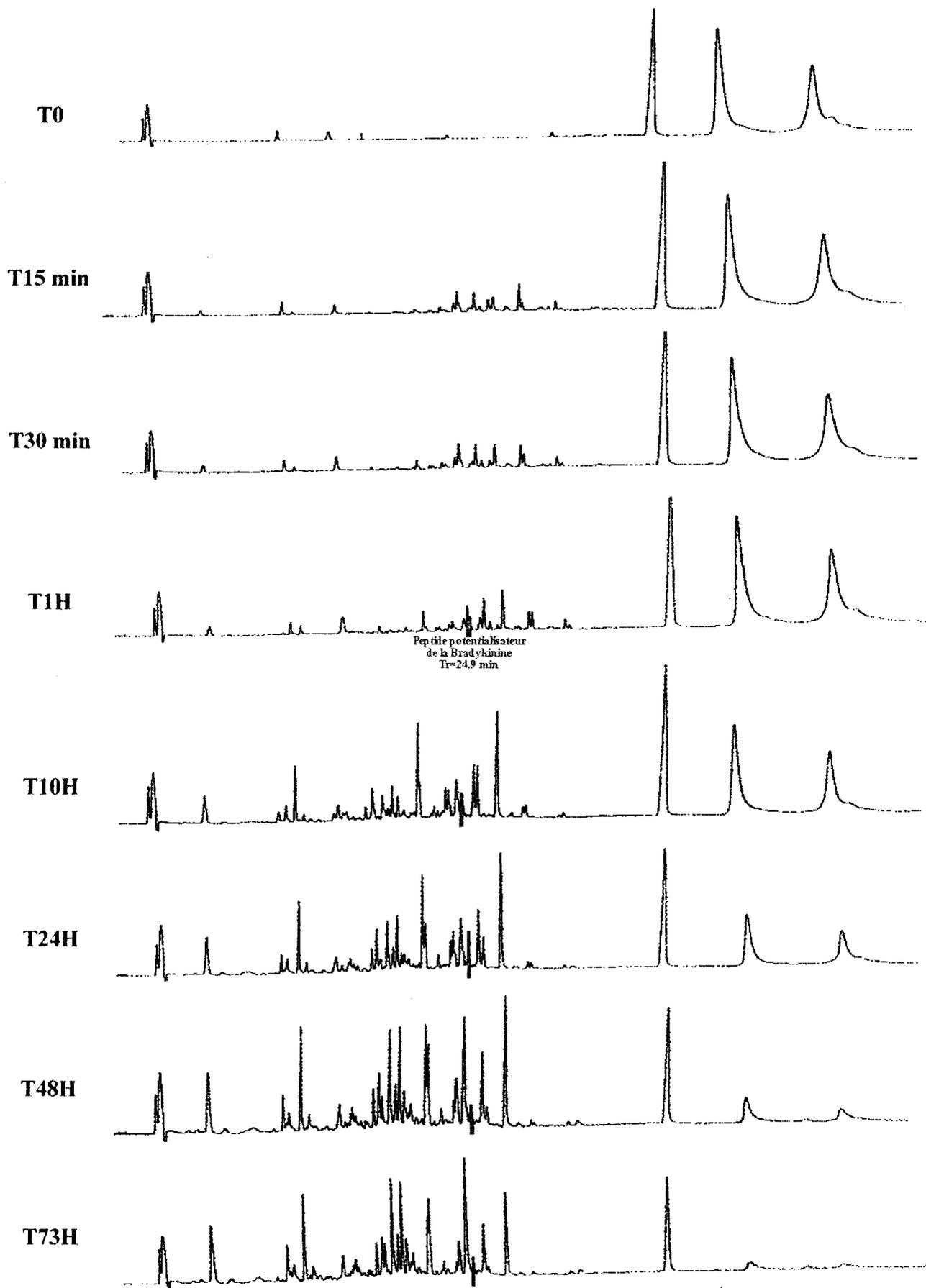
Figure 24. Comparaison des cinétiques d'apparition de la LVV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-7 dans le milieu tampon (a), dans le milieu éthanol (b) et dans le milieu urée (c).

## **I.2.2. Peptide potentialisateur de la Bradykinine.**

### *I.2.2.2. Cinétique d'apparition du peptide potentialisateur de la Bradykinine dans le tampon.*

La cinétique d'évolution du peptide potentialisateur de la Bradykinine au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine dans le tampon acétate 0,1 M pH 4,5 a été suivie pendant 73 heures. Les profils chromatographiques de la figure 25 caractérisent l'avancement de la réaction d'hydrolyse dans le tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5.

La concentration du peptide actif, dont le temps de rétention de 24,9 minutes est conservé tout au long de l'hydrolyse, augmente jusqu'à environ 24 heures de réaction protéolytique, puis elle diminue. Ce peptide correspond alors à un peptide intermédiaire pendant l'hydrolyse de l'hémoglobine dans le "milieu tampon" à pH 4,5 : après 24 heures d'hydrolyse, il devient à son tour substrat de la pepsine.



**Figure 25. Cinétique d'apparition du peptide potentielisateur de la Bradykinine au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine à pH 4,5 dans le tampon acétate de sodium 0,1 M (E/S=1/11, mol/mol).**

### I.2.2.2. Effet de solvants sur la cinétique d'apparition du peptide potentialisateur de la Bradykinine.

Nous avons comparé la cinétique d'évolution du peptide potentialisateur de la Bradykinine au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine pendant 73 heures à 23°C et à pH 4,5, dans trois solvants : le tampon acétate de sodium 0,1 M et le même tampon contenant soit 5,3 M d'urée, soit 20 % (v/v) d'éthanol. Ceci nous a permis de déterminer l'impact de ces trois milieux sur la cinétique d'apparition du peptide actif. La figure 26 suivante représente l'évolution de l'aire du peptide potentialisateur de la Bradykinine dans les trois solvants, en fonction du DHc.

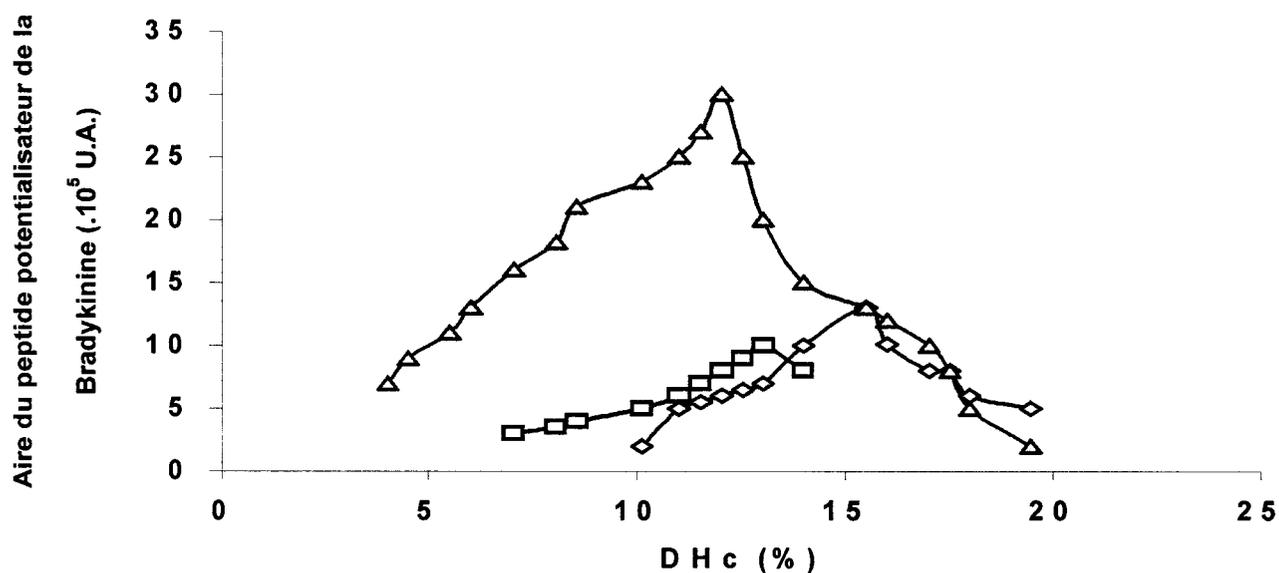


Figure 26. Evolution de l'aire du *peptide potentialisateur de la Bradykinine* en fonction du degré d'hydrolyse corrigé (DHc) de l'hémoglobine à 0,2 % (p/v), dans les milieux tampon (◇), éthanol (□) et urée (Δ), à 23°C et à pH 4,5.

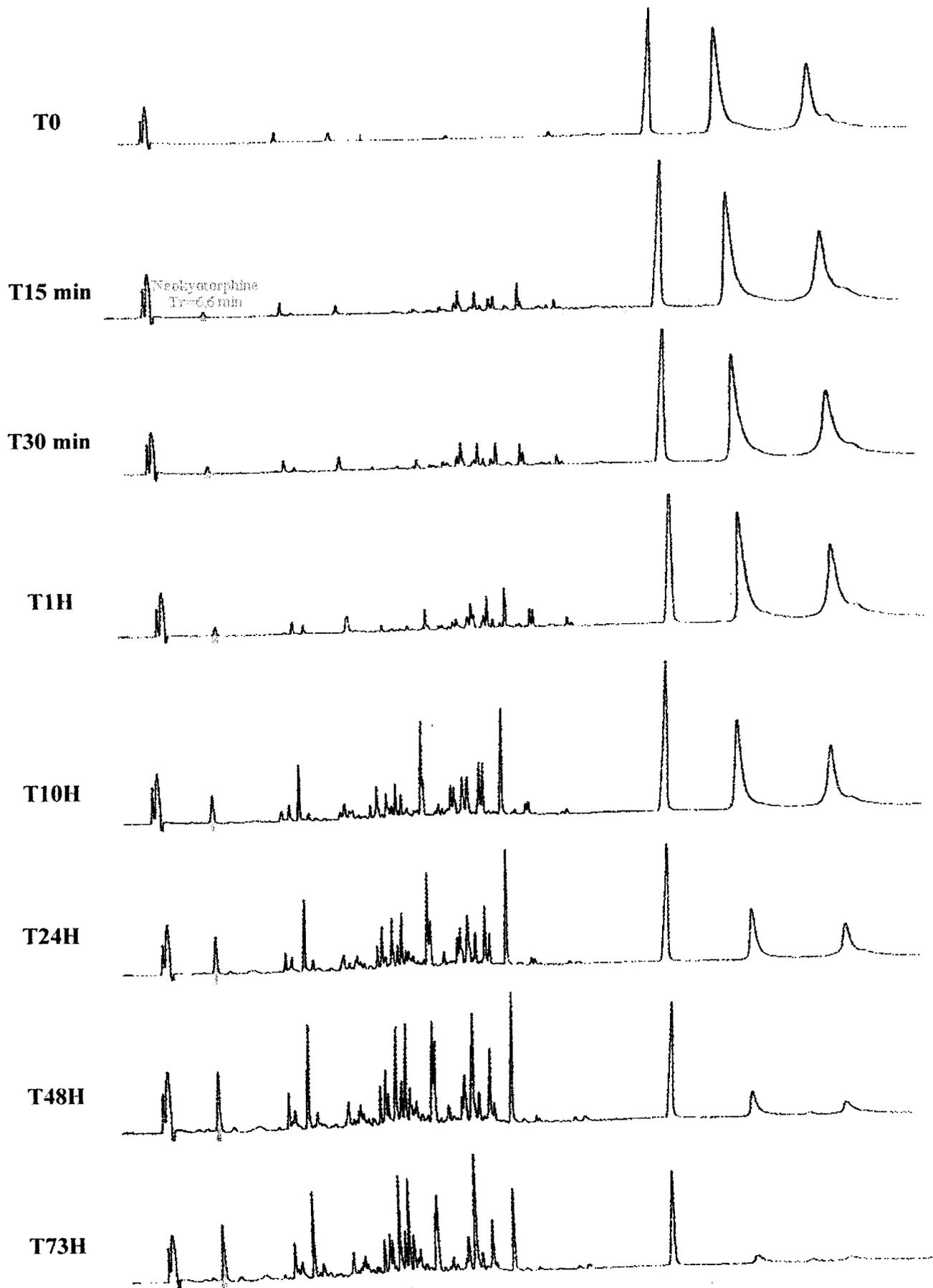
La quantité du peptide actif croît dans les trois milieux jusqu'à un DHc optimal de : environ 16 % dans le milieu tampon, 13 % dans le milieu éthanol et 12 % dans le milieu urée. Dans le milieu tampon, il n'est détecté qu'à partir de 10 % de DHc, tandis que les deux autres milieux (surtout urée) montrent une apparition du peptide actif plus précoce au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine à pH 4,5. Nous avons montré auparavant que l'urée augmente la production de la LVVh-7 et VVh-7, deux peptides actifs intermédiaires. De la

même manière, la conformation de l'hémoglobine, engendrée par la présence d'urée, favorise une production plus importante du peptide potentialisateur de la Bradykinine qui est également un peptide intermédiaire. Les conditions optimales de préparation du peptide potentialisateur de la Bradykinine sont l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine dans le tampon acétate pH 4,5 contenant de l'urée et à 10 % de DHc.

### **I.2.3. Peptide analgésique néokyotorphine.**

#### *I.2.3.1. Cinétique d'apparition de la néokyotorphine dans le tampon.*

La cinétique d'évolution de la néokyotorphine a été suivie au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine pendant 73 heures dans le tampon acétate 0,1 M à pH 4,5. Les profils chromatographiques de la figure 27 permettent d'observer cette évolution cinétique. La concentration de la néokyotorphine augmente au cours de l'hydrolyse, le peptide n'étant pas hydrolysé même après les 73 heures de réaction protéolytique. Le temps d'élution de 6,6 minutes est également conservé tout au long de l'hydrolyse pepsique. Zhao et Piot (1998a) ont montré que ce peptide n'était pas clivé lors de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la cathepsine D à pH 3, pendant toute la durée de leur hydrolyse (48 heures). Ils ont alors suggéré que l'hémoglobine pouvait être le précurseur direct de la néokyotorphine, par un clivage primaire de la protéine substrat par la cathepsine D. La néokyotorphine correspond donc à un peptide final, puisqu'elle s'accumule dans le milieu.



**Figure 27. Cinétique d'apparition de la néokytorphine au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine à pH 4,5 dans le tampon acétate de sodium 0,1 M (E/S=1/11 mol/mol).**

### I.2.3.2. Effet de solvant sur la cinétique d'apparition de la néokyotorphine.

L'évolution de la néokyotorphine a été mesurée pendant l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine à pH 4,5 dans les solvants tampon acétate 0,1 M, dans le tampon acétate contenant 20 % (v/v) d'éthanol et dans le même tampon contenant 5,3 M d'urée. Nous avons mesuré l'impact de ces trois milieux sur la cinétique d'apparition du peptide analgésique. La figure 28 représente l'évolution de l'aire de la néokyotorphine en fonction du DHc.

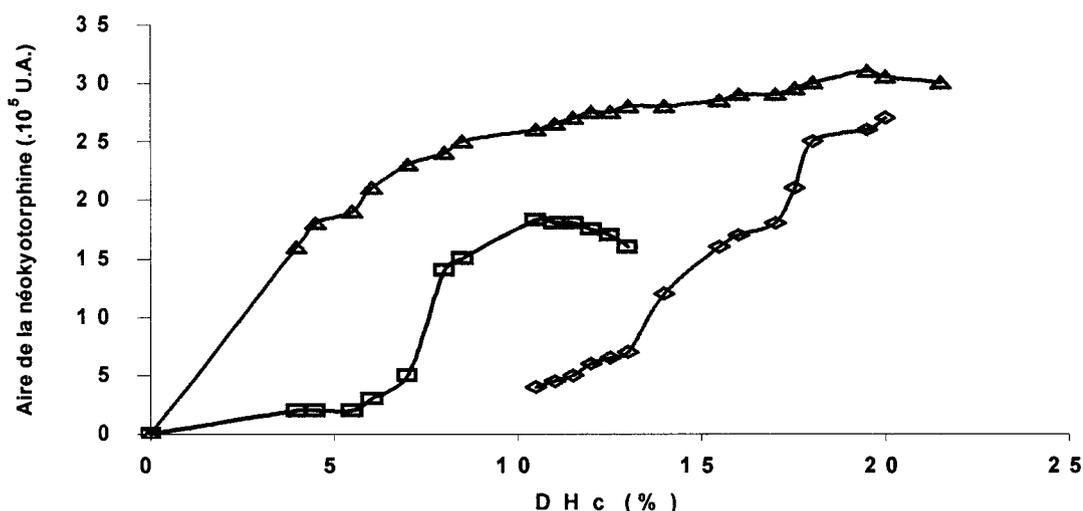


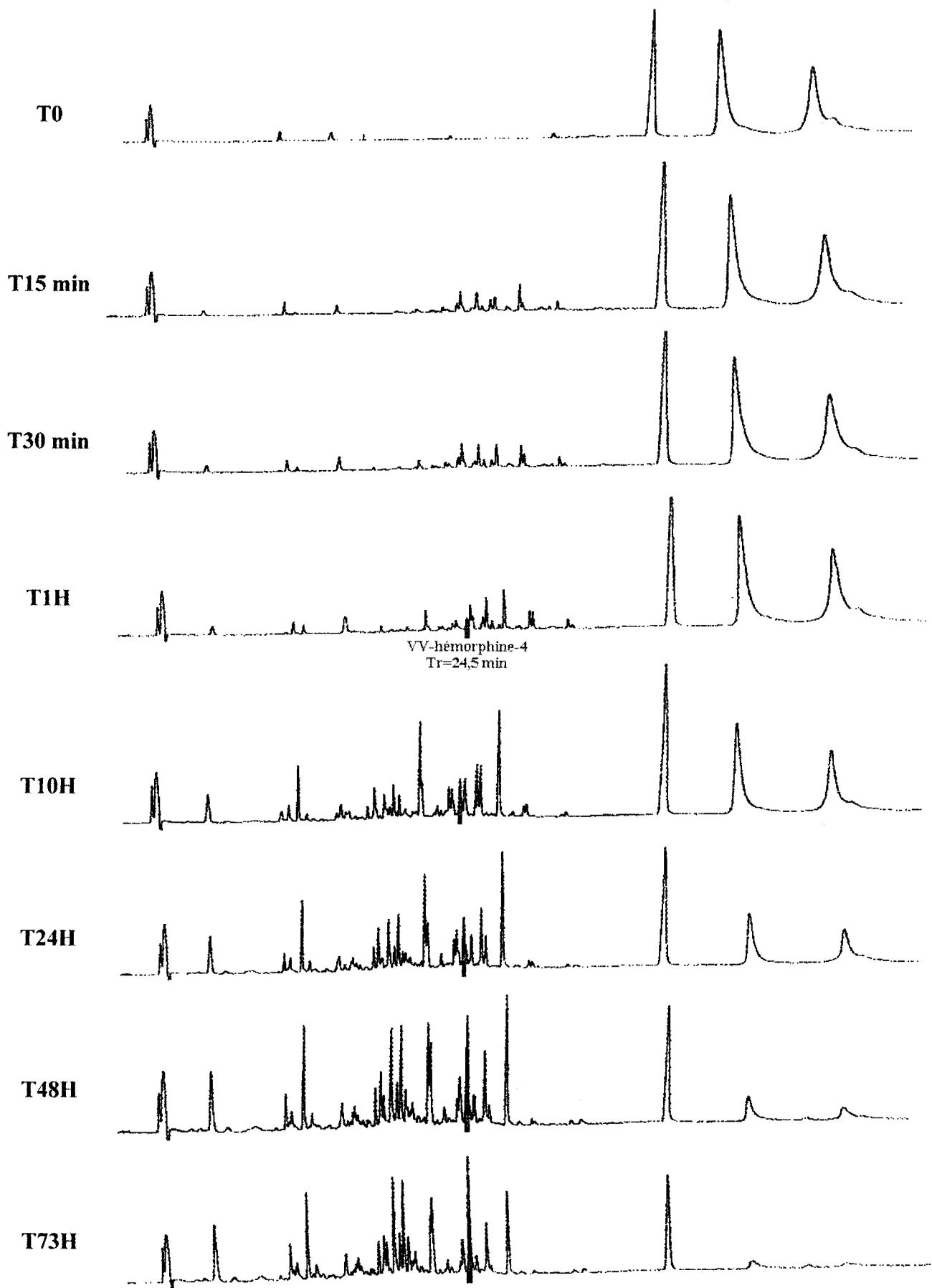
Figure 28. Evolution de l'aire de la *néokyotorphine* en fonction du degré d'hydrolyse corrigé (DHc) de l'hémoglobine à 0,2 % (p/v), dans les milieux tampon (◇), éthanol (□) et urée (Δ), à 23°C et à pH 4,5.

La quantité de néokyotorphine croît tout au long de l'hydrolyse dans les milieux tampon et urée. Ce résultat confirme que ce peptide est bien un peptide final, comme évoqué précédemment. L'apparition de la néokyotorphine n'est observée qu'à partir de 10 % de DHc dans le "milieu tampon", tandis qu'elle est détectée beaucoup plus tôt dans les tampon contenant de l'urée ou de l'éthanol, notamment lorsque l'hémoglobine est sous forme dénaturée. Ainsi, afin de préparer la néokyotorphine, les conditions optimales sont l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine à l'état dénaturé ou natif, à un DHc élevé.

## **I.2.4. Peptide opioïde VV-hémorphine-4.**

### *I.2.4.1. Cinétique d'apparition de la VV-hémorphine-4 dans le tampon.*

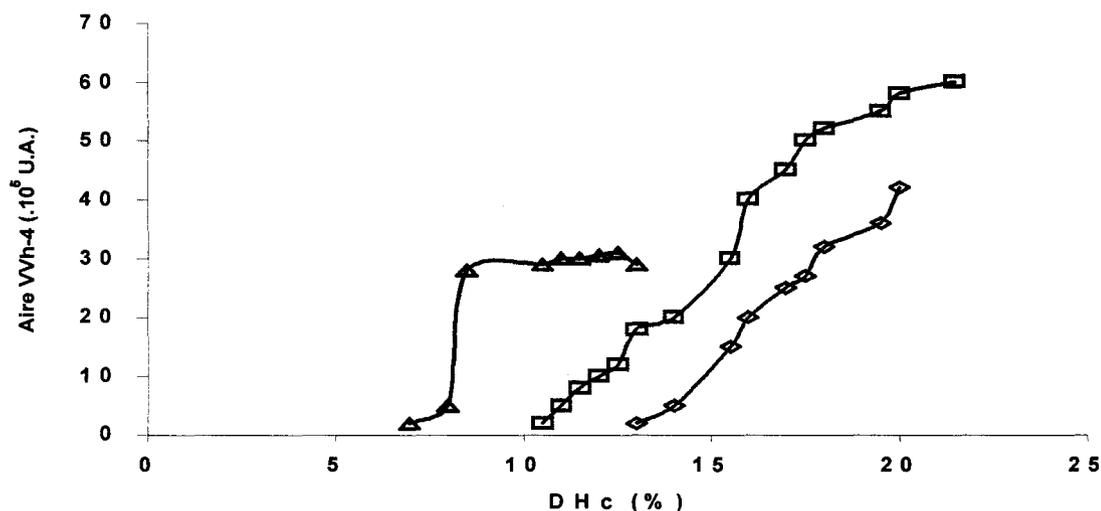
La cinétique d'apparition de la VVh-4 a été menée pendant l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine pendant 73 heures à 23°C dans le tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5. La figure 29 montre les profils chromatographiques résultant de cette hydrolyse en milieu tampon à pH 4,5. Le temps de rétention de la VVh-4 (24,5 minutes) reste inchangé pendant toute la durée de la réaction protéolytique. De plus, la concentration de ce peptide opioïde augmente continuellement : la VVh-4 n'est pas clivée par la pepsine même après 73 heures d'hydrolyse. La VVh-4 correspond donc à un peptide final, comme dans le cas de la néokyotorphine.



**Figure 29. Cinétique d'apparition de la VV-hémorphine-4 au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine à pH 4,5 dans le tampon acétate de sodium 0,1 M (E/S=1/11 mol/mol).**

#### I.2.4.2. Effet de solvant sur la cinétique d'apparition de la VV-hémorphine-4.

La cinétique d'apparition de la VVh-4 a été comparée dans les trois milieux : le tampon acétate de sodium pH 4,5, le milieu tampon acétate contenant 20 % (v/v) d'éthanol et le tampon acétate de sodium contenant 5,3 M d'urée. La figure 30 montre cette cinétique d'évolution par la mesure de l'aire de la VVh-4 en fonction du DHc.



**Figure 30.** Evolution de l'aire de la VV-hémorphine-4 en fonction du degré d'hydrolyse corrigé (DHc) de l'hémoglobine à 0,2 % (p/v), dans les milieux tampon (◇), éthanol (□) et urée (Δ), à 23°C et à pH 4,5.

Quelque soit le milieu, le taux de VVh-4 augmente au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine. Ce résultat confirme que la VVh-4 est un peptide final, comme discuté dans le paragraphe précédent. Dans le milieu tampon, la VVh-4 n'apparaît qu'à partir de 14 % de DHc, tandis que la présence d'éthanol ou d'urée cause une apparition plus précoce du peptide opioïde (DHc d'environ 10 % dans le milieu urée et environ 7 % dans le milieu éthanol). Pour préparer la VVh-4, les meilleures conditions sont donc l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine soit dans le tampon acétate seul, soit dans le même tampon mais contenant de l'urée, à un degré d'hydrolyse élevé.

La figure 31 montre une comparaison des cinétiques d'apparition de la LVVh-7, de la VVh-7 et de la VVh-4, au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine dans les trois milieux étudiés. Comme nous l'avons discuté auparavant pour la LVVh-7 et VVh-7, quelque soit le solvant, la LVVh-7 disparaît tandis que le taux de VVh-7 augmente. Le même

phénomène a d'ailleurs été observé par Zhao et coll. (1996b), lors de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine décolorée dans le tampon acétate d'ammonium à pH 2 : ils en ont déduit le rôle précurseur de la LVVh-7 pour générer la VVh-7.

D'après la figure 31, nous pouvons observer que, lorsque la concentration de la VVh-7 diminue, le taux de VVh-4 augmente, pour les trois milieux. Ce résultat suggère que les trois peptides opioïdes LVVh-7, VVh-7 et VVh-4 soient produits successivement au cours de l'hydrolyse de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine à pH 4,5. Dès lors, la LVVh-7 apparaît bien comme le précurseur de la VVh-7 qui elle-même est le précurseur de la VVh-4.

Zhao et coll. (1996b) ont montré que la LVVh-7 ( $\beta(31-40)$ ) et la VVh-7 ( $\beta(32-40)$ ) étaient précurseurs à pH 2, pH optimum de la pepsine, de la LVVh-5 ( $\beta(31-38)$ ) et de la VVh-5 ( $\beta(32-38)$ ). Cependant, ils n'ont pas détecté la formation de la VVh-4 ( $\beta(32-37)$ ). Dans nos conditions à pH 4,5, nous avons observé la génération de la VVh-4 mais pas la formation de la LVVh-5 ni de la VVh-5. Ces résultats montrent que la spécificité d'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine pourrait être différente à pH 2 et à pH 4,5.

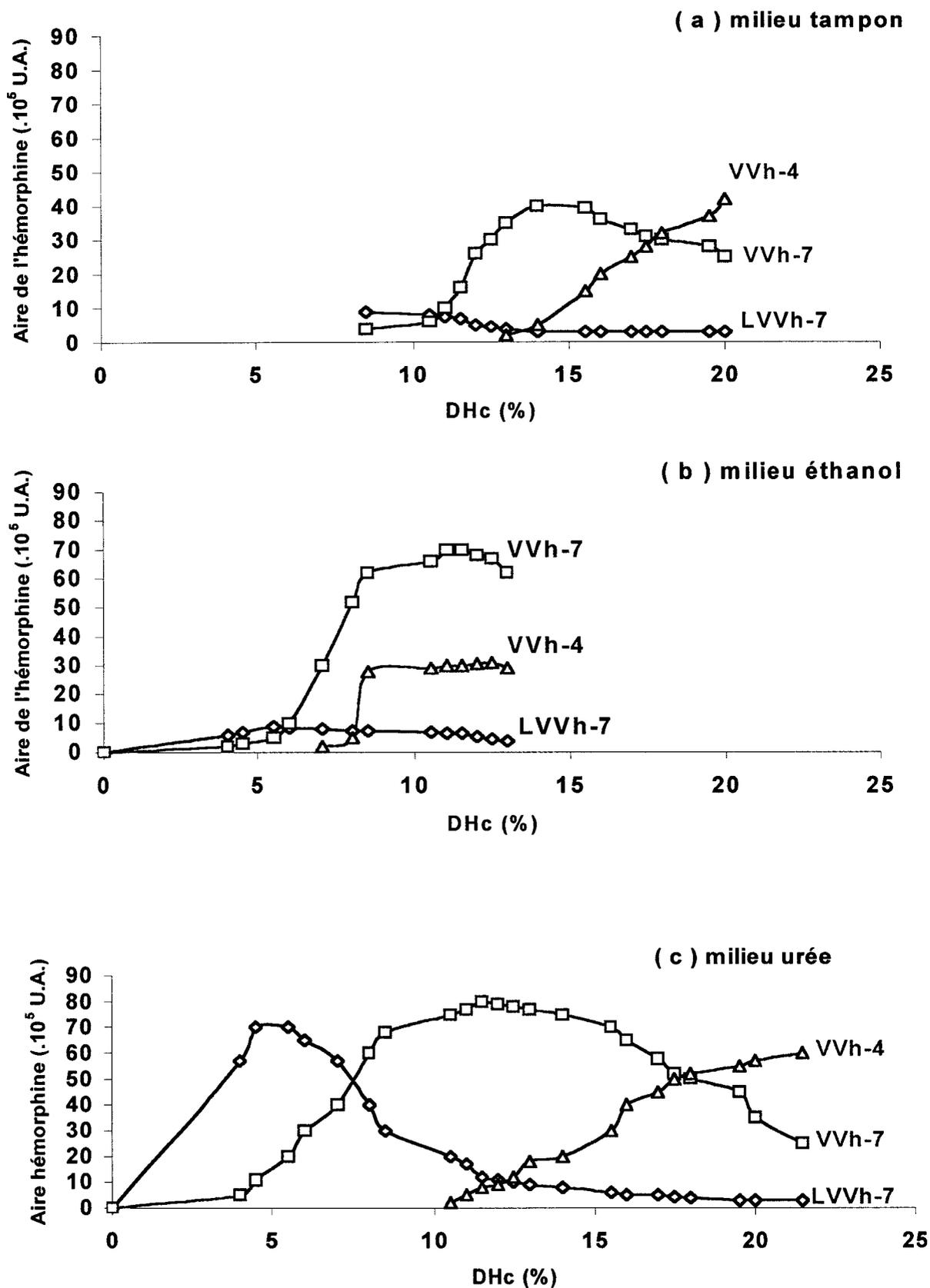


Figure 31. Comparaison des cinétiques d'apparition de la LVV-hémorphine-7, de la VV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-4 dans le milieu tampon (a), dans le milieu éthanol (b) et dans le milieu urée (c).

## Conclusion

Nous avons isolé en une seule étape par CLHP en phase inverse, cinq peptides à activités biologiques : un peptide potentialisateur de la Bradykinine ( $\alpha$ 110-125), un peptide analgésique, la néokytorphine ( $\alpha$ 137-141) et trois peptides opioïdes, la LVVh-7 ( $\beta$ 31-40), la VVh-7 ( $\beta$ 32-40) et la VVh-4 ( $\beta$ 32-37), à partir de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine à 0,2 % (p/v) et à pH 4,5. Parmi ces cinq peptides, la VVh-4 a été isolée pour la première fois à partir d'un hydrolysate d'hémoglobine bovine.

L'isolement de tels peptides en une seule étape chromatographique apporte un gain de temps considérable contrairement aux techniques combinées de la filtration sur gel et de la CLHP de phase inverse couramment utilisées pour isoler ces peptides actifs (Takagi et coll. 1982, Fonina et coll. 1991, Piot et coll. 1992a et 1992b).

Dans une seconde étape, la caractérisation de chaque peptide actif faisait appel à la spectrométrie de masse en mode MALDI.

L'étude cinétique d'apparition de chaque peptide actif, au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine à pH 4,5, a permis de montrer que la LVVh-7, la VVh-7 ainsi que le peptide potentialisateur de la Bradykinine sont des peptides intermédiaires. Cette étude a également montré que la néokytorphine et la VV-hémorphine sont des peptides finaux.

Quelque soient les conditions de la réaction protéolytique, le domaine d'existence de ces peptides actifs, en fonction du degré d'hydrolyse, est relativement large. L'urée, qui entraîne une dénaturation de l'hémoglobine, favorise l'apparition de tous les peptides actifs dans les meilleures proportions.

La conformation dénaturée de l'hémoglobine bovine permet de générer en grande quantité des peptides à activités biologiques, dont les peptides opioïdes VVh-4, VVh-7 et LVVh-7. Cet état déployé des chaînes peptidiques de la protéine, qui est alors hydrolysée selon un mécanisme "zipper", permet la production des peptides actifs intermédiaires tels que la LVVh-7 et le peptide potentialisateur de la Bradykinine.

## Article 1

**Titre:** *Effet de solvants sur les cinétiques d'apparition d'hémorphines au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine.*

**Résumé:** L'effet de la composition en solvants sur l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine a été étudié afin de préparer deux peptides opioïdes. L'hydrolyse pepsique a été menée pendant 24 h à 23 °C dans un tampon acétate de sodium 0,1 M à pH 4,5. Une méthode CLHP est décrite pour l'isolement de la LVV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-7 en une seule étape. Les cinétiques d'apparition des hémorphines ont été déterminées en présence de 20 % (v/v) d'éthanol, un solvant stabilisateur de l'hémoglobine, ou d'urée, un agent dénaturant. L'éthanol est favorable à la production de la VV-hémorphine-7, tandis que l'urée permet la meilleure production des deux hémorphines. L'état dénaturé de l'hémoglobine dans l'urée est donc plus favorable pour l'obtention de la LVV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-7 que dans l'éthanol. Le clivage des liaisons peptidiques, plus accessibles à la pepsine, serait plus efficace pour la production de ces hémorphines.

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

Brigitte Lignot, Renato Froidevaux, Naima Nedjar-Arroume<sup>1</sup> and Didier Guillochon

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

The effect of the composition of the solvent on the peptic hydrolysis of bovine haemoglobin was studied to improve the preparation of two opioid peptides. Peptic hydrolysis was performed for 24 h at 23 °C in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.5. A HPLC method was reported for isolating LVV-haemorphin-7 and VV-haemorphin-7 in one step. The kinetics of appearance of haemorphins was investigated in the presence of 20% (v/v) ethanol, a stabilizing solvent of haemoglobin or urea, a denaturant agent. Ethanol improved the yield of VV-haemorphin-7, whereas urea improved the yield of the two haemorphins. Because the amounts of haemorphins observed in urea were greater than in ethanol, the denatured state of haemoglobin is more favourable to obtaining LVV-haemorphin-7 and W-haemorphin-7. The peptide bonds that give rise to haemorphins would be more accessible to the pepsin.

### Introduction

The enzymic hydrolysis of proteins is widely used in food industries to improve the proteins' 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, for example, casein [4], soya proteins [5], gluten [6], tuna myoglobin [7], mitochondrial cytochrome *b* [8]. These peptides exhibit immunomodulating [9], opioid [10–12], antithrombotic [13] or antimicrobial activities [14].

Blood from slaughterhouses is an unconventional but attractive source of proteins. Haemoglobin represents up to approx. 90% of the total cell-fraction proteins and is often a waste product. Therefore investigations have been reported to transform this agricultural by-product by enzymic hydrolysis. In a previous paper [15] we reported the preparation at the pilot-plant scale of a decolorized peptic hydrolysate

from bovine haemoglobin that was used for clinical enteric nutrition [16] and in cell-culture media [17]. Preparation by ultrafiltration of haem iron-enriched haemoglobin hydrolysates for treatments of iron deficiency has also been described [18]. It has recently been shown that bovine haemoglobin contains fragments or gives, after hydrolysis by pepsin or trypsin, peptides presenting different activities in bradykinin potentiation or as an opioid, coronar-constrictory or analgesic [19].

We have previously reported the isolation of two opioid peptides from a peptic hydrolysate of bovine haemoglobin prepared at a pilot-plant scale in a ultrafiltration reactor at pH 2 [20]. These two opioid peptides, LVV-haemorphin-7 (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe) and VV-haemorphin-7 (Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe), correspond respectively to the sequences 31–40 and 32–40 of the  $\beta$  chain of bovine haemoglobin and are respectively identical with the sequences 32–41 and 33–41 of the  $\beta$  chain of human haemoglobin. However, these haemorphins are intermediate peptides and their concentrations in haemoglobin hydrolysates are often very low. Solvents have been used to improve the enzymic hydrolysis of proteins such as  $\beta$ -lactoglobulin [21], serum albumin [22], caseins [23] or gluten [24]. Several authors have observed a modification of the peptidic populations by alcohols such as ethanol and glycerol [21,24] and explained these changes in protease selectivity by a modification of the conformation of the native proteins and of the long intermediate peptides in relation with their hydrophobicities. In the present paper we report the appearance of two opioid peptides during the peptic hydrolysis of bovine haemoglobin at pH 4.5. These peptides had already been isolated from hydrolysates obtained at pH 2 for which the peptic activity is much higher than at pH 4.5. Therefore to improve the preparation of LVV-haemorphin-7 and VV-haemorphin-7 we have studied the kinetics of appearance of haemorphins during the peptic hydrolysis of bovine haemoglobin at pH 4.5 in the presence of 20% (v/v) ethanol, a stabilizing solvent of haemoglobin [25] or urea, a denaturing agent of proteins. We propose

Abbreviations used: DHC, corrected degree of hydrolysis; MALDI-MS, matrix-assisted laser desorption ionization MS.

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

experimental conditions to increase haemorphin quantities in bovine haemoglobin peptic hydrolysates and to prepare these opioid peptides in one step by HPLC.

## Materials and methods

### Materials

All common chemicals and solvents were of analytical grade from commercial sources. Bovine haemoglobin and pig pepsin were purchased from Sigma Chemicals. Acetonitrile was of HPLC grade. Water was obtained from a Culligan system; the resistance was approx. 18 M $\Omega$ . All aqueous HPLC eluents were bubbled with helium.

### Hydrolysate preparation

Native haemoglobin solution (100 ml) at 0.2% (w/v) was digested at 23 °C in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.5, in the absence or the presence of 20% (v/v) ethanol, by pig pepsin (EC 3.4.23.1) (40 000 Anson units; Sigma Chemicals). Denatured haemoglobin was digested by pepsin under similar conditions but in the presence of urea (5.3 M). The enzymic hydrolyses were stopped by the addition of disodium tetraborate (0.32 M, pH 12.7) to yield a final pH of 10. The enzymic hydrolyses of haemoglobin were performed to different degrees of hydrolysis.

### Determination of the degree of hydrolysis of haemoglobin

Degree of hydrolysis is defined as the ratio of the number of peptide bonds cleaved to the total number of peptide bonds in haemoglobin. The cleavage of peptide bonds during hydrolysis was quantified by the trinitrobenzene sulphonate method [26]. The corrected degree of hydrolysis (DHc) is defined as the ratio of the number of cleaved peptide bonds (determined by the trinitrobenzene sulphonate method) to the total number of peptide bonds of haemoglobin effectively hydrolysed. The proportion of non-hydrolysed haemoglobin was deduced from the determination of its peak area under HPLC.

### Amino acid analysis

Amino acids were analysed with a Waters Picotag Workstation. Peptide hydrolysis was achieved with constant-boiling (6 M) HCl containing 1% (w/v) phenol, for 24 h at 110 °C. The precolumn derivatization of amino acids with phenyl isothiocyanate and the HPLC separation of derivatized amino acids on a Waters reverse-phase Picotag column (150 mm  $\times$  3.9 mm internal diam.) were performed by the method of Bidlingmeyer et al. [27]. The detection wavelength was 254 nm and the flow rate was 1 ml/min.

### HPLC system

The liquid chromatographic system consisted of a Waters 600E automated gradient controller pump module, a Waters Wisp 717 automatic sampling device and a Waters 996 photodiode array detector. Spectral and chromatographic data were stored on a NEC image 466 computer. Millennium software was used to plot, acquire and analyse chromatographic data. All the chromatographic processes were performed with a Vydac C<sub>4</sub> column (250 mm  $\times$  4.6 mm internal diam.). The mobile phase was water/trifluoroacetic acid (1000:1, v/v) as eluent A and acetonitrile/water/trifluoroacetic acid (600:400:1, by vol.) as eluent B. The flow rate was 1 ml/min. Samples were filtered through 0.22  $\mu$ m filters and then injected. The gradient applied was 0–67% (v/v) B over 30 min then 67–87% (v/v) B over 35 min. On-line instantaneous UV absorbance scans were performed between 200 and 300 nm at a rate of one spectrum every 1 s. The resolution was 1.2 nm. Chromatographic analyses were completed with Millennium software.

### Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)-MS

Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)-MS was performed on a Finnigan Mat Vision 2000 time-of-flight mass spectrometer equipped with a viewing unit. All data were acquired at 500 MHz sampling frequency in reflector mode with external and/or internal calibration and also in linear mode. The nitrogen laser spot size was 70  $\mu$ m and the laser energy was adjusted close to threshold. The following matrix was used: a mixture of 2,5-dihydroxybenzoic acid (12 g/l) and 2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid (12 g/l) (9:1, v/v) was prepared with acetonitrile/water (1:2, v/v) as solvent. A 1  $\mu$ l portion of the matrix solution was mixed with 0.5  $\mu$ l of sample solution on a stainless steel target, dried in a gentle stream of air and loaded into the mass spectrometer. Mass spectra were obtained preferably from the crystalline rim of the dried sample. Usually, 15–30 spectra were averaged in linear mode and 20–40 in reflectron mode. Linear configuration was used applying 30 keV ion energy for reflectron time-of-flight analyser 5 keV ion energy and 20 keV post-acceleration to a discrete dynode secondary electron multiplier in positive-ion mode.

## Results and discussion

### Isolation of haemorphins from a haemoglobin peptic hydrolysate obtained at pH 4.5

The peptic hydrolysis of native bovine haemoglobin was performed for 24 h at 23 °C in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.5. The resulting hydrolysate was analysed in one step by reverse-phase HPLC on a C<sub>4</sub> column as described in the

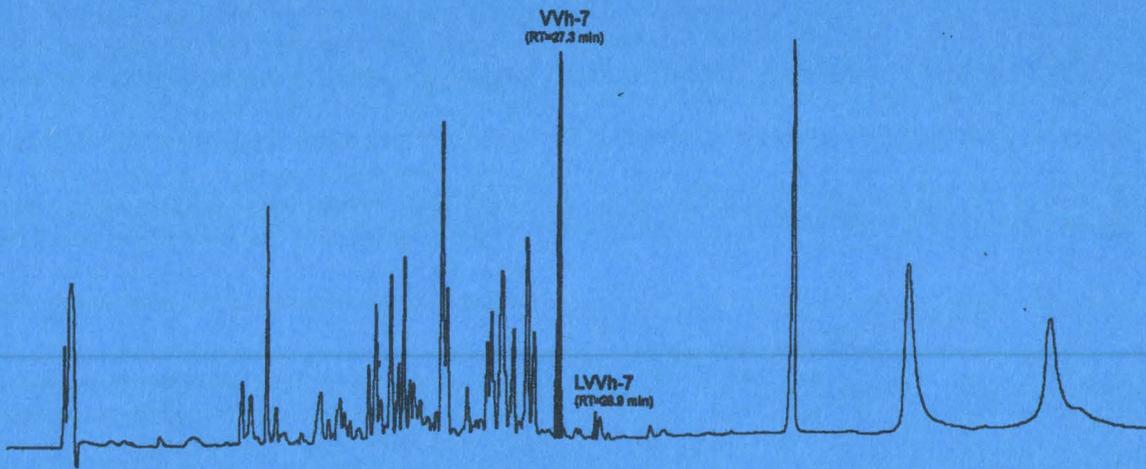


Figure 1 HPLC chromatogram of the haemoglobin peptic hydrolysate

The peptic hydrolysis was performed for 24 h at 23 °C in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.5. The hydrolysate was analysed by reverse-phase HPLC on a  $C_4$  column with the conditions described in the Materials and methods section.

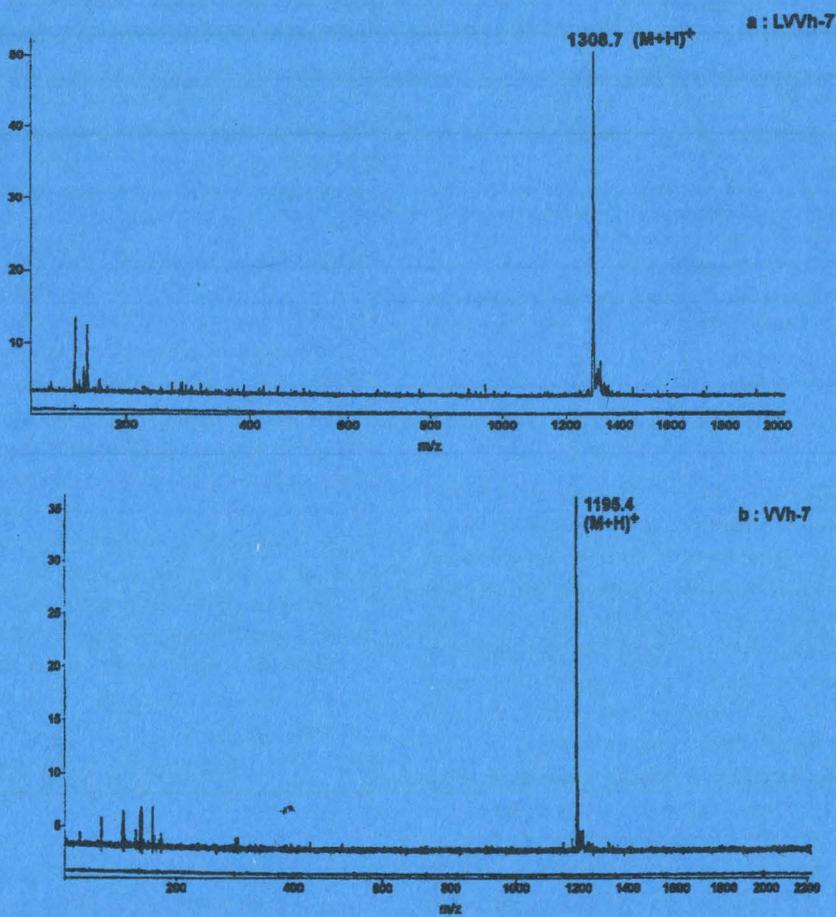


Figure 2 MALDI-MS of haemorphins isolated by HPLC

(a) LVV-haemorphin-7 (residues 31–40 of the  $\beta$  chain of haemoglobin); (b) VV-haemorphin-7 (residues 32–40 of the  $\beta$  chain of haemoglobin).

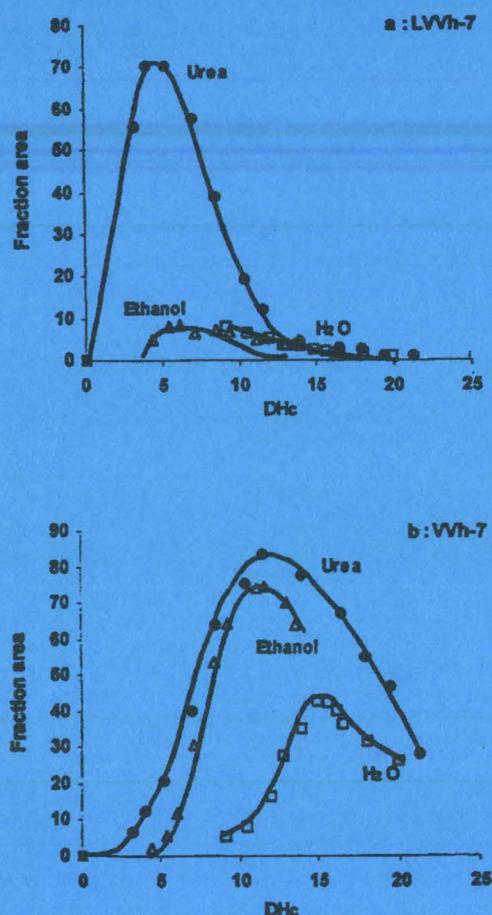


Figure 3 Kinetics of appearance of LVV-haemorphin-7 (a) and VV-haemorphin-7 (b) during haemoglobin hydrolysis in the presence of ethanol or urea

Peak areas corresponding to haemorphins were determined by reverse-phase HPLC coupled with detection with a photodiode array.

Materials and methods section; the chromatogram is shown in Figure 1. Peptides corresponding to each fraction were identified by amino acid analysis and MALDI-MS (results not shown). Two important fractions corresponding to pure peptides with retention times of 28.93 min (fraction 1) and 27.18 min (fraction 2) were recognized as haemorphins, which had already been isolated by successive size-exclusion chromatography and  $C_{18}$  reverse-phase HPLC from a haemoglobin peptic hydrolysate prepared at pH 2.

Figure 2 shows the positive MALDI spectra of these two peptides. The accurate relative molecular mass of the first peptide, deduced from the  $m/z$  value of  $(M+H)^+$  by subtraction of one mass unit for the attached proton, is 1307 Da (fraction 1). On the basis of these results and taking into account the known amino acid sequence of  $\alpha$  and  $\beta$  bovine haemoglobin chains, this peptide corresponds to the residues 31–40 of the  $\beta$  chain: Leu<sup>31</sup>-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe<sup>40</sup>, i.e. LVV-haemorphin-7 [20]. The peptide

of the second fraction (27.18 min) presented a unit-mass resolution of 1194 Da, corresponding to the peptide originating at Val<sup>32</sup> and extending to Phe<sup>40</sup> in the  $\beta$  chain: Val<sup>32</sup>-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe<sup>40</sup>, i.e. VV-haemorphin-7 [20]. These results show that the hydrolysis of bovine haemoglobin by pepsin at pH 4.5 also produces haemorphins. Moreover they can be isolated in one step by  $C_4$  reverse-phase HPLC and the efficiency of the separation allows their easy on-line detection by using the UV-spectra comparison method published by other authors [28].

#### Effect of solvent on the yield of haemorphins

Two media were selected for studying the appearance of LVV-haemorphin-7 and VV-haemorphin-7: for peptic hydrolysis the solvent systems used were (1) a water/ethanol solvent containing 20% (v/v) ethanol, for which we had previously demonstrated a stabilizing effect on haemoglobin conformation [25], and (2) an aqueous solvent containing urea, which caused the denaturation of haemoglobin. The peptidic hydrolysates obtained in these solvents were compared with that obtained in the aqueous buffer alone at different degrees of hydrolysis of haemoglobin. DHc is more representative of the state of hydrolysis of haemoglobin than the simple degree of hydrolysis because it is independent of the mechanism of the hydrolysis, which is 'one by one' for native haemoglobin and 'zipper' for denatured haemoglobin. Figure 3 shows the appearance of each haemorphin in the water/ethanol solvent, in the presence of urea and in buffer alone as a function of DHc. Ethanol shifts the optimum concentration of haemorphins towards slight degrees of hydrolysis and increases the amount of VV-haemorphin-7. Ethanol has a small effect on the accumulation of LVV-haemorphin-7 which is observed in the form of traces as in the buffer alone. In contrast with the water/ethanol solvent, the denaturation of haemoglobin by urea markedly increases the amount of both LVV-haemorphin-7 and VV-haemorphin-7. As with ethanol, the optimum concentration was with urea observed at a lower DHc than in the buffer alone. The LVV-haemorphin-7 peak area was 7-fold that in the buffer alone, and the VV-haemorphin-7 peak area was 2.5-fold that in the buffer. Therefore urea-containing buffer is the best solvent for the preparation of haemorphins, probably because the peptidic bonds (Leu<sup>30</sup>-Leu<sup>31</sup>, Phe<sup>40</sup>-Phe<sup>41</sup> and Leu<sup>31</sup>-Val<sup>32</sup>) that give rise to the haemorphins are open to peptic digestion in denatured haemoglobin.

#### Solvent effect on the kinetics of appearance of LVV-haemorphin-7 and VV-haemorphin-7

We compared the kinetics of the appearance of haemorphins during the hydrolysis of bovine haemoglobin, as measured by DHc, in the water/ethanol solvent, in urea-containing buffer and in buffer alone. Their respective peak areas as a function

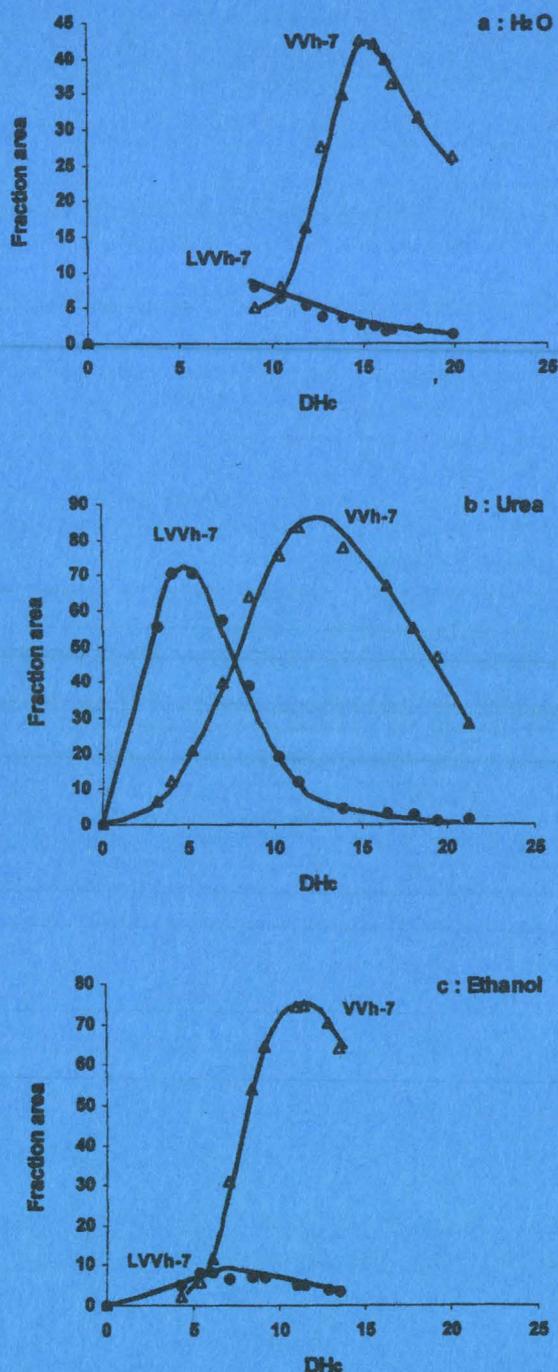


Figure 4 Comparison of kinetics of appearance of LVV-haemorphin-7 and VV-haemorphin-7 in buffer alone (a), in the presence of urea (b) or in the presence of ethanol (c)

Peak areas were determined as described in the legend to Figure 3.

of DHc of haemoglobin are shown in Figure 4. Ethanol or urea denaturation did not change the order of appearance of haemorphins, but in urea-containing buffer and water/

ethanol solvent haemorphins reached a higher concentration. In the urea-containing buffer, the only solvent allowing the observation of the two haemorphins in large proportions (Figure 4b), the concentration of LVV-haemorphin-7 was optimal at a DHc of 5%, whereas VV-haemorphin-7 attained its maximum concentration at a DHc of 12%. Therefore VV-haemorphin-7 was obtained only after the total disappearance of LVV-haemorphin-7. These results suggest that the two haemorphins were produced successively during the hydrolysis of the  $\beta$  chain of haemoglobin. Other authors [24,29] have also observed that, during the peptic hydrolysis of globin at pH 2, LVV-haemorphin-7 disappeared while the level of VV-haemorphin-7 increased, and they assumed that LVV-haemorphin-7 is a precursor of VV-haemorphin-7.

### Conclusion

Our results show that LVV-haemorphin-7 and VV-haemorphin-7 are produced not only at pH 2, as reported by several authors during the peptic hydrolysis of bovine haemoglobin, but also at pH 4.5, at which pepsin is far less active. The peptic hydrolysis of bovine haemoglobin in the denatured state (in urea-containing buffer) or in the native state in the presence of 20% (v/v) ethanol permits a significant increase the production of these haemorphins. Therefore to prepare haemorphins we propose the hydrolysis of bovine haemoglobin at pH 4.5 in 5.3 M urea-containing acetate buffer up to DHc values of 5% and 11% respectively for the isolation of LVV-haemorphin-7 and VV-haemorphin-7. The isolation of haemorphins can be performed in one step by reverse-phase HPLC. This method of preparation of haemorphin at pH 4.5 in the presence of urea or ethanol could be interesting because, in contrast with pH 2, at which haem and haemoglobin partly precipitate, peptic hydrolysis is performed in homogeneous solutions.

### References

- 1 Jost, R., Monti, J.-C. and Pahud, J. J. (1987) *Food Technol.* **41**, 118-121
- 2 Silk, D. B. A., Grimble, G. H. and Rees, R. G. (1985) *Proc. Nutr. Soc.* **44**, 63-72
- 3 Marschall, W. E. (1994) in *Functional Foods. Designer Foods, Pharma Foods Nutraceuticals* (Golberg, I., ed.), pp. 242-260, Chapman and Hall, New York
- 4 Schlimme, E. and Meisel, H. (1995) *Nahrung* **39F**, 1-20
- 5 Gunther, R. C. (1979) *J. Am. Oil Chemists Soc.* **56**, 345-349
- 6 Zioudrou, C., Streaty, R. A. and Klee, W. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 2446-2449
- 7 Lecoeur, C., Zhao, Q. Y., Garreau, I., Sannier, F., Maurice, M.,

- Durand, P. and Piot, J. M. (1995) *J. Liquid Chromatogr.* **18**, 2353–2371
- 8 Brantl, V., Gramsch, C., Lottspeich, F., Henschel, A., Jaeger, K. H. and Herz, A. (1985) *Eur. J. Pharmacol.* **111**, 293–294
- 9 Werner, G. H., Floc'h, F., Migliore-Samour, D. and Jolles, P. (1986) *Experientia* **42**, 521–531
- 10 Brantl, V., Teschemacher, H., Henschel, A. and Lottspeich, F. (1979) *Hoppe Seyler's Physiol. Chem.* **360**, 1211–1216
- 11 Loukas, S., Varoucha, D., Zioudrou, C. and Klee, W. (1983) *Biochemistry* **22**, 4567–4573
- 12 Fiat, A. M. and Jolles, P. (1989) *Mol. Cell. Biochem.* **87**, 5–30
- 13 Bouhallab, S. and Touzé, C. (1995) *Lait* **75**, 251–258
- 14 Bellamy, W., Wakabayashi, H., Takase, M., Kawase, K., Shimamura, S. and Tomita, M. (1993) *Med. Microbiol. Immunol.* **182**, 97–105
- 15 Piot, J. M., Guillochon, D., Lecomte, D. and Thomas, D. (1988) *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **42**, 147–156
- 16 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
- 17 Dive, D., Piot, J. M., Sannier, F., Guillochon, D., Chavet, P. and Lustrat, S. (1989) *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 165–169
- 18 Erickson, C. (1981) European Patent No. 0061556
- 19 Ivanov, V. T., Karelin, A. A., Philippova, M. M., Nazimov, I. V. and Pletnev, V. Z. (1997) *Biopolymers* **43**, 171–188
- 20 Piot, J. M., Zhao, Q. Y., Guillochon, D. and Thomas, D. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 101–110
- 21 Dalgamondo, M., Dufour, E., Chobert, J. M., Bertrand-Harb, C. and Haertlé, T. (1995) *Dairy J.* **5**, 1–14
- 22 Houen, G. and Sando, T. (1991) *Anal. Biochem.* **193**, 186–190
- 23 Tchobanov, B. and Iliev, I. (1993) *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 974–978
- 24 Hertmanni, P., Picque, E., Thomas, D. and Larreta-Garde, V. (1991) *FEBS Lett.* **279**, 123–131
- 25 Nedjar-Arroume, N., Guillochon, D., Piot, J. M. and Thomas, D. (1991) *Biotechnol. Appl. Biochem.* **13**, 303–314
- 26 Alder-Nissen, J. (1979) *J. Agric. Food Chem.* **27**, 1256–1262
- 27 Bidlingmeyer, B. A., Cohen, S. A., Tarvin, T. L., Napier, J. R. and Hancock, W. S. (1984) *J. Chromatogr.* **336**, 93–104
- 28 Zhao, Q. Y., Sannier, F., Ricart, G. and Piot, J. M. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1295**, 73–80
- 29 Zhao, Q. Y., Sannier, F., Garreau, I., Lecoœur, C. and Piot, J. M. (1998) *J. Chromatogr.* **A723**, 35–41

---

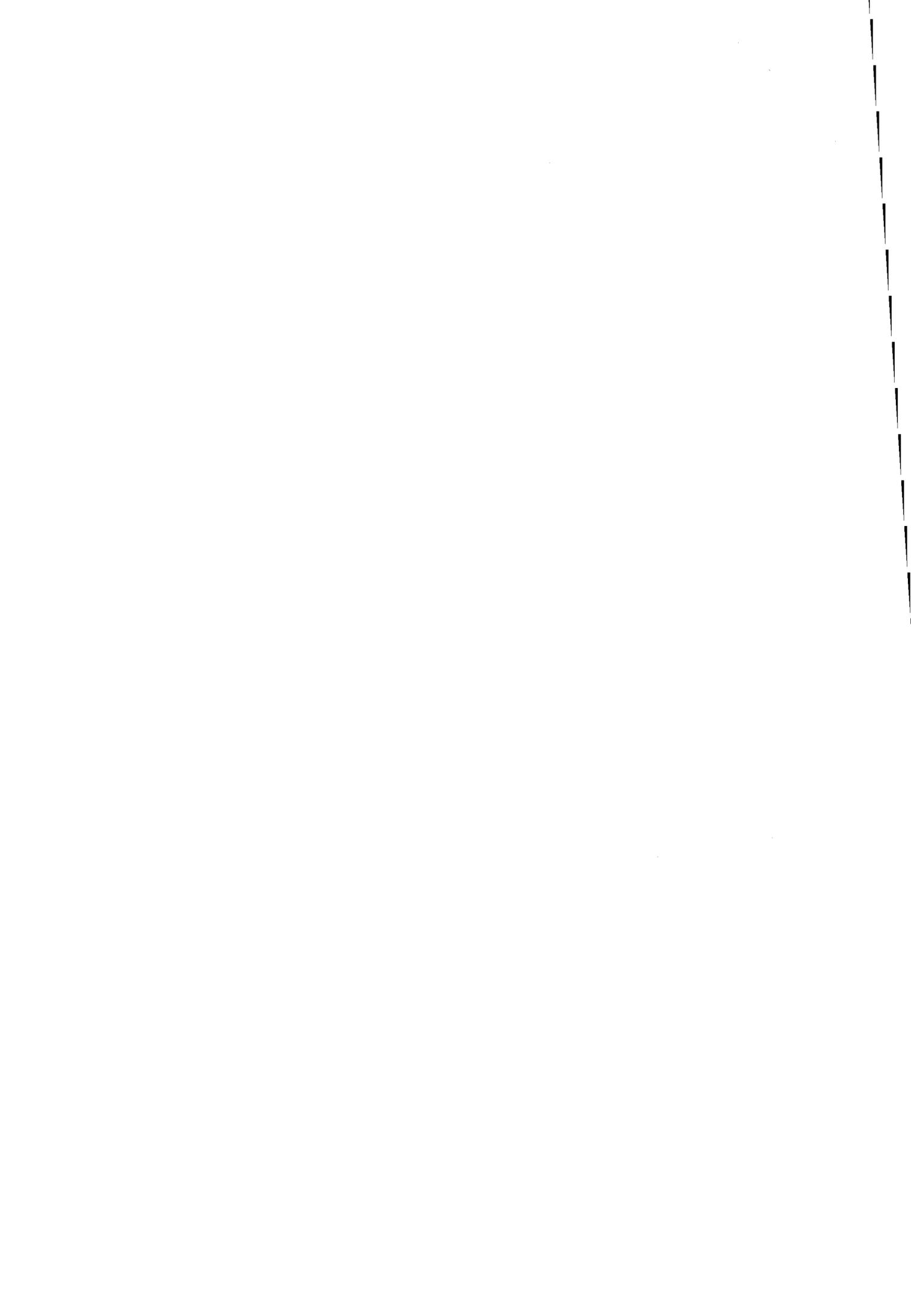
Received 27 July 1998; accepted 11 September 1998

---

## Article 2

**Titre:** *Effet de solvants sur les cinétiques d'apparition de la néokyotorphine, de la VV-hémorphine-4 et d'un peptide potentialisateur de la Bradykinine au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine.*

**Résumé:** Les cinétiques d'apparition de peptides actifs (la néokyotorphine, la VV-hémorphine-4 et un peptide potentialisateur de la Bradykinine) ont été étudiées au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine à 23°C dans un tampon acétate de sodium 0,1 M à pH 4,5. L'isolement de ces peptides a été réalisé en une seule étape chromatographique sur une colonne de CLHP de phase inverse de type C4. Nous avons montré que la néokyotorphine et la VV-hémorphine-4 étaient des peptides finaux, et que le peptide potentialisateur de la Bradykinine était un peptide intermédiaire. A pH 4,5, la LVV-hémorphine-7, la VV-hémorphin-7 et la VV-hémorphine-4 apparaissent successivement au cours de l'hydrolyse pepsique. A pH 2, pH optimum de l'hydrolyse pepsique, la VV-hémorphine-4 n'était pas détectée. L'effet de la composition du solvant sur l'hydrolyse pepsique a été étudié pour optimiser la préparation de ces peptides actifs. Les cinétiques d'apparition de ces peptides en présence de 20 % (v/v) d'éthanol, un solvant stabilisateur de l'hémoglobine et en présence d'urée, un agent dénaturant, ont été comparées. Les meilleures conditions pour la préparation de la néokyotorphine et de la VV-hémorphine-4 est de mener l'hydrpmyse pepsique dans le tampon ou en présence d'urée à un degré d'hydrolyse élevé. Pour la préparation du peptide potentialisateur de la Bradykinine, l'hydrolyse de l'hémoglobine dans le tampon en présence d'urée, à un degré d'hydrolyse de 10 %, est préférable.



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

Brigitte Lignot, Renato Froidevaux, Naïma Nedjar-Arroume<sup>1</sup> and Didier Guillochon

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

The kinetics of appearance of bioactive peptides (neokyotorphin, VV-haemorphin-4 and a bradykinin-potentiating peptide) were investigated in the course of the hydrolysis of haemoglobin by pepsin at 23 °C in 0.1 M sodium acetate buffer at pH 4.5. Isolation of these peptides was performed in one step by C<sub>4</sub> reversed-phase HPLC. We have shown that neokyotorphin, and VV-haemorphin-4 are two final peptides and that the bradykinin-potentiating peptide is an intermediate peptide. At pH 4.5, LVV-haemorphin-7, VV-haemorphin-7 and VV-haemorphin-4 appeared successively in the course of the peptic hydrolysis. At pH 2, the optimum pH of the pepsin hydrolysis, VV-haemorphin-4 was not detected. The effect of the composition of the solvent on the peptic hydrolysis was studied to improve the preparation of these active peptides. The kinetics of appearance of these peptides were compared in the presence of 20% (v/v) ethanol, a stabilizing solvent of haemoglobin and in the presence of urea, a denaturant agent. The best conditions for preparing neokyotorphin and VV-haemorphin-4 were to achieve the peptic reaction in the buffer alone or in the presence of urea at a high degree of hydrolysis. For the preparation of the bradykinin-potentiating peptide, the hydrolysis of haemoglobin in the urea-containing buffer at a moderate degree of hydrolysis of 10% was suitable.

### Introduction

For many years, protein hydrolysates derived from various sources (soya, milk, wheat and fish) [1] have been used as food ingredients for human as well as animal nutrition [2]. Numerous biologically active peptides have already been identified in such hydrolysates [3]. Investigations of their potential applications are undertaken in many areas, such as nutritional therapy [4,5], and in the medical field on account of their immunomodulating properties [6], and their opioid [7], antithrombotic [8] or antimicrobial activities [9].

Blood from slaughterhouses is an unconventional but attractive source of proteins. Haemoglobin represents up to about 90% of total-cell-fraction proteins and is often a waste

product. Therefore investigations have been made into transforming this agricultural by-product by enzymic hydrolysis. A pilot-plant scale ultrafiltration process to prepare at pH 2 a peptic hydrolysate of bovine blood haemoglobin was described previously [10]. This hydrolysate contained more than 100 different peptides. We have isolated and characterized three active peptides from this hydrolysate [11,12]: two opioid peptides, LVV-haemorphin-7 (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe) and VV-haemorphin-7 (Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe), which correspond to the sequences of amino acids 31–40 and 32–40, respectively, of the  $\beta$  chain, and a bradykinin-potentiating peptide (Ala-Ser-His-Leu-Pro-Ser-Asp-Phe-Thr-Pro-Ala-Val-His-Ala-Ser-Leu), which corresponds to the sequence of amino acids 110–125 of the  $\alpha$  chain. Other active peptides have already been isolated by different workers from peptic hydrolysates of bovine haemoglobin prepared at pH 2 [13]: neokyotorphin as an analgaesic, antihibernatic or Ca<sup>2+</sup>/K<sup>+</sup>-current regulator, (Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg), which corresponds to residues 137–141 of the  $\alpha$  chain; and haemorphin-5 (Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln) and haemorphin-4 (Tyr-Pro-Trp-Thr) as opioid peptides, which correspond respectively to residues 34–38 and 34–37 of the  $\beta$  chain. Recently, two other opioid peptides were isolated from a peptic hydrolysate of bovine haemoglobin prepared at pH 2 [14]: LVV-haemorphin-5 (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln) and VV-haemorphin-5 (Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln), which correspond respectively to residues 31–38 and 32–38 of the  $\beta$  chain. More recently, we have isolated an opioid peptide (B. Lignot, R. Froidevaux, N. Nedjar-Arroume and D. Guillochon, unpublished work): VV-haemorphin-4 (Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr), which corresponds to residues 32–37 of the  $\beta$  chain. This peptide was only obtained by peptic hydrolysis of bovine haemoglobin at pH 4.5 and was not found at pH 2. Most of these active peptides are intermediate peptides and their concentrations in haemoglobin hydrolysates are often very low.

Solvents have been used to improve the enzymic

Abbreviations used: MALDI-MS, matrix-assisted laser desorption ionization MS; DH<sub>c</sub>, corrected degree of hydrolysis.

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

hydrolysis of proteins such as  $\beta$ -lactoglobulin [15], serum albumin [16], caseins [17] or gluten [18]. Several authors have observed a modification of the peptidic populations by alcohols such as ethanol and glycerol [16,19] and explained these changes in protease selectivity by a modification of the conformation of the native proteins and of the long intermediate peptide in relation to their hydrophobicity. Recently [19], we reported on the effect of the composition of the solvent on the formation of two opioid peptides (LVV-haemorphin-7 and VV-haemorphin-7) in the course of the peptic hydrolysis of haemoglobin at pH 4.5. The aim of this paper was to study these solvent effects on the kinetics of appearance of three other active peptides: neokytorphin, VV-haemorphin-4 and the bradykinin-potentiating peptide in the course of peptic hydrolysis of haemoglobin at pH 4.5. As before, the effects of ethanol, for which a stabilizing effect on haemoglobin conformation was demonstrated [20], and urea, which causes the denaturation of haemoglobin, were studied.

## Materials and methods

### Materials

All common chemicals and solvents were of analytical grade from commercial sources. Bovine haemoglobin and pig pepsin were purchased from Sigma. Acetonitrile was of HPLC grade. Water was obtained from a Culligan system; the resistance was about 18 M $\Omega$ . All aqueous HPLC eluents were bubbled with helium.

### Hydrolysate preparation

Native haemoglobin solution (100 ml) at 0.2% (w/v) was digested by pig pepsin (EC 3.4.23.1; 40000 Anson units; Sigma) at 23 °C in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.5, in the absence or presence of 20% (v/v) ethanol. Denatured haemoglobin was digested by pepsin under similar conditions but in the presence of urea (5.3 M). The enzymic hydrolyses were stopped by the addition of disodium tetraborate (0.32 M, pH 12.7) to yield a final pH of 10. The enzymic hydrolyses of haemoglobin were performed at different degrees of hydrolysis.

### Determination of the degree of hydrolysis of haemoglobin

The degree of hydrolysis was defined as the ratio of the number of peptide bonds cleaved to the total number of peptide bonds in haemoglobin. The cleavage of peptide bonds during hydrolysis was quantified by the trinitro-

benzene sulphonate method [21]. The corrected degree of hydrolysis (DH<sub>c</sub>) was defined as the ratio of the number of cleaved peptide bonds (determined by the trinitrobenzene sulphonate method) to the total number of haemoglobin peptide bonds effectively hydrolysed. The proportion of non-hydrolysed haemoglobin was deduced from its peak area by HPLC.

### HPLC analyses

The liquid chromatographic system consisted of a Waters 600E automated gradient controller pump module, a Waters Wisp 717 automatic sampling device and a Waters 996 photodiode array detector. Spectral and chromatographic data were stored on an NEC image 466 computer. Millennium software was used to plot, acquire and analyse chromatographic data. All the chromatographic processes were performed with a Vydac C<sub>4</sub> column (250 × 4.6 mm internal diameter). The mobile phase was water/trifluoroacetic acid (1000:1, v/v) as eluent A and acetonitrile/water/trifluoroacetic acid (600:400:1, by vol.) as eluent B. The flow rate was 1 ml/min. Samples were filtered through 0.22- $\mu$ m filters and then injected. The gradient applied was 0–67% (v/v) eluant B over 30 min followed by 67–87% (v/v) eluant B over 35 min. Online UV absorbance scans were performed between 200 and 300 nm at a rate of one spectrum/s with a resolution of 1.2 nm. Chromatographic analyses were completed with Millennium software.

### Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)-MS

MALDI-MS was performed on a Finnigan Mat Vision 2000 time-of-flight mass spectrometer equipped with a viewing unit. All data were acquired at 500 MHz sampling frequency in reflector mode with external and/or internal calibration and also in linear mode. The nitrogen-laser spot size was 70  $\mu$ m and the laser energy was adjusted close to threshold. The following matrix was used: a mixture of 2,5-dihydroxybenzoic acid (12 g/l) and 2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid (12 g/l; 9:1, v/v) was prepared with acetonitrile/water (1:2, v/v) as solvent. A 1- $\mu$ l portion of the matrix solution was mixed with 0.5  $\mu$ l of sample solution on a stainless-steel target, dried in a gentle stream of air and loaded into the mass spectrometer. Mass spectra were obtained preferably from the crystalline rim of the dried sample. Usually, 15–30 spectra were averaged in linear mode and 20–40 in reflectron mode. Linear configuration was used applying 30 kEv ion energy to the reflectron time-of-flight analyser and 5 kEv ion energy and 20 kEv post-acceleration to a discrete dynode secondary electron multiplier in positive-ion mode.

## Results and discussion

### Isolation of active peptides from a haemoglobin peptic hydrolysate prepared at pH 4.5

The peptic hydrolysis of native bovine haemoglobin was performed for 10 h at 23 °C in 0.1 M sodium acetate buffer at pH 4.5. The resulting hydrolysate was analysed in one step by reversed-phase HPLC on a  $C_4$  column according to a method described previously [19]. Figure 1 shows the chromatogram obtained under these conditions. Peptides corresponding to each fraction were identified by amino acid analysis and MALDI-MS (results not shown). Recently, we identified two haemorphins, LVV-haemorphin-7 and VV-haemorphin-7, in this complex hydrolysate. Three other active peptides were also identified: a peptide that we have isolated recently from a bovine haemoglobin peptic hydrolysate obtained at pH 4.5 and two peptides isolated by successive size-exclusion chromatography and  $C_{18}$  reversed-phase HPLC from a haemoglobin peptic hydrolysate prepared at pH 2. Their retention times were 6.6 (peptide 1), 24.5 (peptide 2) and 24.9 min (peptide 3). Figure 2 shows the positive MALDI spectra of these peptides. For peptide 1 the accurate relative molecular mass, deduced from the  $m/z$  value of  $(M+H)^+$  by subtraction of one mass-unit for the attached proton, was 654.5 Da. According to these results and taking into account the amino acid sequence of the  $\alpha$  and  $\beta$  chains of bovine haemoglobin, this peptide corresponds to residues 137–141 of the  $\alpha$  chain: Thr<sup>137</sup>-Ser-Lys-Tyr-Arg<sup>141</sup>,

i.e. neokyotorphin [13]. It was already identified from a peptic hydrolysis of bovine haemoglobin prepared at pH 2. The second peptide (24.5 min) presented a unit-mass resolution of 764.8 Da, corresponding to the peptide originating at Val<sup>32</sup> and extending to Thr<sup>37</sup> in the  $\beta$  chain: Val<sup>32</sup>-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr<sup>37</sup>, i.e. VV-haemorphin-4, which we have recently isolated from a peptic hydrolysate of bovine haemoglobin prepared at pH 4.5. The third peptide (24.9 min) presents a unit-mass resolution of 604 Da, corresponding to residues 110–125 of the  $\alpha$  chain: Ala<sup>110</sup>-Ser-His-Leu-Pro-Ser-Asp-Phe-Thr-Pro-Ala-Val-His-Ala-Ser-Leu<sup>121</sup>, i.e. the bradykinin-potentiating peptide [12]. This peptide was isolated from bovine haemoglobin treated with pepsin at pH 2. All these results show that bovine haemoglobin gives three bioactive peptides after hydrolysis by pepsin at pH 4.5; two of them were already observed in the course of haemoglobin peptic hydrolysis at pH 2 and one, VV-haemorphin-4, was only observed at pH 4.5. Moreover, these peptides can be isolated in one step by  $C_4$  reversed-phase HPLC.

### Kinetics of appearance of the active peptides

The kinetics of appearance of neokyotorphin, VV-haemorphin-4 and of the bradykinin-potentiating peptide were investigated at 23 °C in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.5, during the hydrolysis of bovine haemoglobin by pepsin. The chromatographic profiles are displayed in Figure 3. The concentration of neokyotorphin (6.6 min retention time)

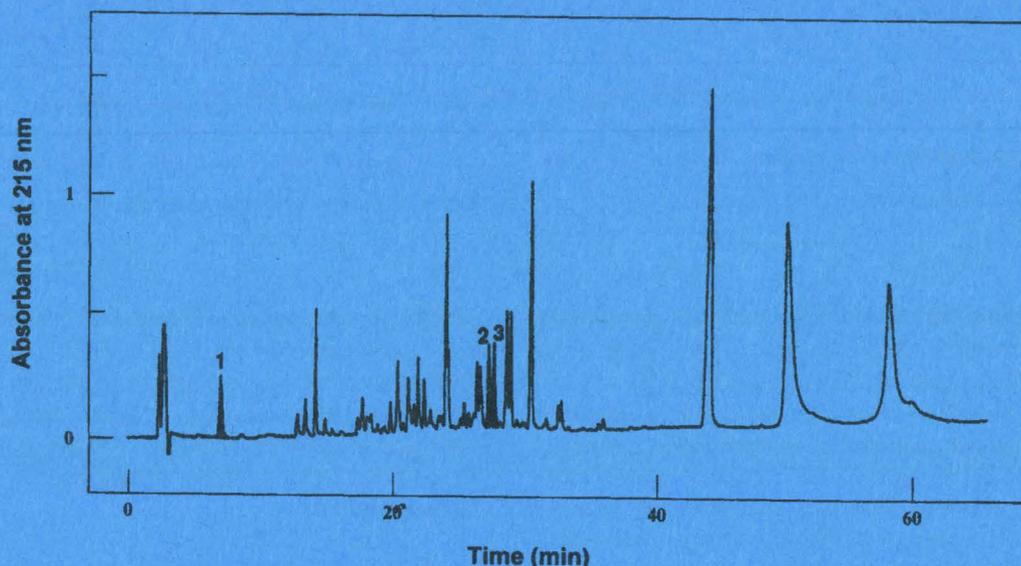


Figure 1 HPLC chromatogram of the haemoglobin hydrolysate

Peptic hydrolysis was performed for 10 h at 23 °C in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.5. The hydrolysate was analysed by reversed-phase HPLC on a  $C_4$  column under the conditions described in the Materials and methods section. Peaks 1, 2 and 3 were identified as neokyotorphin, VV-haemorphin-4 and the bradykinin-potentiating peptide, respectively.

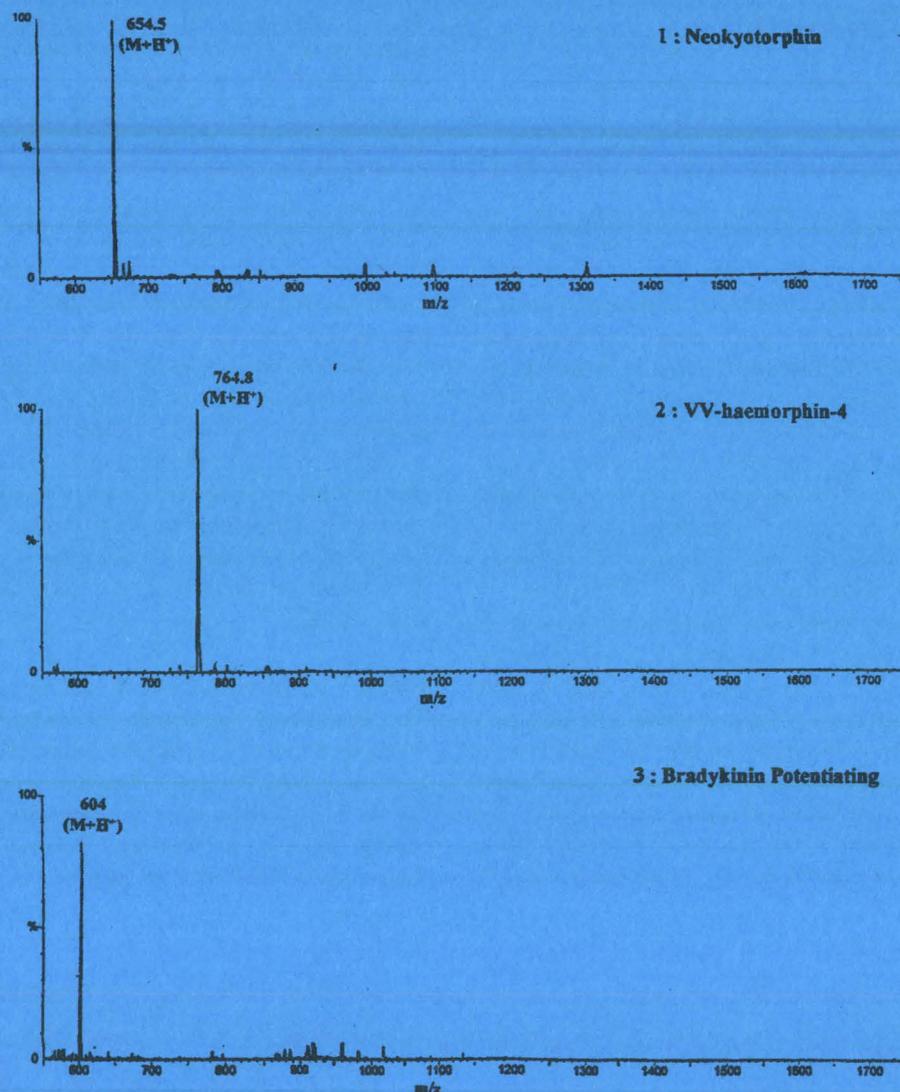


Figure 2 MALDI-MS of active peptides isolated by HPLC

(1) Neokyotorphin (residues 137–141 of the haemoglobin  $\alpha$  chain). (2) VV-Haemorphin-4 (residues of 32–37 of the haemoglobin  $\beta$  chain). (3) The bradykinin-potentiating peptide (residues 110–125 of the haemoglobin  $\alpha$  chain).

increased during the course of the hydrolysis and was not hydrolysed after 73 h. Zhao and Piot [22] also showed that this peptide was not cleaved by cathepsin D at pH 3 during up to 48 h of hydrolysis and suggested that haemoglobin could be the direct precursor of neokyotorphin. Moreover, the evolution of this peptide as a function of time indicated that this peptide was very easy to obtain and probably corresponds to a primary enzymatic cleavage of the  $\alpha$  chain by cathepsin D. We have also observed this phenomenon in the case of VV-haemorphin-4 (24.5 min retention time). The concentration of this peptide also increased during the hydrolysis and was not cleaved by pepsin during 73 h of hydrolysis. This peptide probably corresponds to a final

peptide, as in the case of neokyotorphin. On the other hand, the concentration of the bradykinin-potentiating peptide (24.9 min retention time) increased in the hydrolysate up to about 30 h before decreasing. These results show that neokyotorphin and VV-haemorphin-4 are two final peptides, whereas the bradykinin-potentiating peptide is an intermediate peptide.

#### Solvent effect on the kinetics of appearance of the active peptides

The kinetics of appearance of neokyotorphin, VV-haemorphin-4 and the bradykinin-potentiating peptide were com-

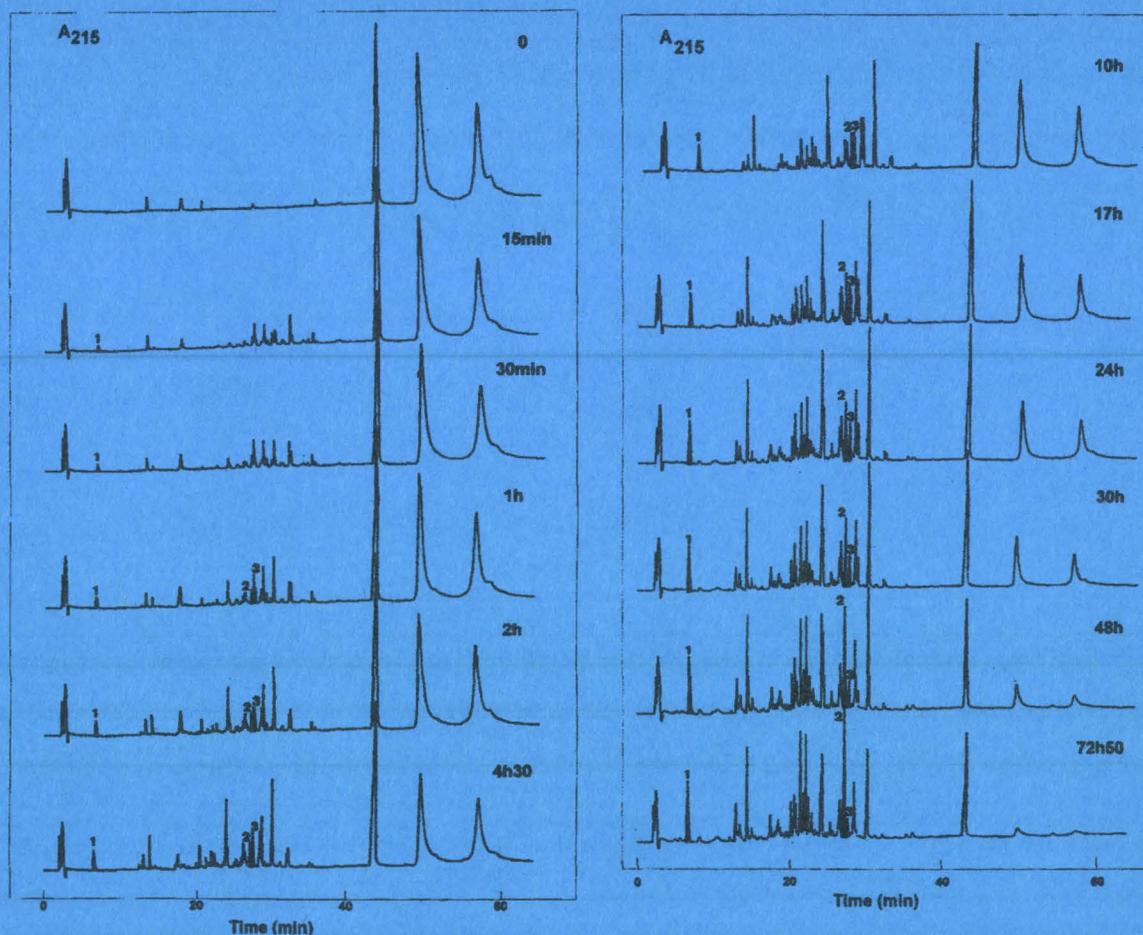


Figure 3 Chromatographic profiles of haemoglobin hydrolysate obtained at different times (0–72 h 50 min) by reversed-phase HPLC coupled with a photodiode array

Peaks 1, 2 and 3 were identified as neokyotorphin, VV-haemorphin-4 and the bradykinin-potentiating peptide, respectively.

pared as a function of  $DH_C$  of haemoglobin in the presence of 20% (v/v) ethanol, urea and in the buffer alone (Figure 4). Whatever the solvent, the amount of neokyotorphin and VV-haemorphin-4 increased throughout the hydrolysis, whereas the bradykinin-potentiating peptide exhibited an accumulation to an optimum  $DH_C$  before its concentration decreased. These results confirm that neokyotorphin and VV-haemorphin-4 are final peptides whereas the bradykinin-potentiating peptide is an intermediate peptide. In the buffer, the appearances of neokyotorphin and of the bradykinin-potentiating peptide were only observed from a  $DH_C$  of 10%, whereas VV-haemorphin-4 appeared from a  $DH_C$  of 14%. The presence of urea or ethanol caused an earlier appearance of the peptides; this phenomenon was particularly evident in the case of urea. However, VV-haemorphin-4 was only perceptible for a  $DH_C$  higher than 10%. So, when preparing neokyotorphin and VV-haemorphin-4, the best conditions are the utilization of the buffer alone or

the urea-containing buffer at a high  $DH_C$ . However, in the presence of urea the kinetics of the reaction are faster than in the buffer alone. On the other hand, in order to prepare the bradykinin-potentiating peptide it is suitable to hydrolyse haemoglobin in the presence of urea at a  $DH_C$  of 10%. Under these conditions the peptide amount produced was three times higher than in the buffer at the optimum  $DH_C$ .

Recently, we have shown that ethanol and urea also increase the accumulation of the intermediate peptides LVV-haemorphin-7 and VV-haemorphin-7 [19]. In the same way, the appearance of the bradykinin-potentiating peptide, which is an intermediate peptide, is favoured in the presence of urea. On the other hand, the solvent effect on the accumulation of final peptides such as neokyotorphin and VV-haemorphin-4 is less important. Figure 5 allows the comparison of the kinetics of appearance of VV-haemorphin-4, LVV-haemorphin-7 and VV-haemorphin-7 during the hydrolysis of bovine haemoglobin by pepsin in the buffer

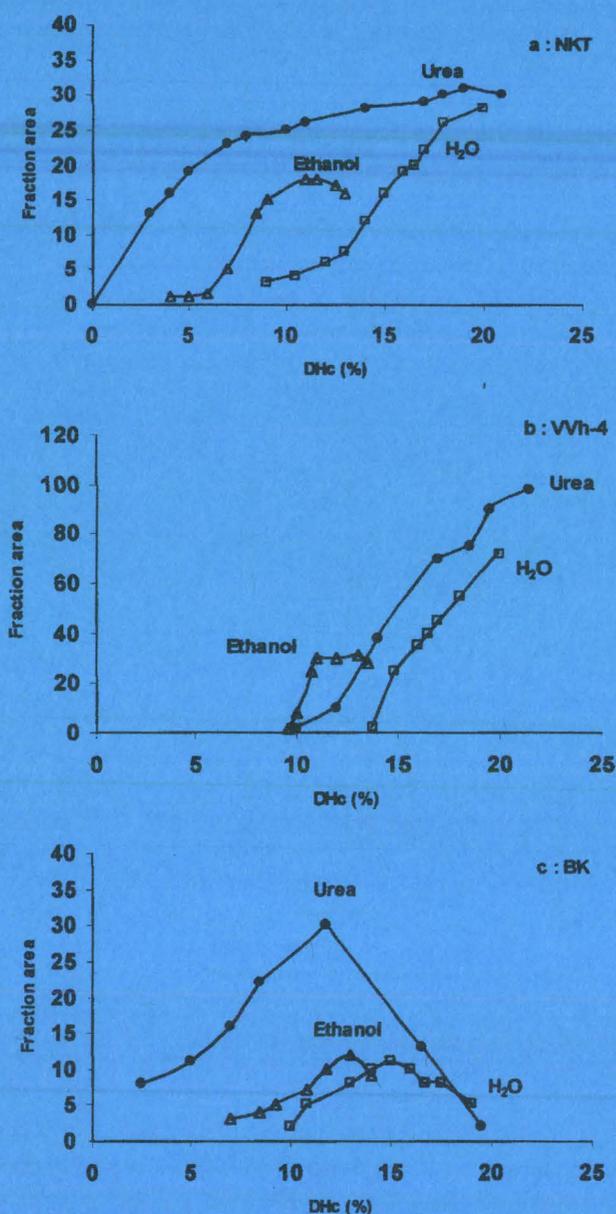


Figure 4 Kinetics of appearance of neokyotorphin (a, NKT), VV-haemorphin-4 (b, VVh-4) and the bradykinin-potentiating peptide (c, BK) during haemoglobin hydrolysis in the buffer alone, or in the presence of ethanol or urea

Peak areas corresponding to active peptides were determined by reversed-phase HPLC coupled with a photodiode array.

alone at pH 4.5, and in the presence of ethanol or urea. As discussed previously, whatever the solvent, LVV-haemorphin-7 disappears whereas the level of VV-haemorphin-7 increases. Other authors [15,23] have also reported the same phenomenon at pH 2 and assumed that LVV-haemorphin-7 is a precursor of VV-haemorphin-7. Moreover, Figure 5 shows that VV-haemorphin-7 disappears while the

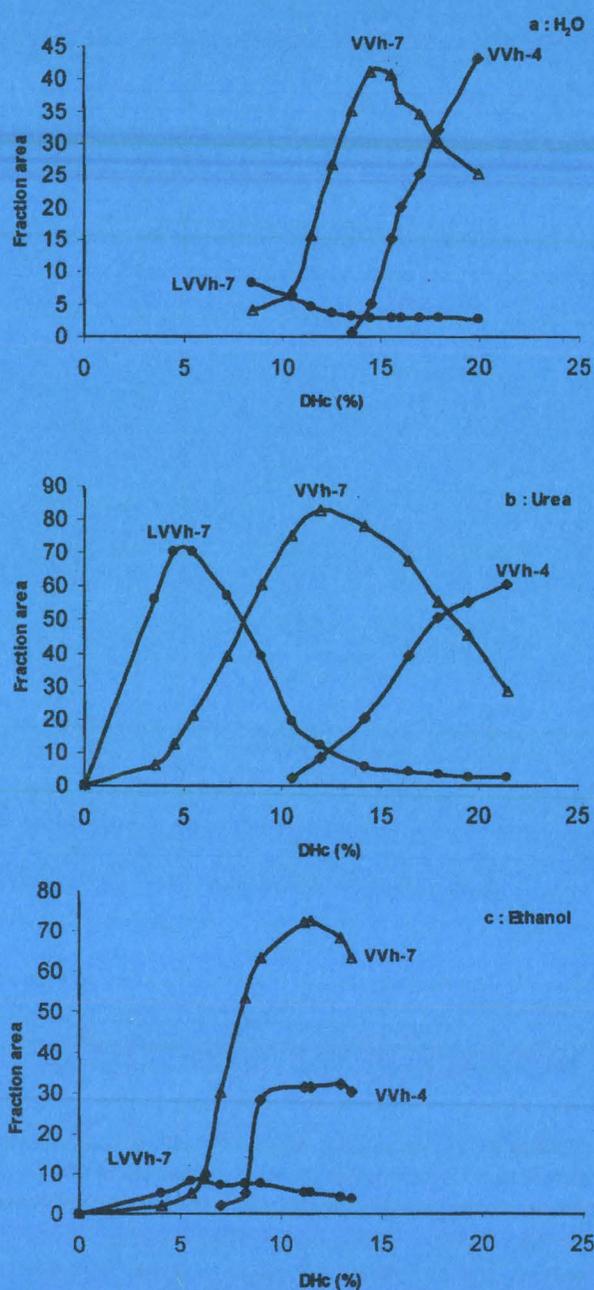


Figure 5 Comparison of kinetics of appearance of LVV-haemorphin-7 (LVVh-7), VV-haemorphin-7 (VVh-7) and VV-haemorphin-4 (VVh-4) in buffer alone (a), or in the presence of urea (b) or ethanol (c)

Peak areas were determined as described in the Figure 4 legend.

level of VV-haemorphin-4 increases in the buffer alone and with ethanol or urea. These results suggest that these three haemorphins are produced successively during the hydrolysis of the bovine haemoglobin  $\beta$  chain by pepsin at pH 4.5. Therefore, LVV-haemorphin-7 is a precursor of VV-haemorphin-7 which is a precursor of VV-haemorphin-4.

Zhao et al. [14] have shown at pH 2 that LVV-haemorphin-7 and VV-haemorphin-7 are precursors of LVV-haemorphin-5  $\beta$ (31–38) and VV-haemorphin-5  $\beta$ (32–38); however, they did not detect the formation of VV-haemorphin-4. In our case at pH 4.5, we have observed the generation of VV-haemorphin-4 but not the formation LVV-haemorphin-5 and VV-haemorphin-5. These results show that the selectivity of the haemoglobin peptic hydrolysis is different at pH 4.5 and pH 2.

### Conclusion

At pH 4.5, the peptic hydrolysis of bovine haemoglobin produces three opioid peptides: neokytorphin, VV-haemorphin-4 and the bradykinin-potentiating peptide. Our results show that VV-haemorphin-7 is a precursor of VV-haemorphin-4 and that LVV-haemorphin-7, VV-haemorphin-7 and VV-haemorphin-4 were successively produced from the  $\beta$  chain of haemoglobin. VV-Haemorphin-4 was only produced at pH 4.5 whereas LVV-haemorphin-5 and VV-haemorphin-5 were only obtained at pH 2. Each active peptide can be isolated in one step by reversed-phase HPLC from the haemoglobin peptic hydrolysate thanks to the choice of optimum  $DH_c$  and composition of the solvent, i.e. in the presence of urea or ethanol. Moreover, the peptic hydrolysis of haemoglobin at pH 4.5 is interesting because, contrary to the hydrolysis carried out at pH 2 for which haem and haemoglobin precipitate only partly, the hydrolysis can be performed in homogeneous solution.

### References

- 1 Kilara, A. (1985) *Process Biochem.* **21**, 149–157
- 2 Cuthberton, D. P. J. (1950) *Sci. Food Agric.* **1**, 35–41
- 3 Meisel, M., Frister, H. and Schlimme, E. (1989) *Ernährungswiss* **28**, 267–278
- 4 Silk, D. B. A., Grimble, G. H. and Rees, R. G. (1985) *Proc. Nutr. Soc.* **44**, 63–72
- 5 Rerat, A., Simoes-Nunes, C., Mendy, F. and Roger, L. (1988) *Br. J. Nutr.* **60**, 121–126
- 6 Werner, G. H., Floc'h, F., Migliore-Samour, D. and Jolles, P. (1986) *Experientia* **42**, 521–531
- 7 Chiba, H., Tani, F. and Yoshikawa, M. (1989) *J. Dairy Res.* **56**, 363–366
- 8 Bouhallab, S. and Touzé, C. (1995) *Lait* **75**, 251–258
- 9 Bellamy, W., Wakabayashi, H., Takase, M., Kawase, K., Shimamura, S. and Tomita, M. (1993) *Med. Microbiol. Immunol.* **182**, 97–105
- 10 Piot, J. M., Guillochon, D., Leconte, D. and Thomas, D. (1988) *Chem. Technol. Biotechnol.* **42**, 147–156
- 11 Piot, J. M., Zhao, Q. Y., Guillochon, D., Ricart, G. and Thomas, D. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 101–110
- 12 Piot, J. M., Zhao, Q. Y., Guillochon, D., Ricart, G. and Thomas, D. (1992) *FEBS Lett.* **299**, 75–79
- 13 Ivanov, V. T., Karelin, A. A., Philippova, M. M., Nazimov, I. V. and Pletnev, V. Z. (1997) *Biopolymers* **43**, 171–188
- 14 Zhao, Q., Sannier, F. and Piot, J. M. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1295**, 73–80
- 15 Dalgarrondo, M., Dufour, E., Chobert, J. M., Bertrand-Harb, C. and Haertlé, T. (1995) *Dairy J.* **5**, 1–14
- 16 Houen, G. and Sando, T. (1991) *Anal. Biochem.* **193**, 186–190
- 17 Tchobanov, B. and Iliev, I. (1993) *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 974–978
- 18 Hertmanni, P., Picque, E., Thomas, D. and Larreta-Garde, V. (1991) *FEBS Lett.* **279**, 123–131
- 19 Lignot, B., Froidevaux, R., Nedjar-Arroume, N. and Guillochon, D. (1999) *Biotechnol. Appl. Biochem.* **29**, 25–30
- 20 Nedjar-Arroume, N., Guillochon, D., Piot, J. M. and Thomas, D. (1991) *Biotechnol. Appl. Biochem.* **13**, 303–314
- 21 Alder-Nissen, J. (1979) *J. Agric. Food Chem.* **27**, 1256–1262
- 22 Zhao, Q. and Piot, J. M. (1998) *Peptides* **19**, 759–766
- 23 Zhao, Q. Y., Sannier, F., Garreau, I., Lecoer, C. and Piot, J. M. (1998) *J. Chromatogr.* **A723**, 35–41

Received 12 May 1999/28 June 1999; accepted 30 June 1999



## **CHAPITRE II**

# **ANALYSE DE LA CINETIQUE D'APPARITION DES HEMORPHINES PAR COUPLAGE DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE AVEC LA SPECTROMETRIE DE MASSE**

Dans le premier chapitre, nous avons montré que le mécanisme d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine à pH 4,5 avait une influence sur l'obtention des peptides à activités biologiques, dont certains peptides opioïdes. En effet, un mécanisme d'hydrolyse de type "zipper", engendré par la dénaturation de l'hémoglobine, permet une production plus importante de certaines hémorphines telles que la LVVh-7, la VVh-7 et la VVh-4, comparé à une hydrolyse de type "one by one", où l'hémoglobine est sous une configuration native.

Cependant, la spectrométrie de masse restait un outil indispensable à la caractérisation de la masse moléculaire et donc à la confirmation de la présence de ces peptides opioïdes. Il nous fallait trouver un moyen plus rapide pour analyser les pics élués de la CLHP de phase inverse.

Ce deuxième chapitre a pour objet de rapporter la mise au point du couplage de la CLHP en phase inverse avec la spectrométrie de masse (SM), afin d'isoler et d'identifier en une seule étape les trois hémorphines la LVVh-7, la VVh-7 et la VVh-4, qui apparaissent successivement au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine à pH 4,5. Ainsi les conditions précises de préparation de ces trois peptides actifs ont été établies.

Les procédures de préparation de peptides à activité opioïde nécessitent leur isolement par des techniques séparatives de chromatographies liquides, puis leur identification par les techniques de SM du type FAB, MALDI ou encore IES (Ionisation par ElectroSpray). Ces procédures restent laborieuses et demandent du temps.

Auparavant, la purification de peptides à partir d'un hydrolysats d'hémoglobine bovine à été réalisée par des méthodes enchaînant la chromatographie de basse et de haute pression. Ces méthodes ont été associées à la spectrométrie de masse pour permettre une identification fine des peptides ainsi purifiés (Piot et coll. 1989b). Par la suite, des techniques de purification exclusivement par CLHP en phase inverse ont été mises au point pour réaliser une analyse peptidique plus rapide de ces hydrolysats complexes (Piot et coll. 1989b). Des tampons volatils étaient employés de façon à permettre un recouvrement aisé des peptides pour des applications ultérieures. Une analyse des acides aminés par la méthode PICOTAG (Bidlingmeyer et coll. 1984) ainsi que par la spectrométrie de masse de type FAB (Fast Atom Bombardment) confirmaient la pureté et le poids moléculaire des peptides isolés.

Les progrès en CLHP utilisant la détection par des barrettes de diodes ont permis non seulement d'avoir un balayage spectral en temps réel au cours de la chromatographie, mais aussi d'obtenir simultanément les dérivés spectrales (Palladino et coll. 1991; Zavitsanos et

coll. 1991; Black et coll. 1991). Le poids moléculaire et la structure primaire étaient déterminés dans une seconde étape par spectrométrie de masse.

Afin de pallier à ces contraintes pratiques nous avons utilisé le couplage de la CLHP de phase inverse avec la SM-IES, pour suivre les cinétiques d'apparition de la LVVh-7, la VVh-7 et la VVh-4 au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine à pH 4,5. Cette technique dynamique et rapide est devenue une des plus importantes techniques d'analyse de mélanges protéiques et peptidiques ces dernières années (Huang et Henion 1990; Schroeder et coll. 1990). Cette technique est largement utilisée dans l'analyse de milieux contenant un nombre limité de peptides, c'est-à-dire des digestions enzymatiques de protéine avec des protéases spécifiques, pour confirmer des structures primaires (D'Agostino et coll. 1995; Chang et coll. 1997 ; Silberring et coll. 1997). D'autres rapports décrivent l'analyse d'échantillons biologiques complexes qui contiennent un nombre important de peptides différents (Palladino et coll. 1991; Raida et coll. 1999).

Nous avons suivi les cinétiques d'apparition des trois hémorphines au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine, grâce au couplage de la CLHP en phase inverse avec la SM-IES, et ainsi nous avons déterminé précisément les conditions idéales de préparation de ces trois peptides opioïdes.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article paru dans *Journal of Chromatography A*: Article 3.

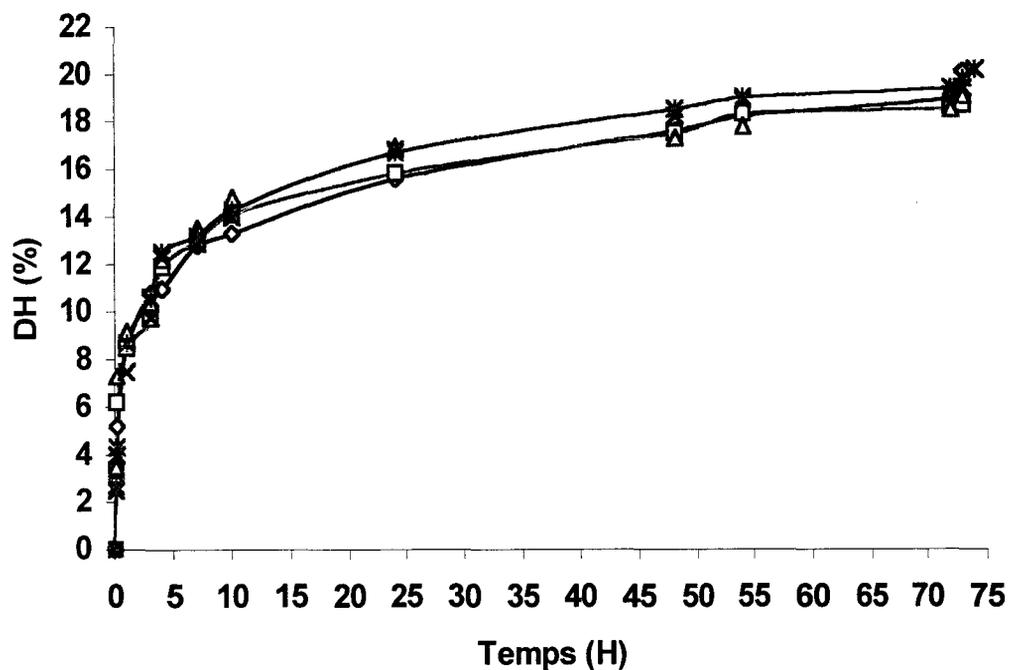
## **II.1. Effet de la concentration en hémoglobine sur la cinétique de la réaction d'hydrolyse à E/S constant.**

Dans le premier chapitre, nous avons montré que la conformation dénaturée de l'hémoglobine bovine permettait de générer des peptides opioïdes en plus grande quantité, comparé à l'hydrolyse de l'hémoglobine native. Nous avons donc conservé ces conditions de dénaturation de l'hémoglobine, à savoir un milieu tampon acétate de sodium pH 4,5 contenant de l'urée.

Les études précédentes ont été réalisées avec une concentration en hémoglobine bovine de 0,2 % (p/v). Cette concentration suffisait puisque les objectifs étaient essentiellement analytiques et non préparatifs. Or, cette concentration était trop faible pour envisager la préparation des trois peptides opioïdes à l'échelle préparative. Nous avons donc envisagé l'obtention de ces peptides à partir d'une solution d'hémoglobine dénaturée à 5 % (p/v).

Nous avons étudié la cinétique d'hydrolyse de l'hémoglobine dénaturée par la pepsine pour des concentrations croissantes d'hémoglobine. Ceci nous a permis de vérifier que la cinétique d'apparition des peptides était conservée. Nous avons réalisé l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine dénaturée 0,2, 0,5, 1, 3 et 5 % (p/v), en conservant le même rapport enzyme / substrat (1/11, mol/mol). Ces hydrolyses ont été menées pendant 72 heures à 23°C dans un tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 contenant 5,3 M d'urée. Des prélèvements ont été effectués aux mêmes intervalles réguliers pour chaque hydrolyse et mélangés à une solution de tétraborate de sodium 0,32 M de façon à atteindre un pH final de 10, pH d'arrêt de la réaction enzymatique.

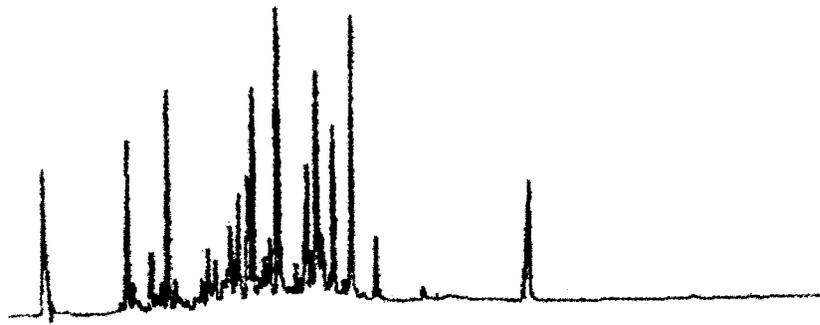
Nous avons suivi les cinétiques d'hydrolyse en déterminant les degrés d'hydrolyse en fonction du temps pour les différentes concentrations initiales en hémoglobine (0,2 à 5 %) (figure 32). Quelque soit la concentration initiale en hémoglobine, chaque cinétique d'hydrolyse suit la même évolution. Après 72 heures de réaction enzymatique, toutes les courbes tendent vers un même degré d'hydrolyse d'environ 20 %.



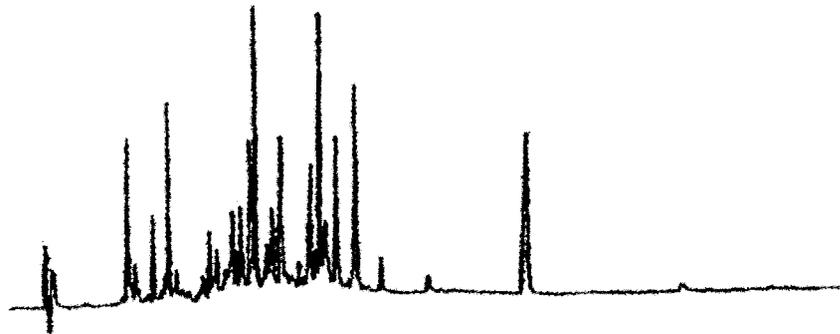
**Figure 32. Cinétiques d'hydrolyse de l'hémoglobine dénaturée par l'urée aux concentrations de 0,2 % (◇), 0,5 % (□), 1 % (△), 3 % (×) et 5 % (●), en fonction du temps, à pH 4,5.**

La figure 33 montre les profils chromatographiques correspondant à 20 % de DH (hydrolysats peptidiques finaux) pour chaque concentration initiale en hémoglobine dénaturée. L'hydrolyse peptidique de l'hémoglobine dénaturée aboutit à une population en peptides finaux identiques, quelque soit la concentration en hémoglobine. Il nous était donc possible d'augmenter la concentration en hémoglobine dénaturée afin d'étudier les cinétiques d'apparition des trois hémorphines par un couplage de la chromatographie liquide haute performance en phase inverse avec la spectrométrie de masse à ionisation par électrospray, dans le but de préparer la LVV-hémorphine-7, la VV-hémorphine-7 et la VV-hémorphine-4.

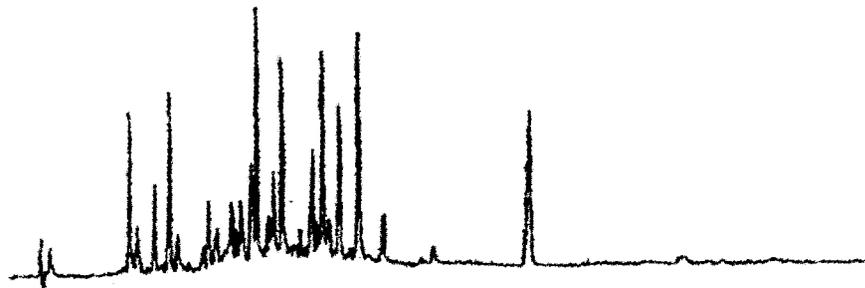
Hb 0,2 %



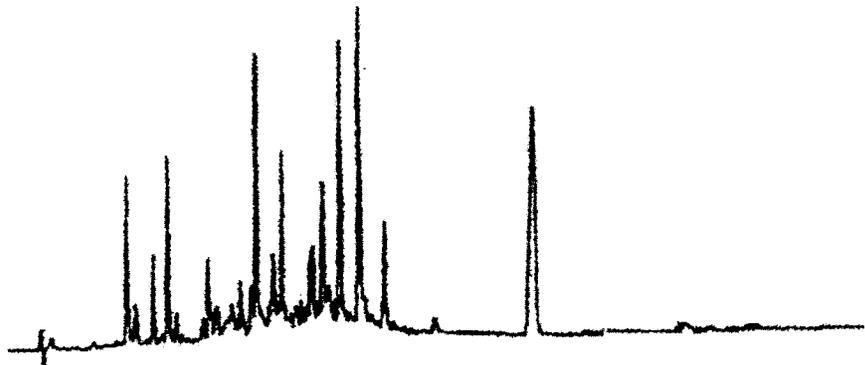
Hb 0,5 %



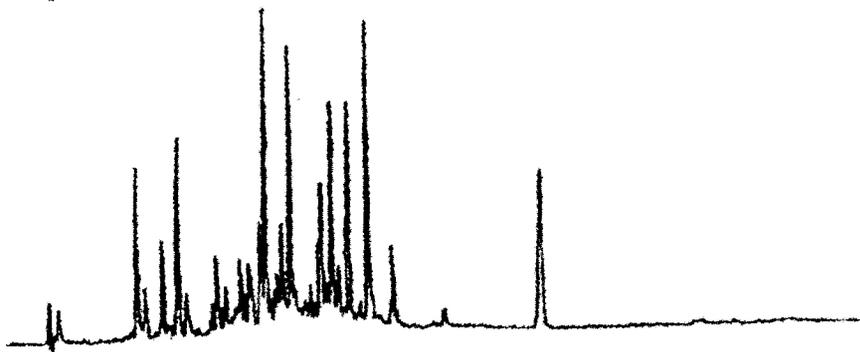
Hb 1 %



Hb 3 %



Hb 5 %

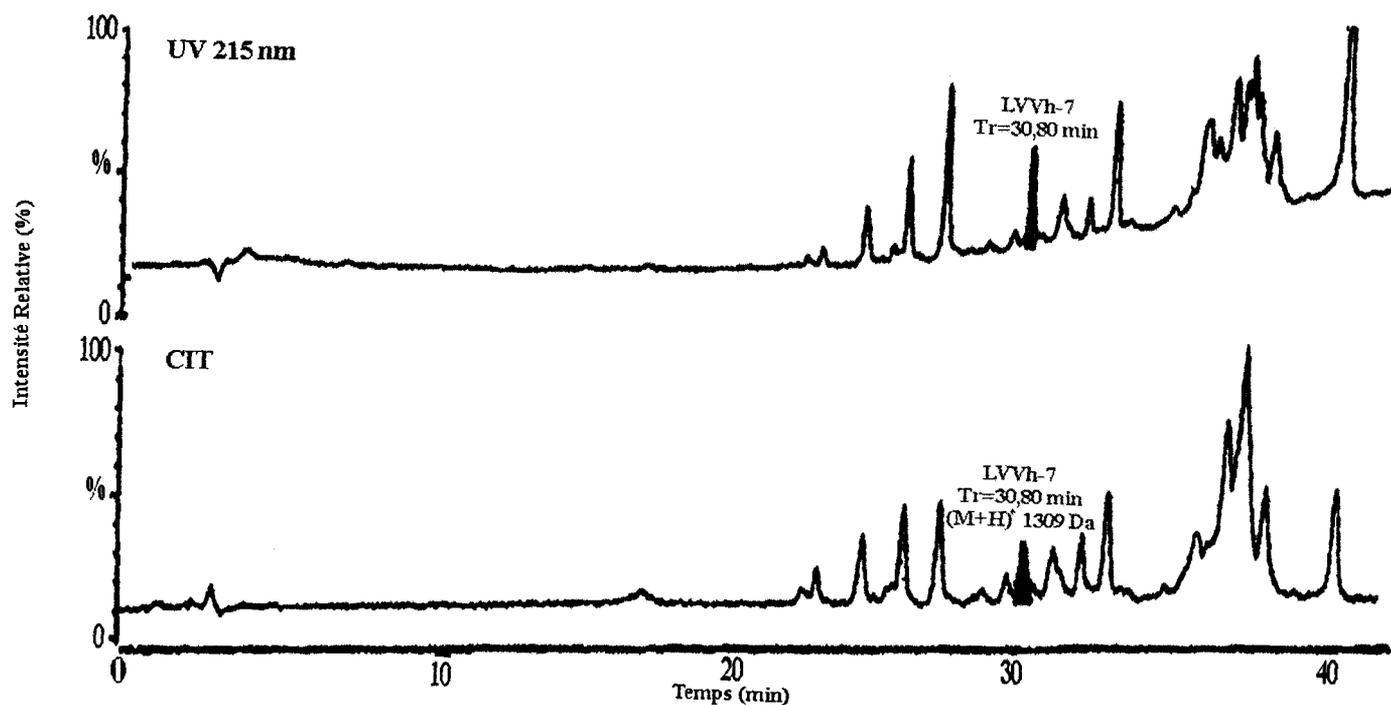


**Figure 33** Profils chromatographiques des hydrolysats pepsiques obtenus au bout de 72 heures par hydrolyse de l'hémoglobine dénaturée par l'urée aux concentrations de 0,2 %, 0,5 %, 1 %, 3 % et 5 % (p/v) à pH 4,5 (E/S=1/11, mol/mol).

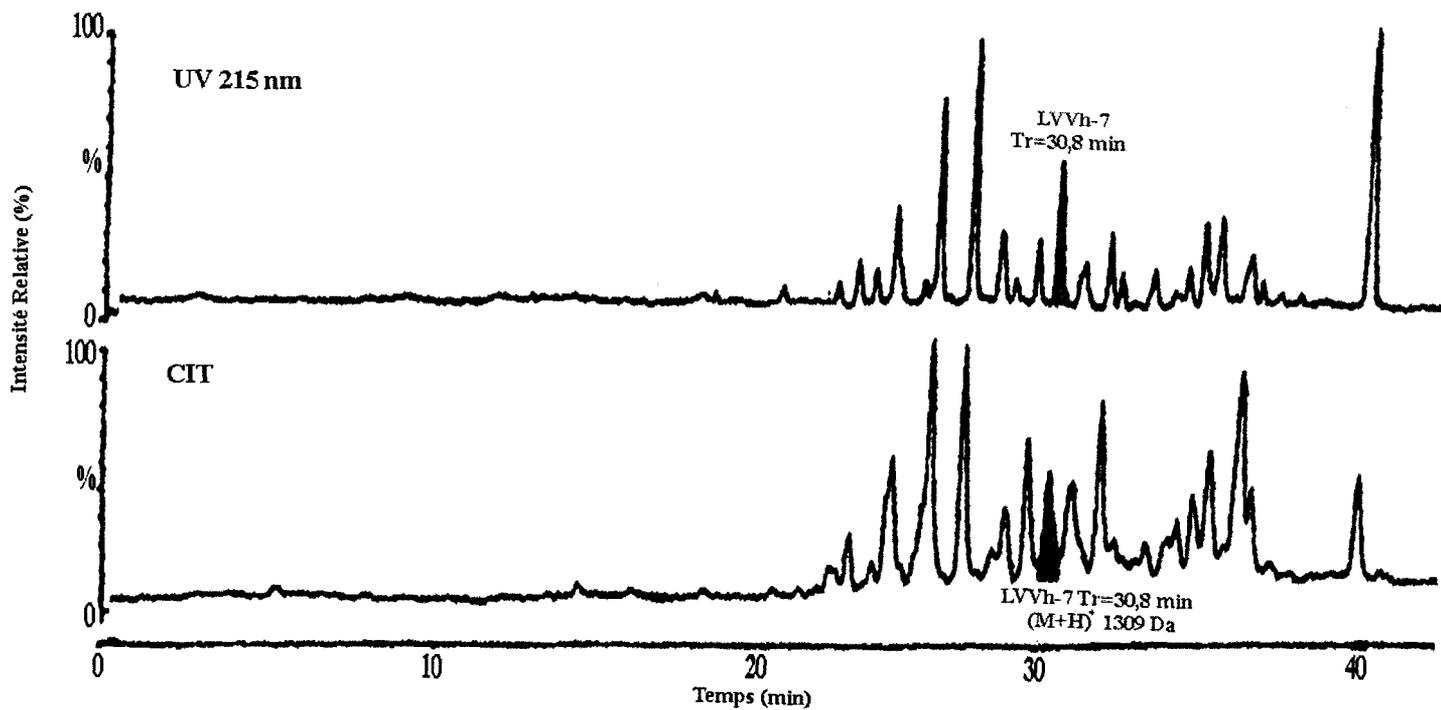
## **II.2. Suivi de la cinétique d'apparition des hémorphines par couplage de la CLHP en phase inverse avec la SM-IES.**

Nous avons mené l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine à 5% (p/v) à 23°C pendant 72 heures dans un tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5, contenant 5,3 M d'urée. Afin de suivre de manière directe la cinétique d'apparition de trois peptides actifs (LVV-hémorphine-7, VV-hémorphine-7 et VV-hémorphine-4) dans un hydrolysats peptidique en fonction du degré d'hydrolyse de l'hémoglobine, nous avons réalisé le couplage CLHP sur une colonne de phase inverse avec un spectromètre de masse à ionisation par électrospray (IES). Le pouvoir de cette technique repose sur sa capacité à déterminer à la fois le temps de rétention (chromatogramme avec détection en UV issu du fractionnement de l'hydrolysats) et le poids moléculaire des peptides élués (chromatogramme avec détection en CIT, Courant Ionique Total). La figure 34 montre les chromatogrammes CLHP-SM obtenus au cours de l'analyse d'hydrolysats peptidiques d'hémoglobine bovine de différents degrés d'hydrolyse corrigés (DHc) 1,5, 3, 9, 11, 15, 17, 19, 21 %, qui correspondent respectivement à 30 secondes, 2,5 minutes, 1, 3, 10, 24, 48 et 72 heures d'hydrolyse. L'analyse spectrale des données acquises grâce au couplage CLHP / SM-IES nous a apporté une excellente correspondance entre les chromatogrammes avec détection en UV et par CIT, et nous a permis de corrélérer sans ambiguïté les temps de rétention des hémorphines avec leur spectre de masse. De manière générale, les différences observées étaient limitées à des variations d'intensités des pics qui pouvaient être attribuées aux spécificités de chaque détecteur : le détecteur UV était sensible aux nombres de chromophores qui absorbent à 215 nm tandis que le spectromètre de masse était sensible aux différences de désorption/ionisation pour chaque hémorphine.

(a) DHc = 1,5 %



(b) DHc = 3 %



**Figure 34. Couplage CLHP – SM/IES.**  
Chromatogrammes avec détection en UV et en CIT d'un hydrolysate peptique d'hémoglobine à 5 % (p/v) dénaturée par l'urée en fonction de l'avancement de la réaction (DHc).

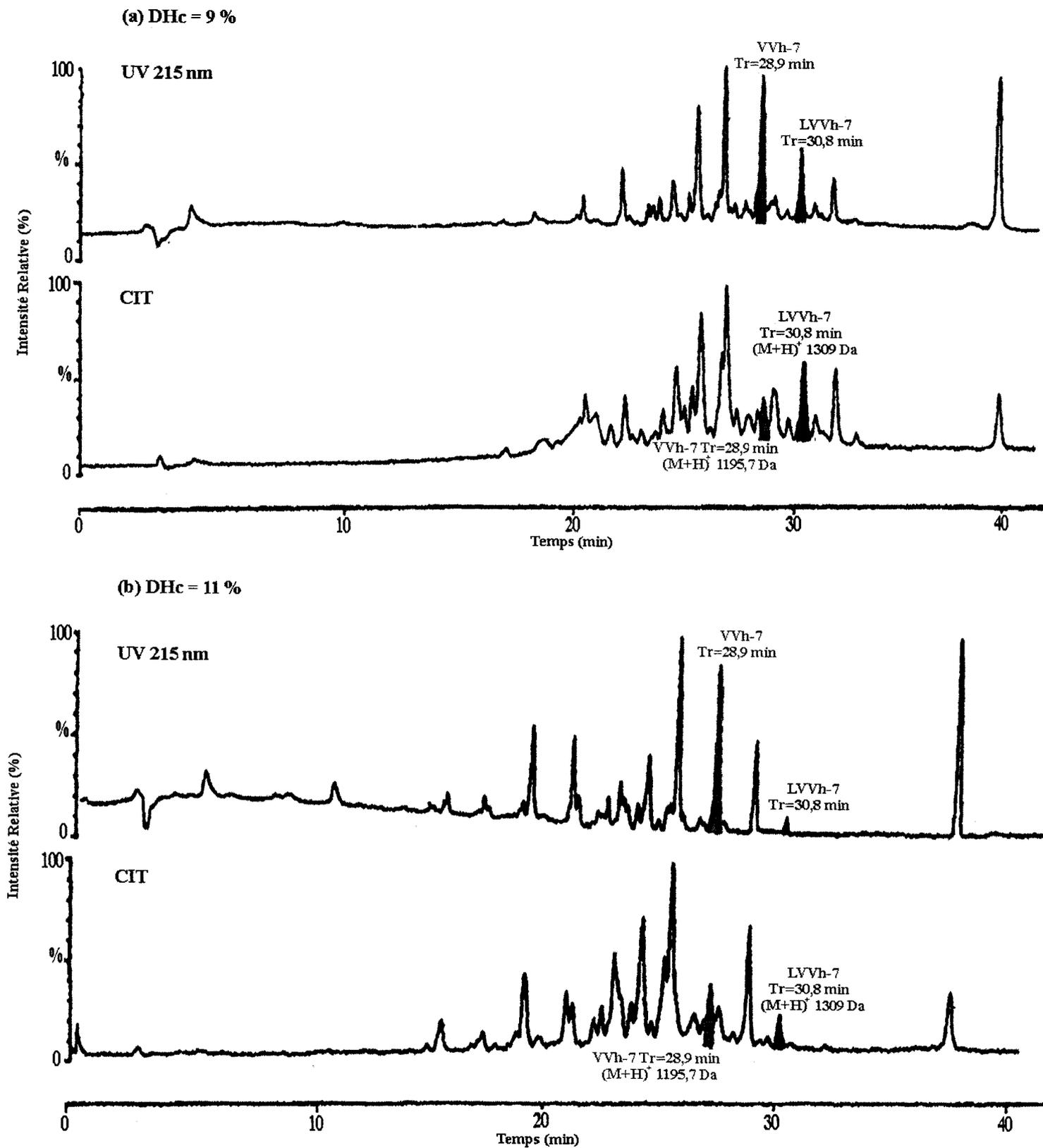
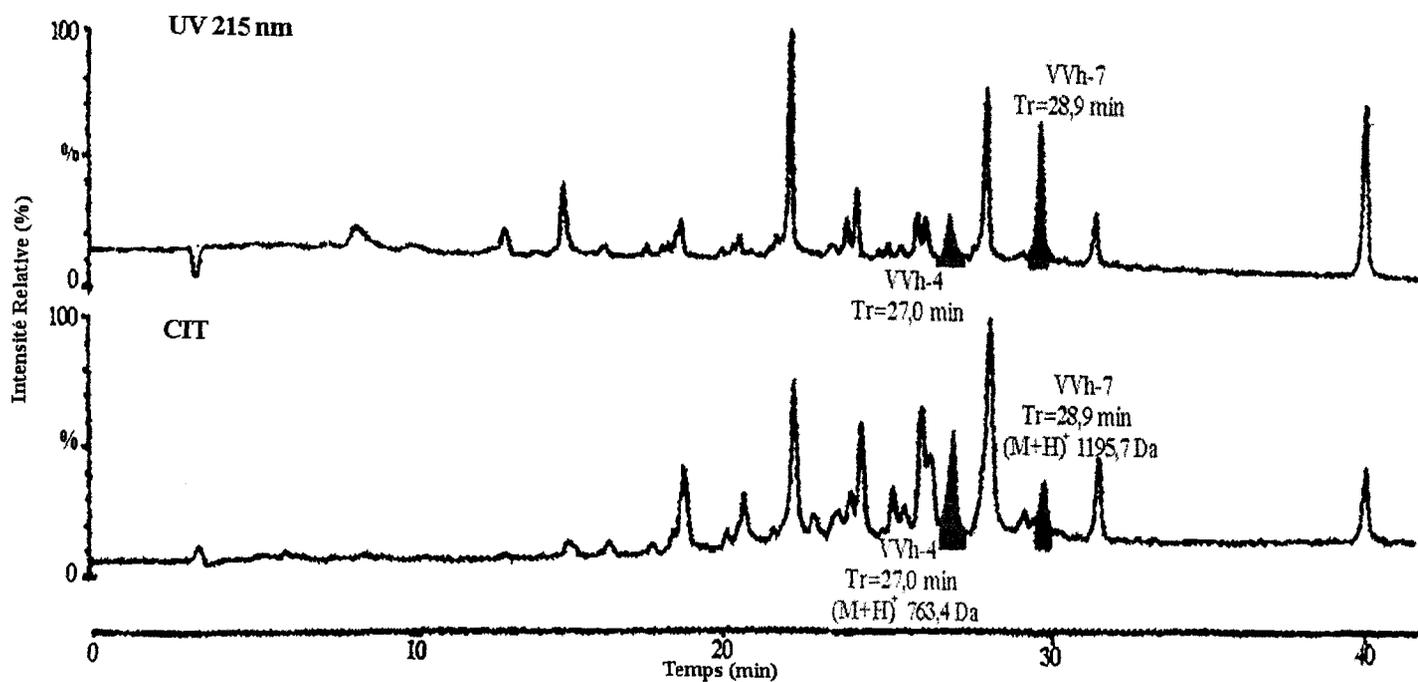


Figure 34. Couplage CLHP – SM/IES (suite).

(a) DHc = 15 %



(b) DHc = 17 %

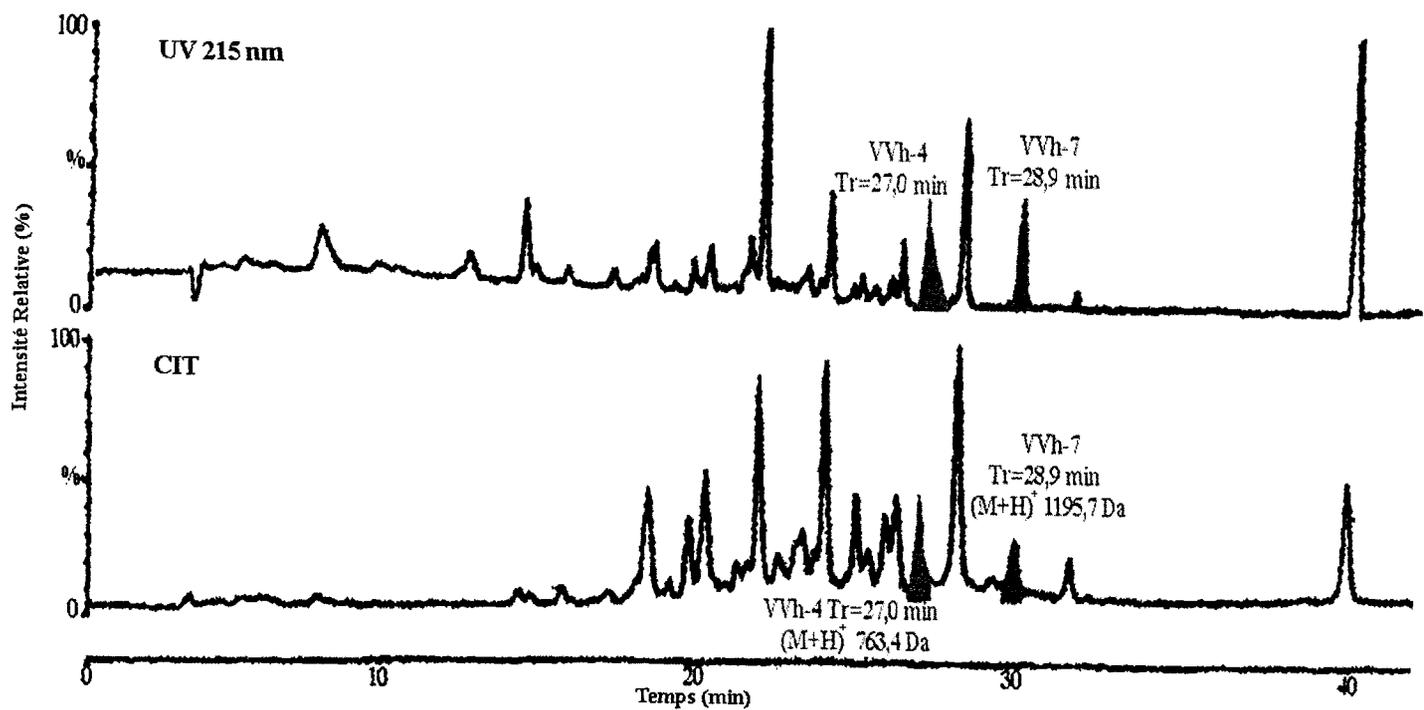
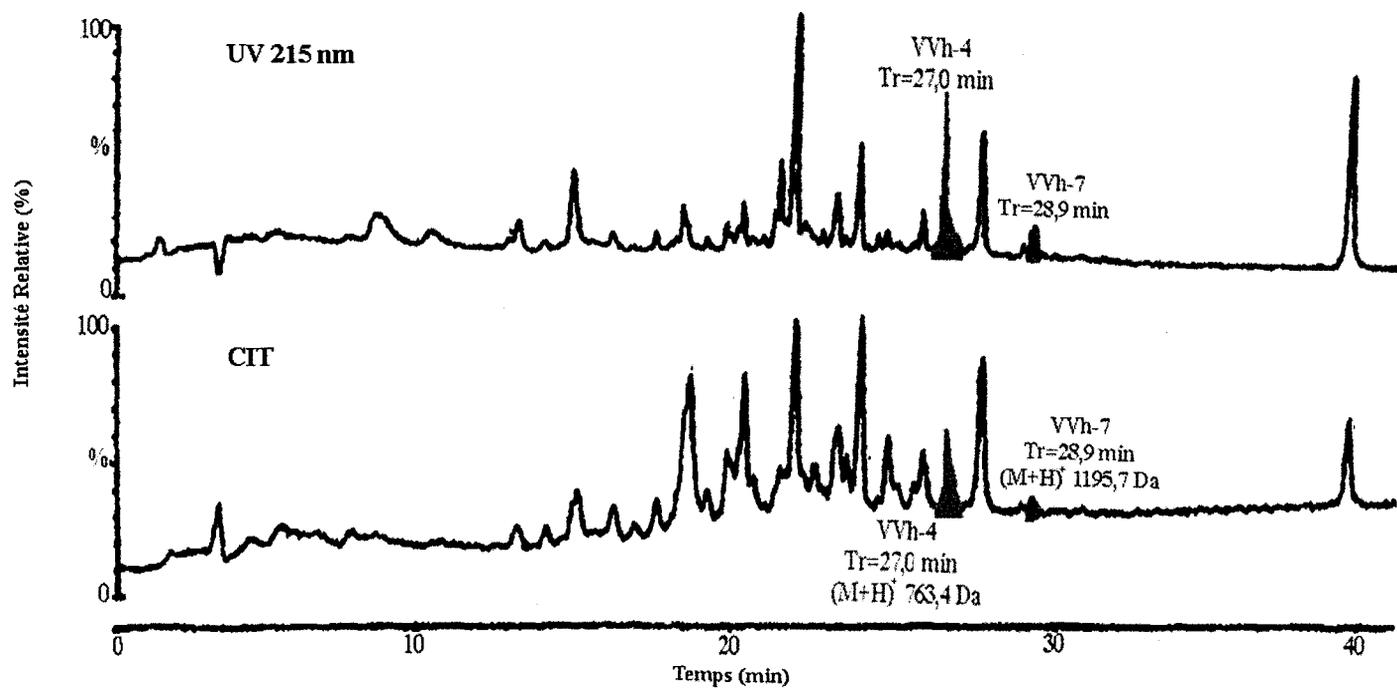


Figure 34. Couplage CLHP – SM/IES (suite).

(a) DHc = 19 %



(b) DHc = 21 %

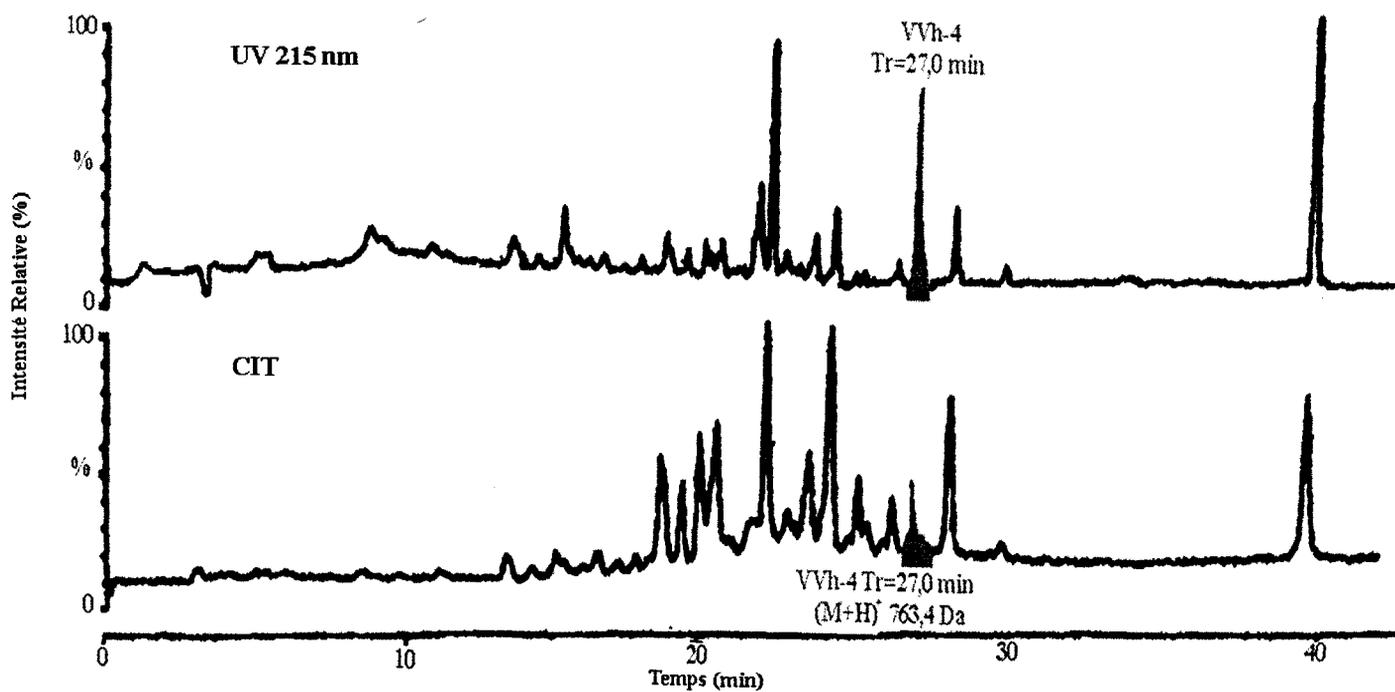


Figure 34. Couplage CLHP – SM/IES (fin).

La LVVh-7 est éluée avec un temps de rétention de 30,8 minutes. Ce temps d'éluion est conservé pendant toute la durée de détection de l'hémorphine. Elle est détectée dès le début de l'hydrolyse, pour un DHc de 1,5 %, et une masse moléculaire protonée (M+H)<sup>+</sup> de 1309 Da. Sa concentration augmente au cours de l'hydrolyse puis elle diminue: l'hémorphine a complètement disparu à 15 % de DHc qui correspond à une protéolyse d'environ 10 heures.

La VVh-7 est détectée avec un temps de rétention de 28,9 minutes et une masse moléculaire protonée (M+H)<sup>+</sup> de 1195,7 Da. Cette détection débute à un DHc de 9 %, correspondant à 1 heure d'hydrolyse, puis l'hémorphine s'accumule jusque 11 % de DHc. Elle disparaît complètement à un DHc de 21 %, c'est-à-dire au bout des 72 heures d'hydrolyse. Pendant cette période d'existence, le temps de rétention de la VVh-7 (28,9 min) est conservé.

L'évolution cinétique de la LVVh-7 et VVh-7 indique que l'hydrolyse de la première hémorphine engendre la formation et l'accumulation de la seconde hémorphine. Comme nous l'avons discuté dans le chapitre précédent, à pH 4,5 lorsque la concentration de la LVVh-7 diminue celle de la VVh-7 augmente. Zhao et coll. (1996b) ont aussi observé le même phénomène à pH 2 et en ont déduit le rôle précurseur de la LVVh-7 pour la génération de la VVh-7.

La VVh-4 est détectée plus tard au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine dénaturée. Elle est éluée avec un temps de rétention de 27 minutes et une masse moléculaire protonée (M+H)<sup>+</sup> de 763,4 Da. Cette hémorphine est détectée la dernière au sein des hydrolysats de l'hémoglobine. Son domaine de détection s'étend de 15 % de DHc jusque 21 %, qui correspondent respectivement à 10 et 72 heures d'hydrolyse. Pendant cette période, la VVh-4 s'accumule dans le milieu réactionnel et n'est pas hydrolysée par la pepsine, contrairement à la LVVh-7 et la VVh-7.

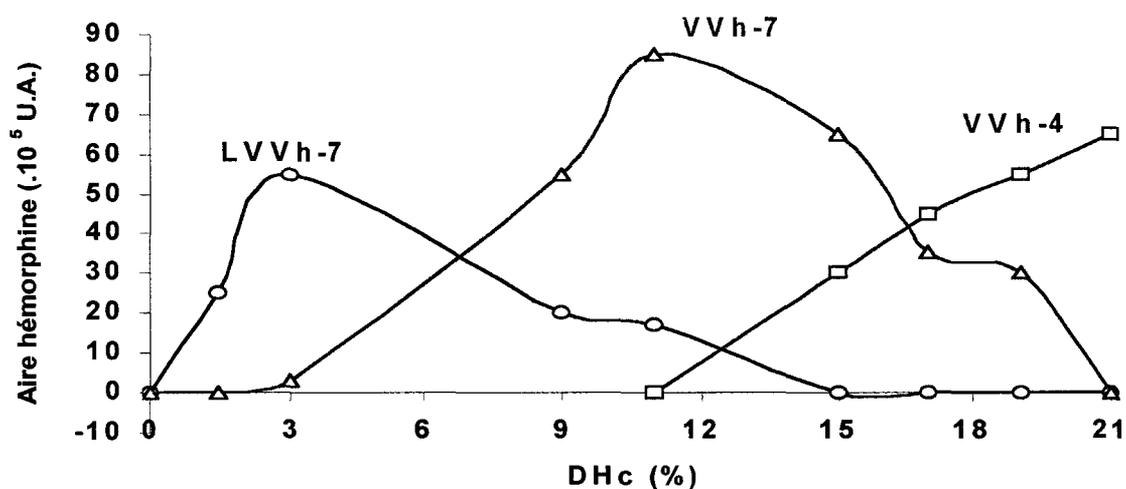
Dans le chapitre précédent nous avons supposé que la LVVh-7 et la VVh-7 étaient des peptides intermédiaires tandis que la VVh-4 était plutôt un peptide final. Ceci est confirmé par le couplage de la CLHP en phase inverse avec la spectrométrie de masse à ionisation par électrospray.

Ces résultats montrent également que la concentration de la VVh-7 diminue tandis que celle de la VVh-4 augmente. Ainsi, la VVh-7 est précurseur de la formation de la VVh-4. De plus, à pH 4,5, ces trois hémorphines sont produites successivement pendant l'hydrolyse de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine par la pepsine: la LVVh-7 est précurseur de la formation de la VVh-7 qui est elle-même précurseur de la formation de la VVh-4.

Zhao et coll. (1996b) ont montré que la LVVh-7 et la VVh-7 étaient précurseurs de la LVVh-5 ( $\beta$ 31-38) et de la VVh-5 ( $\beta$ 32-38) à pH 2. Cependant, ils n'ont pas détecté la

présence de la VVh-4. Dans nos conditions, à pH 4,5, nous observons la formation de la VVh-4 mais pas celle de la LVVh-5 et de la VVh-5. Ces résultats confirment l'hypothèse de la différence de spécificité de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine à pH 4,5 et pH 2.

Les conditions optimales, pour la préparation de la LVVh-7, de la VVh-7 et de la VVh-4, ont été déterminées grâce aux études des cinétiques d'apparition de ces peptides en fonction du degré d'hydrolyse de l'hémoglobine dénaturée par l'urée à 5 % (p/v), représentées sur la figure 35.



**Figure 35. Cinétiques d'apparition de la LVV-hémorphine-7 (ö), de la VV-hémorphine-7 (Δ) et de la VV-hémorphine-4 (□) au cours de l'hydrolyse pepsique à pH 4,5 de l'hémoglobine bovine 5 % (p/v) dénaturée à l'urée.**

Nous proposons un DHc faible (environ 3 %) pour préparer la LVVh-7, un DHc moyen (environ 11 %) pour préparer la VVh-7 et un DHc élevé (21 %) pour préparer la VVh-4.

## Remarque

En II.1 nous avons montré que la cinétique d'hydrolyse de l'hémoglobine repérée par son DH en fonction du temps ainsi que les profils peptidiques finaux obtenus en CLHP en phase inverse étaient indépendants de la concentration en hémoglobine pour E/S constant (1/11, mol/mol) entre 0,2 et 5 % (p/v). Nous avons montré en II.2 qu'il était possible avec une concentration de 5 % (p/v) en hémoglobine d'observer l'apparition des hémorphines et de suivre leurs cinétiques d'évolution au cours de l'hydrolyse pepsique.

Nous avons voulu comparer si les cinétiques d'apparition des hémorphines n'étaient pas perturbées lorsque la concentration en hémoglobine variait, même si le rapport E/S était maintenu constant (1/11, mol/mol). Cette condition est importante si on veut envisager dans le futur des procédés de production de ces peptides actifs.

Pour cela nous avons comparé les cinétiques d'apparition de la LVVh-7, de la VVh-7 et de la VVh-4 au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine dénaturée par l'urée entre 0,2 et 5 % (p/v), en maintenant toujours constant le rapport E/S (1/11, mol/mol) (figures 36 à 38).

L'évolution des cinétiques d'hydrolyse est identique pour les trois hémorphines, que l'on soit à 0,2 ou à 5% en concentration d'hémoglobine dénaturée. Le domaine d'apparition de chaque hémorphine est conservé lorsque la concentration en hémoglobine augmente: la LVVh-7 est au maximum de sa concentration aux alentours de 3 % de DHc, la VVh-7 aux environs de 11 % de DHc, et la VVh-4 aux environs de 21 % de DHc.

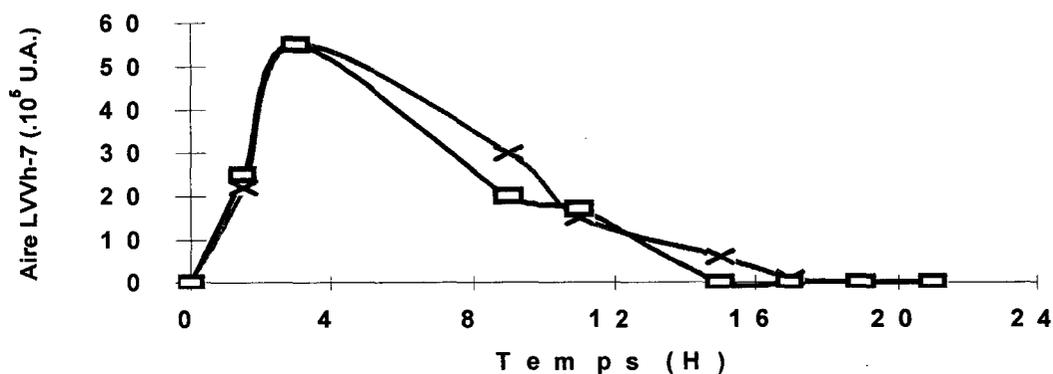


Figure 36. Evolution de l'aire de la LVV-hémorphine-7 en fonction du DHc au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine à 0,2 % (×) et 5 % (□) dans le tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 contenant 5,3 M d'urée, E/S=1/11 (mol/mol).

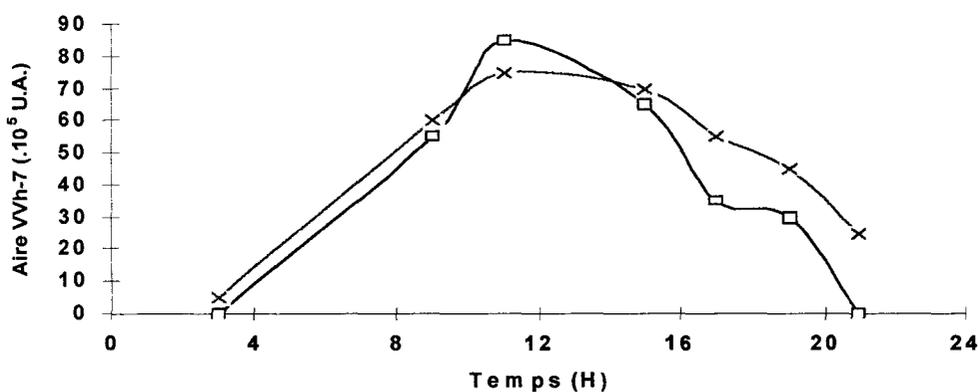


Figure 37. Evolution de l'aire de la VV-hémorphine-7 en fonction du DHc au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine à 0,2 % (×) et 5 % (□) dans le tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 contenant 5,3 M d'urée, E/S=1/11 (mol/mol).

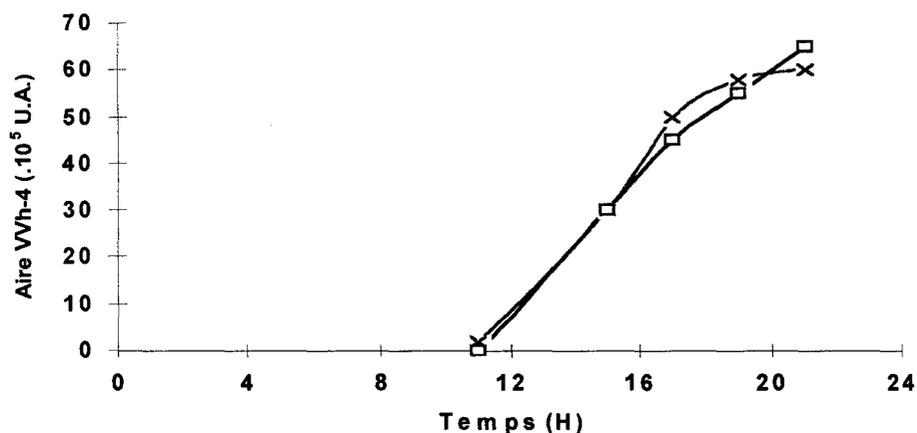


Figure 38. Evolution de l'aire de la VV-hémorphine-4 en fonction du DHc au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine à 0,2 % (×) et 5 % (□) dans le tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 contenant 5,3 M d'urée, E/S=1/11 (mol/mol).

## Conclusion

Nous avons développé une technique rapide utilisant un couplage direct de la CLHP de phase inverse avec la spectrométrie de masse à ionisation électrospray pour l'isolement et l'identification des trois hémorphines LVV-hémorphine-7, VV-hémorphine-7 et VV-hémorphine-4, produites successivement au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine dénaturée à pH 4,5.

Nous avons montré que la cinétique d'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine suit la même évolution quand la concentration de l'hémoglobine augmente de 0,2 à 5 % (p/v).

L'obtention des cinétiques d'évolution de ces trois hémorphines, issue d'hydrolysats pepsiques de l'hémoglobine dénaturée à 0,2 % (p/v), s'est faite grâce à leur isolement par CLHP en phase inverse, puis dans un second temps par la caractérisation de leur masse moléculaire par spectrométrie de masse de type MALDI. A partir des hydrolysats pepsiques de l'hémoglobine à 5 % (p/v), la détermination des mêmes cinétiques s'est faite en une seule étape, l'isolement des trois hémorphines par la CLHP de phase inverse suivi immédiatement de leur identification par SM-IES, grâce au couplage de ces deux techniques.

La comparaison des deux procédures rend bien compte du dynamisme du système et de l'efficacité dans l'isolement et l'identification d'hémorphines grâce au couplage de la CLHP avec la SM, par rapport aux procédures traditionnelles, ce qui engendre nécessairement un gain de temps considérable.

Cette méthode est une façon d'identifier ces peptides actifs sans extraction préliminaire, et permet de réduire leur temps de purification. Cette technique est une bonne technique de séparation analytique et possède une capacité de détection très sensible. L'utilisation du couplage de la chromatographie liquide haute performance avec la spectrométrie de masse, pour la caractérisation de peptides actifs, peut être une technique bioanalytique très puissante. De plus, la recherche de peptides, connus par leur masse moléculaire, est une méthode fiable dans la procédure de purification peptidique.

Nous avons déterminé les conditions idéales de préparation des trois hémorphines, grâce aux études cinétiques d'apparition de ces peptides au cours de l'hydrolyse en fonction du DHc de l'hémoglobine dénaturée à 5 %. Il est préférable de se placer à un DHc faible (3 %) pour préparer la LVVh-7, à un DHc moyen (11 %) pour la préparation de la VVh-7, et un DHc élevé (21 %) pour préparer la VVh-4. Ces conditions sont d'autant plus intéressantes qu'elles sont conservées lorsque la concentration en hémoglobine dénaturée

augmente de 0,2 à 5 %, puisque le domaine de production des trois hémorphines est lui-même conservé dans ces conditions.

### Article 3

*Titre: Cinétiques d'apparition d'hémorphines, issues d'hydrolysats pepsiques de l'hémoglobine bovine, suivies par un couplage de la Chromatographie Liquide Haute Performance en phase inverse avec la Spectrométrie de Masse à Ionisation Electrospray.*

**Résumé:** La Chromatographie Liquide Haute Performance en phase inverse, couplée avec la Spectrométrie de Masse à Ionisation Electrospray, a été utilisée pour améliorer la préparation de trois peptides opioïdes (Leu-Val-Val-hemorphin-7, Val-Val-hemorphin-7 et Val-Val-hemorphin-4), à partir d'hydrolysats pepsiques de l'hémoglobine bovine. Les conditions optimales de préparation de ces peptides ont été déterminées grâce à l'étude cinétique de leurs apparitions au cours de l'hydrolyse pepsique en fonction du degré d'hydrolyse de l'hémoglobine. Nous proposons un degré d'hydrolyse faible (3%) pour préparer la Leu-Val-Val-hemorphin-7, un degré d'hydrolyse moyen (11%) pour préparer la Val-Val-hemorphin-7 et un degré d'hydrolyse élevé (21%) pour préparer la Val-Val-hemorphin-4.



ELSEVIER

Journal of Chromatography A, 873 (2000) 185–194

JOURNAL OF  
CHROMATOGRAPHY A

www.elsevier.com/locate/chroma

## Kinetics of appearance of hemorphins from bovine hemoglobin peptic hydrolysates by a direct coupling of reversed-phase high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry

Renato Froidevaux<sup>a</sup>, Brigitte Lignot<sup>a</sup>, Naima Nedjar-Arroume<sup>a,\*</sup>, Didier Guillochon<sup>a</sup>, Bernadette Coddeville<sup>b</sup>, Guy Ricart<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Technologie des Substances Naturelles, IUT "A" Lille 1, BP 179, 59653 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

<sup>b</sup>Laboratoire de Spectrométrie de Masse, Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

Received 5 October 1999; received in revised form 21 December 1999; accepted 27 December 1999

### Abstract

Reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry was used to improve the preparation of three opioid peptides (Leu-Val-Val-hemorphin-7, Val-Val-hemorphin-7 and Val-Val-hemorphin-4) resulting from bovine hemoglobin peptic hydrolysates. Optimal conditions for the preparation of these peptides were determined thanks to their kinetic studies of appearance in the course of peptic hydrolyses as a function of degree of hydrolysis of hemoglobin. We propose a low degree of hydrolysis (3%) to prepare Leu-Val-Val-hemorphin-7, a mean degree of hydrolysis (11%) to prepare Val-Val-hemorphin-7 and a high degree of hydrolysis (21%) to prepare Val-Val-hemorphin-4. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Kinetic studies; Hemoglobins; Peptides; Hemorphins; Opioids

### 1. Introduction

Hemorphins are a new class of opioid peptides derived from the blood protein hemoglobin. These peptides were isolated and purified *in vivo* in biological fluids [1–8], and *in vitro* from enzymatically treated hemoglobin [9–12].

A number of hemorphin peptides were obtained from a peptic bovine hemoglobin at pH 2. The two

first hemorphins obtained were hemorphin-4 (Tyr-Pro-Trp-Thr) and hemorphin-5 (Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln). These amino acid sequences correspond to the 34–37 and 34–38 fragments of the  $\beta$ -chain of hemoglobin [9]. We have isolated and characterized two other opioid peptides [10]: LVV-hemorphin-7 (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe) and VV-hemorphin-7 (Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe). These peptides correspond respectively to the sequence 31–40 and 32–40 of  $\beta$ -chain. Recently, Zhao et al. [11] also isolated other opioid peptides from this hydrolysate: LVV-hemorphin-5 (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln) and VV-

\*Corresponding author. Tel.: +33-20-43-4438; fax: +33-20-43-4472.

E-mail address: LTSN@univ-lille1.fr (N. Nedjar-Arroume)

hemorphin-5 (Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln), corresponding respectively to the sequences 31–38 and 32–38 of  $\beta$ -chain. More recently, we also isolated an other opioid peptide by hydrolysing hemoglobin in its native state at pH 4.5 [13]: VV-hemorphin-4 (Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr) corresponding to the sequence 32–37 of  $\beta$ -chain.

The purification of peptides from a bovine hemoglobin hydrolysate was first performed by a combination of low- or high-pressure size-exclusion (SEC) with reversed-phase (RP) HPLC [14,15]. This proved to be a useful strategy for the fractionation of such a mixture. Volatile buffers were employed in both HPLC techniques in order to get an easy recovery of peptides for further applications. Amino acid analysis by the Picotag method [16] and fast atom bombardment (FAB) mass spectrometry confirmed the purity and allowed accurate molecular weights to be determined for isolated peptides.

Progress in HPLC photodiode array detection technology have made possible not only to carry out the fly-real time spectral scanning during the chromatographic process, but also to obtain derivative spectra simultaneously [17–23]. We recently reported a method of isolation of these active peptides using one step by HPLC [24]. Then, the molecular weight and primary structure were determined in second step by mass spectrometry.

However, procedures for isolation and identification of peptides with opioid-like activity remain laborious and time-consuming. So, we propose direct coupling of HPLC and electrospray mass spectrometry (ESI-MS) which became one of the most important techniques of the analysis of proteins and peptides mixtures in the last few years [25]. This technique is widely used in the analysis of mixtures containing limited numbers of peptides, e.g., enzymatic digests of protein, to confirm primary structures [26–32]. Other reports describe the analysis of complex biological samples which contain a large number of different peptides [33,34].

The aim of the study presented here was to propose a method of isolation and identification of three active peptides (LVV-hemorphin-7, VV-hemorphin-7 and VV-hemorphin-4) using one step during the hydrolysis of bovine hemoglobin by a direct coupling of RP-HPLC and ESI-MS. In order to find ideal conditions for the preparation of these active

peptides, we have applied this method to the kinetic of appearance of these peptides *in vitro*, in our peptic hydrolysate as a function of the degree of hydrolysis of hemoglobin.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

All common chemicals and solvents were of analytical grade from commercial sources. Bovine hemoglobin and pig pepsin were purchased from Sigma. Acetonitrile was of HPLC grade. All aqueous HPLC eluents were degassed with helium.

### 2.2. Hydrolysate preparation

Hemoglobin at 5% (w/v) was digested at 23°C in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.5, in the presence of urea (5.3 M), by pig pepsin (EC 3.4.23.1) ( $1 \cdot 10^6$  Anson units; Sigma), with a substrate-to-enzyme ratio of 11:1 (w/w). The enzymatic hydrolysis was stopped at different degrees of hydrolysis by the addition of disodium tetraborate (0.32 M, pH 12.7) to yield a final pH of 10.

### 2.3. Determination of the degree of hydrolysis of hemoglobin

Degree of hydrolysis is defined as the number of peptide bonds cleaved to the total number of peptide bonds in hemoglobin. The cleavage of peptide bonds during hydrolysis was quantified by the trinitrobenzene sulfonate method (20). The corrected degree of hydrolysis (DHc) is defined as the ratio of the number of cleaved peptide bonds (determined by the trinitrobenzenesulphonate method) to the total number of peptide bonds of hemoglobin effectively hydrolysed. The proportion of non-hydrolysed hemoglobin was deduced from the determination of its peak area by HPLC.

### 2.4. Direct coupling of RP-HPLC and ESI-MS

All MS measurements were carried out in the positive ion mode on a Quattro II triple quadrupole instrument (Micromass, Altrincham, UK) equipped

with an electrospray ion source. The nebulizer and drying gases were delivered at flow-rates of 0.3 and 6.7 l min<sup>-1</sup>, respectively whereas the source temperature was maintained at 110°C. A mixture of polypropylene glycol (PPG) was used to calibrate the quadrupole mass spectrometer.

Separations were performed on a Hewlett-Packard 1100 HPLC system equipped with a Zorbax C<sub>3</sub> column (200×2.1 mm, 5 μm) directly coupled to the UV detector. Elution was carried out at a flow-rate of 0.170·10<sup>-3</sup> l min<sup>-1</sup> with a water–acetonitrile gradient. The A solvent was 0.1% trifluoroacetic (TFA) in water and the B solvent was 0.1% TFA in water–acetonitrile (40:60). The gradient was 0–67% B in 30 min and then 87% by 35 min. Detection was effected at 215 nm. Quadrupole mass spectrometer was scanned from *m/z* 400 to 1750 with a scan duration of 3.2 s and a scan delay of 0.1 s. The cone voltage was maintained at 60 V and the capillary and high-voltage electrode potentials were at 3.2 kV and 0.82 kV, respectively. An aliquot of pepsic hydrolysate corresponding to 55 pmols of hemoglobin was injected for HPLC–MS analysis.

### 3. Results and discussion

The peptic hydrolysis of bovine hemoglobin was performed for 72 h at 23°C in 0.1 M sodium acetate buffer at pH 4.5. In order to follow on-line kinetic of appearance of three active peptides (LVV-hemorphin-7, VV-hemorphin-7 and VV-hemorphin-4) in a peptic hydrolysate as a function of the degree of hydrolysis of hemoglobin, RP-HPLC was coupled with ESI–MS. This complex hydrolysate was analysed speedily, and with moderate ease, without resorting to off-line separation of components or derivatization procedures. The power of the technique derives from the ability to determine both the retention time (UV chromatogram) and the molecular mass of the eluting components [total ion current (TIC) chromatogram]. Fig. 1 shows HPLC–MS chromatograms obtained from the analysis of the peptic hydrolysate of bovine hemoglobin at different corrected degrees of hydrolysis (DHc) (1.5, 3, 9, 11, 15, 17, 19, 21%) corresponding respectively to 30 s, 2.5 min, 1, 3, 10, 24, 48 and 72 h respectively. The excellent correspondence of the UV chromatogram to

the TIC chromatogram in the HPLC–ESI–MS data acquired over the range mentioned before each peptic hydrolysate, allows reliable correlation of retention times of hemorphins with their corresponding mass spectra. In general, the differences observed were variations in relative peak intensities that could be attributed to the specificities of each of the two detectors: the UV detector was sensitive to the number of chromophores absorbing at 215 nm while the mass spectrometer was sensitive to differences in desorption/ionization efficiency for each hemorphin.

LVV-hemorphin-7, which was eluted at retention time of 30.80 min with a molecular cation (MH)<sup>+</sup> of *M<sub>r</sub>* 1309, was detected at a DHc of 1.5% (Fig. 1a). The concentration of this hemorphin increases in the course of the hydrolysis before decreasing and completely disappearing at DHc of 15% (Fig. 1b–d). VV-Hemorphin-7 which was eluted at a retention time of 28.90 min with a molecular cation (MH)<sup>+</sup> of *M<sub>r</sub>* 1195.7 was detected at a DHc of 9% (Fig. 1c). The concentration of this active peptide increases up to a DHc of 11% (Fig. 1d), then decreases to disappear completely at a DHc of 21% (Fig. 1e–h). These kinetic evolutions indicate that the peptic hydrolysis of LVV-hemorphin-7 gives rise to VV-hemorphin-7. As discussed previously [23], at pH 4.5, LVV-hemorphin-7 disappears while the concentration of VV-hemorphin-7 increases. Other authors [35,36] have also reported the same phenomenon at pH 2 and assumed that LVV-hemorphin-7 is a precursor of VV-hemorphin-7.

VV-Hemorphin-4 was late detected during peptic hydrolysis of hemoglobin at a DHc of 15% (Fig. 1e). It eluted at a retention time of 27.00 min with a molecular cation (MH)<sup>+</sup> of *M<sub>r</sub>* 763.4. Its concentration increased during the hydrolysis and was not cleaved by pepsin even after 72 h of hydrolysis (Fig. 1f–h), whereas, LVV-hemorphin-7 and VV-hemorphin-7 were cleaved by pepsin. Previously [13], we supposed that LVV-hemorphin-7 and VV-hemorphin-7 were intermediate peptides, whereas VV-hemorphin-4 was a final peptide. This hypothesis is confirmed by a direct coupling of RP-HPLC and ESI–MS. These results also show that the concentration of VV-hemorphin-7 decreases while the concentration of VV-hemorphin-4 increases. So, VV-hemorphin-7 is a precursor of VV-hemorphin-4 and the

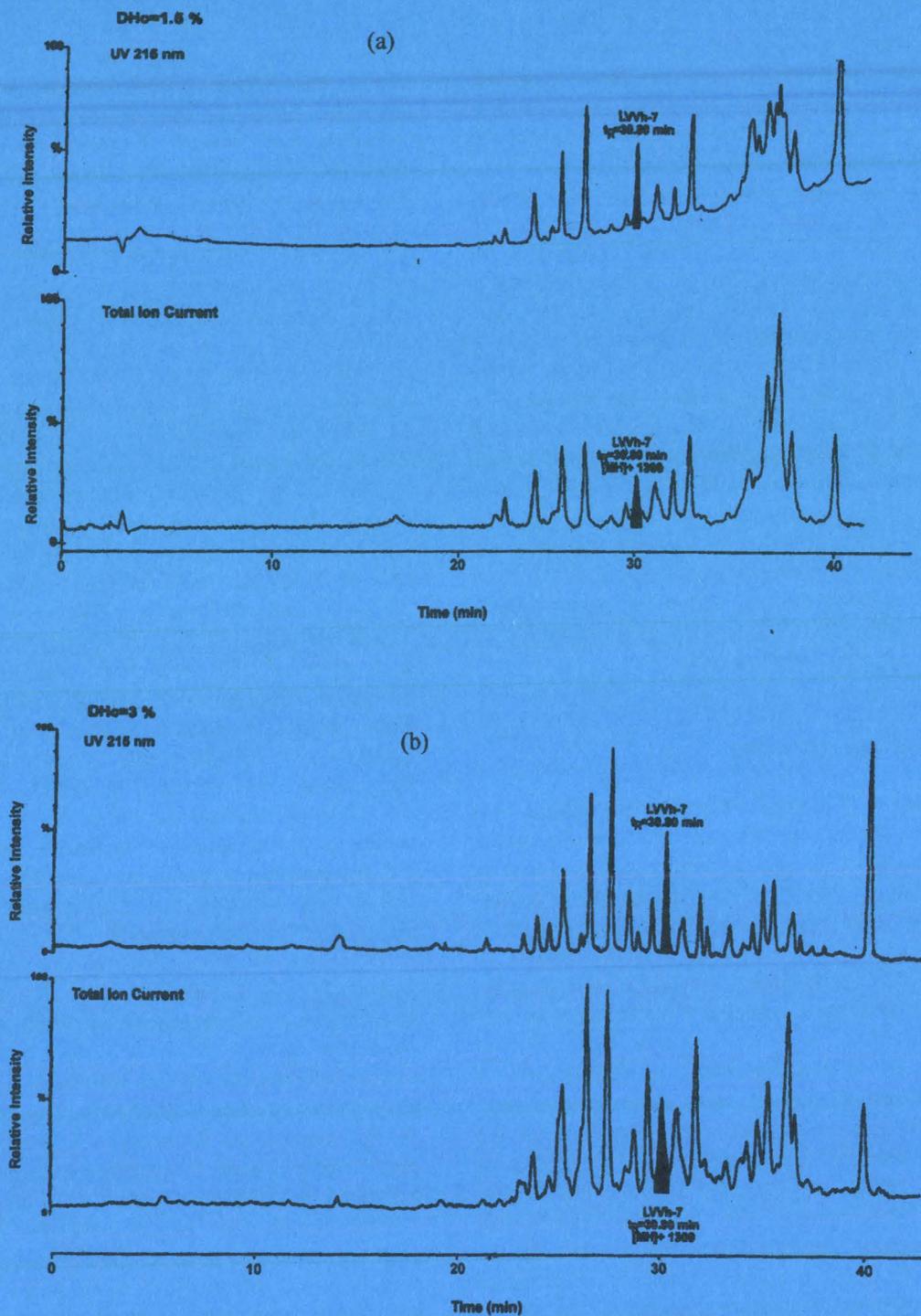


Fig. 1. Kinetics of appearance of hemorphins (Leu-Val-Val-hemorphin-7, Val-Val-hemorphin-7 and Val-Val-hemorphin-4) from bovine hemoglobin peptic hydrolysate at different degrees of hydrolysis (DHc) by a direct coupling RP-HPLC and ESI-MS. The peptic hydrolysate was separated on a Zorbax C<sub>3</sub> column (200×2.1 mm, 5 μm), flow-rate:  $0.170 \cdot 10^{-3} \text{ l min}^{-1}$ , monitoring wavelength: 215 nm, separate mass range TIC (total ion current) profiles at scan ranges from  $m/z$  400 to 1750. (a) DHc = 1.5%, (b) DHc = 3%, (c) DHc = 9%, (d) DHc = 11%, (e) DHc = 15%, (f) DHc = 17%, (g) DHc = 19%, (h) DHc = 21%.

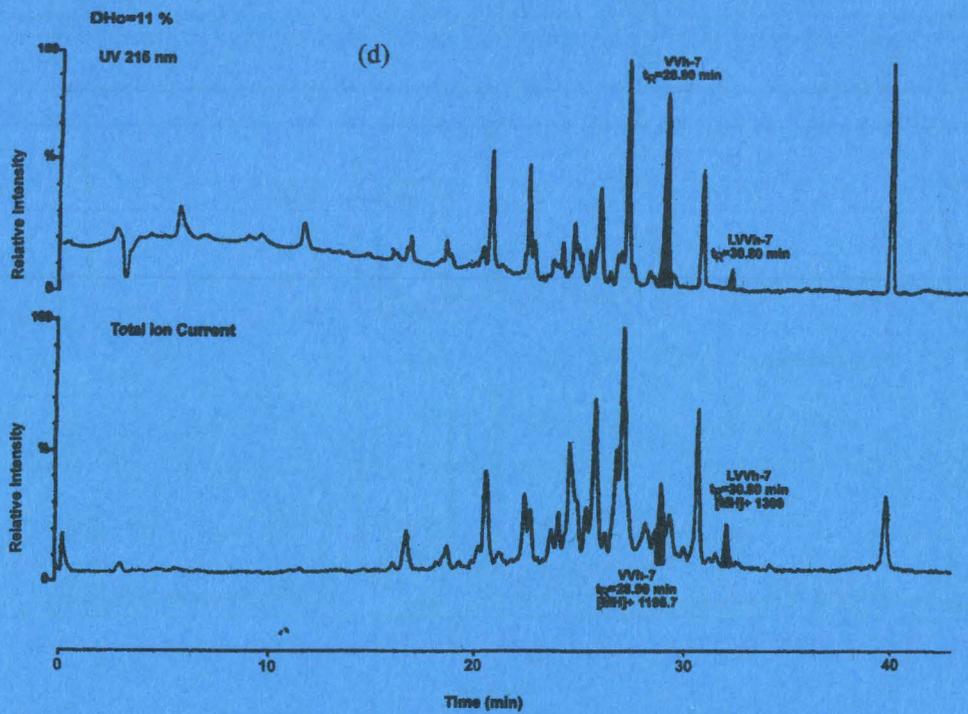
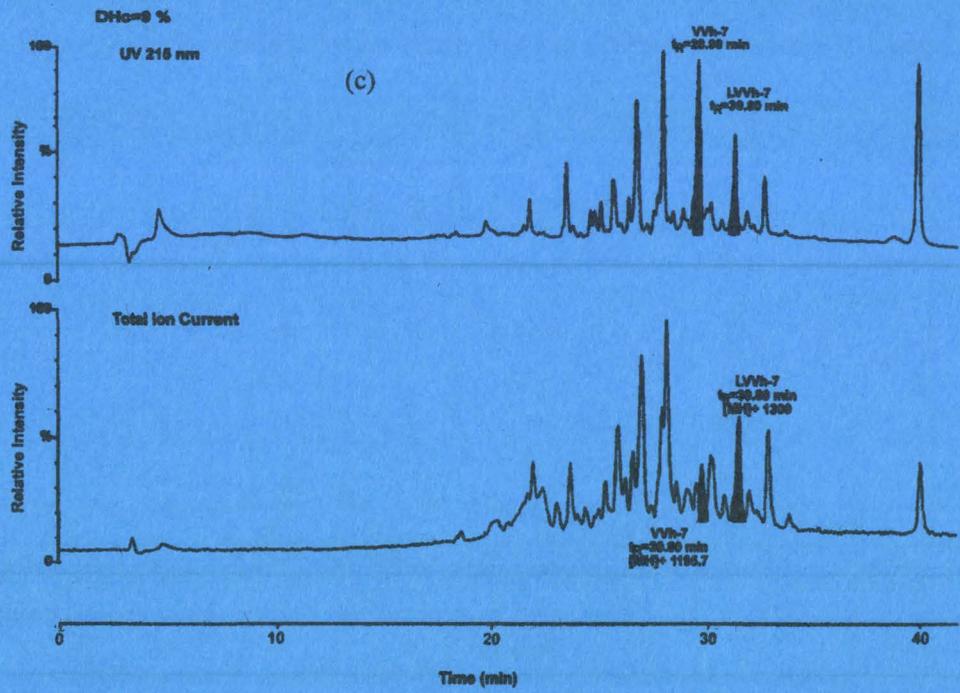


Fig. 1. (continued)

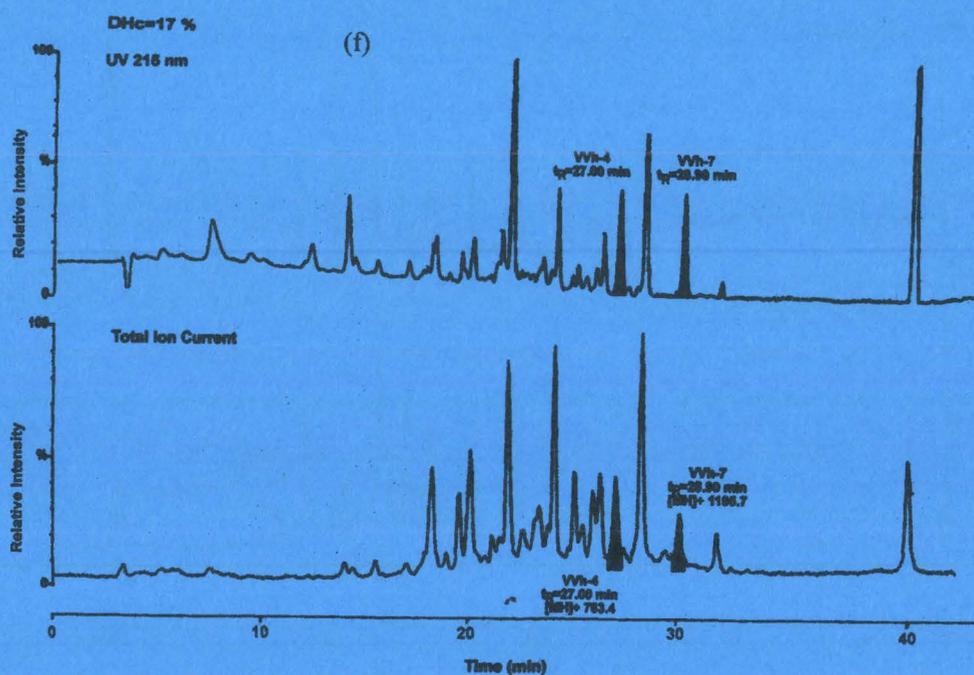
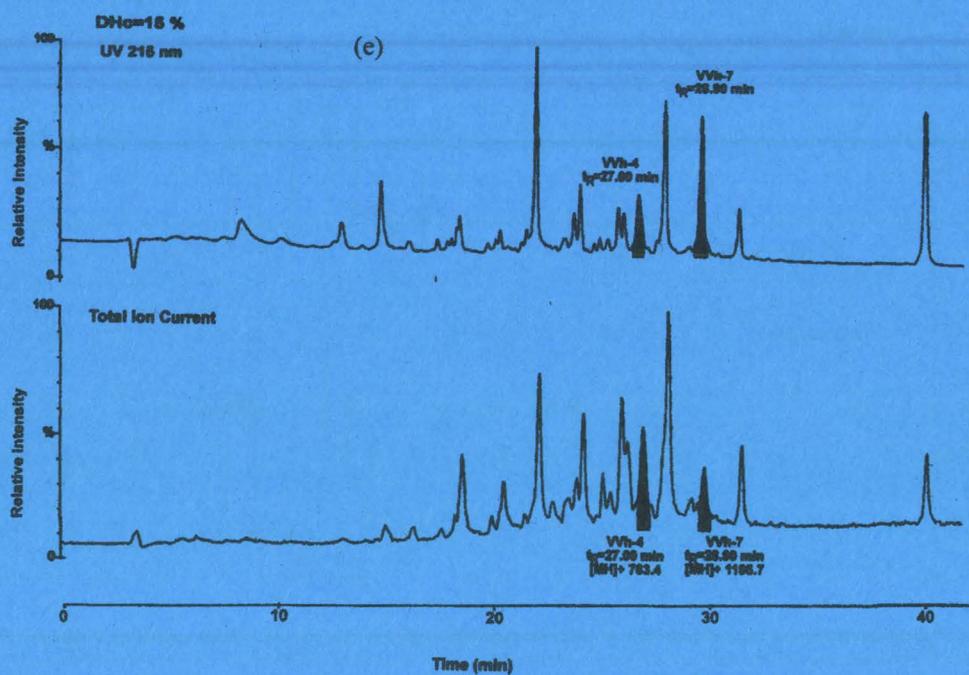


Fig. 1. (continued)

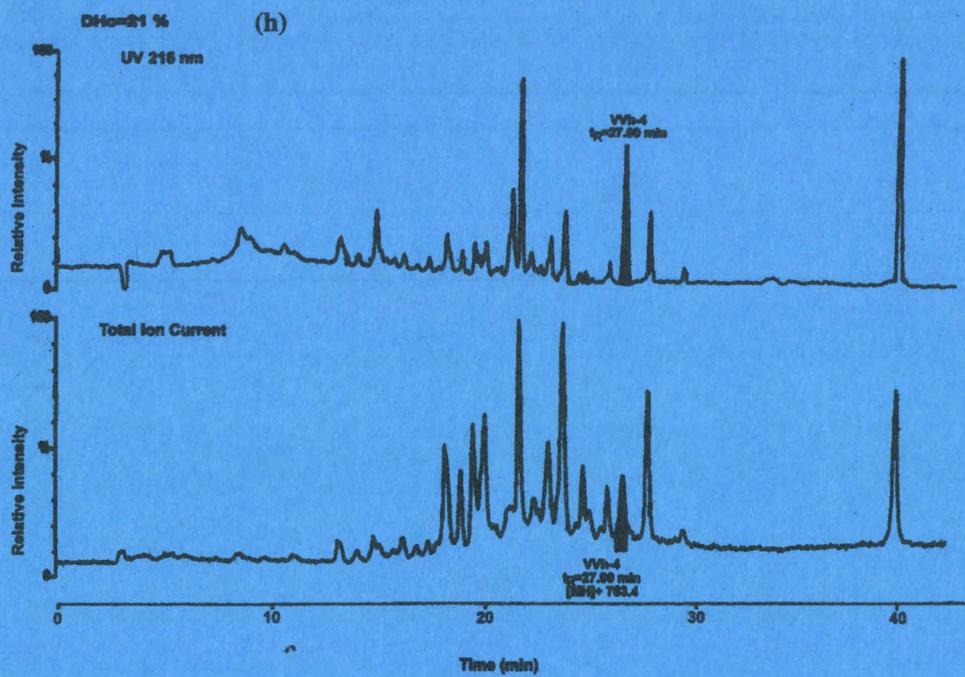
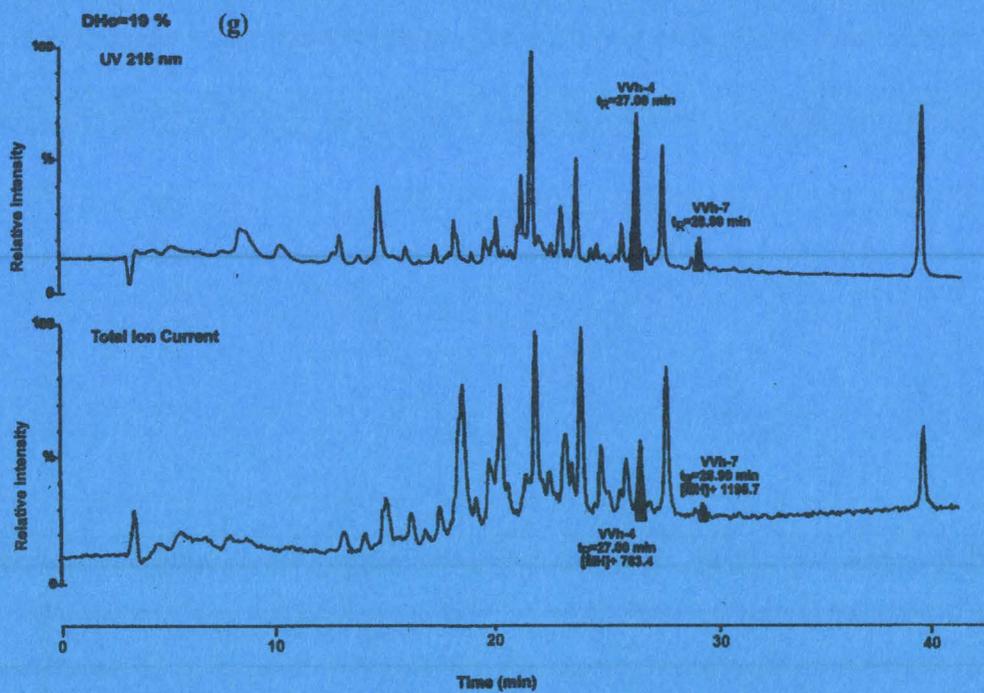


Fig. 1. (continued)

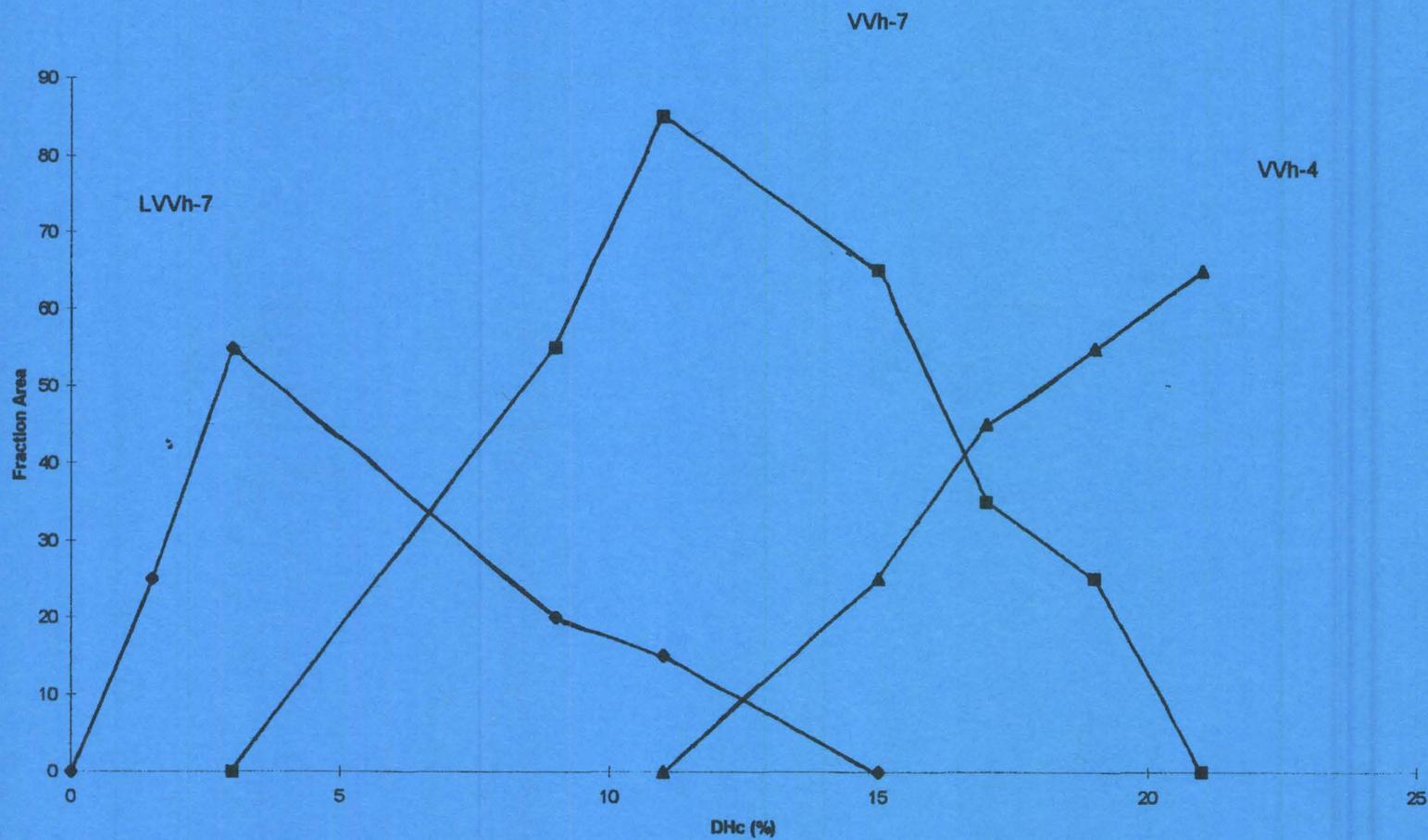


Fig. 2. Comparison of kinetics of appearance of Leu-Val-Val-hemorphin-7, Val-Val-hemorphin-7 and Val-Val-hemorphin-4 as a function of degree of hydrolysis of hemoglobin.

three hemorphins are produced successively during the hydrolysis of the  $\beta$ -chain of bovine hemoglobin by pepsin at pH 4.5: LVV-hemorphin-7 is a precursor of VV-hemorphin-7 which is a precursor of VV-hemorphin-4. Zhao et al. [11] showed that LVV-hemorphin-7 and VV-hemorphin-7 are precursors of LVV-hemorphin-5  $\beta$ (31–38) and VV-hemorphin-5  $\beta$ (32–38) at pH 2, however they did not detect the formation of VV-hemorphin-4. In our case, we have observed the generation of VV-hemorphin-4 but not the formation of LVV-hemorphin-5 and VV-hemorphin-5 at pH 4.5. These results evidence that the selectivity of the hemoglobin peptic hydrolysis is different at pH 4.5 and pH 2.

Optimal conditions for the preparation of LVV-hemorphin-7, VV-hemorphin-7 and VV-hemorphin-4 were determined thanks to the kinetic studies of appearance of these peptides in the course of peptic hydrolyses as a function of the corrected degree of hydrolysis (DHc) of hemoglobin. The appearance of these three hemorphins during the degradation of bovine hemoglobin is resumed in the Fig. 2. We propose a low DHc (3%) to prepare LVV-hemorphin-7, a mean DHc (11%) to prepare VV-hemorphin-7 and a high DHc (21%) to prepare VV-hemorphin-4.

In this study, we developed a rapid technique using a direct coupling of RP-HPLC and ESI-MS for isolation and identification of three hemorphins produced during the hydrolysis of bovine hemoglobin (LVV-hemorphin-7, VV-hemorphin-7 and VV-hemorphin-4). This method is a way to identify these active peptides without a preliminary extraction or disruption step and allows to reduce their time of purification. This technique is a good analytical separation and sensitive detection and can be achieved with mass spectrometric detection. The use of HPLC-MS for the characterization of active peptides can be a very powerful bioanalytical technique. Moreover, the search for known peptides by their molecular mass is a reliable method to guide peptide purification.

## References

- [1] E.L. Glämsta, B. Meyerson, J. Silbering, L. Terenius, F. Nyberg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184 (1992) 1060.
- [2] E.L. Glämsta, A. Marklund, U. Hellman, C. Wernstedt, L. Ternius, F. Nyberg, *Regul. Peptides* 49 (1993) 9.
- [3] E.L. Glämsta, L. Morkrid, I. Lantz, F. Nyberg, *Regul. Peptides* 34 (1991) 1699.
- [4] J. Erchegeyi, A. Kastin, J.E. Zadin, X.D. Qiu, *Int. J. Peptide Protein Res.* 39 (1992) 477.
- [5] A.A. Karlin, M.M. Philippová, E.V. Karelina, V.T. Ivanov, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202 (1994) 410.
- [6] A. Cerpa-Poljak, J. Lahnstein, K.E. Mason, G.A. Smythe, M.W. Duncan, *J. Neurochem.* 68 (1997) 1712.
- [7] A.A. Karlin, M.M. Philippová, E.V. Karelina, B.N. Stizhkov, G.A. Grishina, I.V. Nazimov, V.T. Ivanov, *J. Peptide Sci.* 4 (1994) 211.
- [8] J.R. Slemmon, C.M. Hughes, G.A. Campbell, D.G. Flood, *J. Neurosci.* 14 (1994) 2225.
- [9] V. Brantl, C. Grämsch, F. Lottspeich, R. Mertz, K.H. Jaeger, A. Herz, *Eur. J. Pharmacol.* 125 (1986) 309.
- [10] J.M. Piot, Q.Y. Zhao, D. Guillochon, G. Ricart, D. Thomas, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189 (1992) 101.
- [11] Q.Y. Zhao, F. Sannier, J.M. Piot, *Biochim. Biophys. Acta* 1295 (1996) 73.
- [12] V.T. Ivanov, A.A. Karelina, M.M. Philippová, I.V. Nazimov, V.Z. Pletnev, *Biopolymers* 43 (1997) 171.
- [13] B. Lignot, R. Froidevaux, N. Nedjar-Arroume, D. Guillochon, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, (in press).
- [14] J.M. Piot, D. Guillochon, Q.Y. Zhao, Y. Leroy, G. Ricart, B. Fournet, D. Thomas, *Chromatographia* 27 (1989) 128.
- [15] J.M. Piot, D. Guillochon, Q.Y. Zhao, G. Ricart, B. Fournet, D. Thomas, *J. Chromatogr.* 481 (1989) 221.
- [16] B.A. Bidlingmeyer, S.A. Cohen, T.L. Tarvin, J.R. Napier, W.S. Hancock, *J. Chromatogr.* 336 (1984) 93.
- [17] B. Grego, E. Nice, R. Simpson, *J. Chromatogr.* 352 (1986) 359.
- [18] F. Nyberg, C. Pernow, U. Moberg, R. Eriksson, *J. Chromatogr.* 359 (1986) 541.
- [19] A. Fell, B. Clark, H. Scott, *J. Chromatogr.* 297 (1984) 203.
- [20] D.E.H. Palladino, K.A. Cohen, *J. Chromatogr. Sci.* 29 (1991) 91.
- [21] P. Zavitsanos, P.H. Goetz, in: C.T. Mant, R.S. Hodges (Eds.), *High Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, p. 563.
- [22] J.A. Black, R.S. Hodges, in: C.T. Mant, R.S. Hodges (Eds.), *High Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, p. 553.
- [23] B. Lignot, R. Froidevaux, N. Nedjar-Arroume, D. Guillochon, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29 (1999) 25.
- [24] E.D. Lee, J.D. Henion, T.R. Covey, *J. Microcol. Sep.* 1 (1989) 14.
- [25] W. Schroeder, T. Covey, F. Hucho, *FEBS Lett.* 273 (1990) 31.
- [26] J. Silberring, F. Nyberg, *J. Chromatogr. A* 777 (1997) 41.
- [27] D.S. Jones, W. Heerma, P.D. van Wassenaar, J. Haverkamp, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 5 (1991) 192.
- [28] J.P. Chang, E. Kiehl, A. Kennington, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11 (1997) 1266.
- [29] P.A. D'Agostino, J.R. Hancock, L.R. Provost, P.D. Semchuk, R.S. Hodges, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9 (1995) 597.

- [30] K. Mock, M. Hail, I. Mylchreest, J. Zhou, K. Johnson, I. Jardine, *J. Chromatogr.* 646 (1993) 169.
- [31] E.C. Huang, J.D. Henion, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1 (1990) 158.
- [32] D.F. Hunt, R.A. Henderson, J. Shabanowitz, K. Sakaguchi, H. Michel, N. Sevilir, A.L. Cox, E. Appella, V.H. Engelhard, *Science* 255 (1992) 1261.
- [33] M. Raida, P. Schulz-Knappe, G. Heine, W.G. Forssmann, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10 (1999) 45.
- [34] J. Adler-Nissen, *J. Agric. Food Chem.* 27 (1979) 1256.
- [35] M. Dalgalarondo, E. Dufour, J.M. Chobert, C. Bertrand-Harb, T. Haertlé, *Dairy J.* 5 (1995) 1.
- [36] Q.Y. Zhao, F. Sannier, I. Garreau, C. Lecoeur, J.M. Piot, *J. Chromatogr. A* 723 (1998) 35.

## **CHAPITRE III**

# **ANALYSE QUANTITATIVE : MISE AU POINT D'UNE PROCEDURE DE QUANTIFICATION DES HEMORPHINES**

Les deux chapitres précédents nous ont permis de déterminer avec précision les conditions de préparation de la LVVh-7, de la VVh-7 et de la VVh-4, par l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine à pH 4,5.

Le premier chapitre nous a montré que l'hémoglobine dénaturée par l'urée pouvait générer les trois hémorphines dans des proportions plus intéressantes qu'avec une hémoglobine native.

Le second chapitre nous a révélé, grâce à un couplage de la CLHP en phase inverse avec la SM-IES, que le domaine de production de chaque hémorphine est conservé lorsque la concentration en hémoglobine dénaturée augmente à E/S constant. Ce chapitre nous a également permis de connaître avec précision les conditions d'hydrolyse de l'hémoglobine pour la préparation de la LVVh-7 (DHc de 3 %), de la VVh-7 (DHc de 11 %) et de la VVh-4 (DHc de 21 %).

Nous avons donc entrepris, dans ce troisième chapitre, la préparation de ces trois hémorphines à l'échelle préparative. Cependant il nous fallait vérifier que la séparation des hémorphines à l'échelle analytique était extrapolable à l'échelle préparative. Cela a fait l'objet de la première partie de ce chapitre.

Dans une seconde partie, nous avons mis en place des méthodes d'analyse de la composition en acides aminés aromatiques et de quantification des hémorphines reposant sur l'analyse spectrale en UV. Ces méthodologies s'appuient sur l'utilisation d'un détecteur à barrettes de diodes et sur la construction d'une librairie spectrale contenant les trois hémorphines grâce au logiciel d'exploitation de données Millennium 2010 (société Waters®). Ce système nous a permis d'identifier et de quantifier la LVVh-7, la VVh-7 et la VVh-4 au sein d'hydrolysats pepsiques totaux d'hémoglobine.

### III.1. Séparation des hémorphines à l'échelle préparative.

Nous avons mené l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine à 5 % (p/v) à 23°C dénaturée à l'urée dans un tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 et avec un rapport enzyme / substrat de 1/11 (mol/mol).

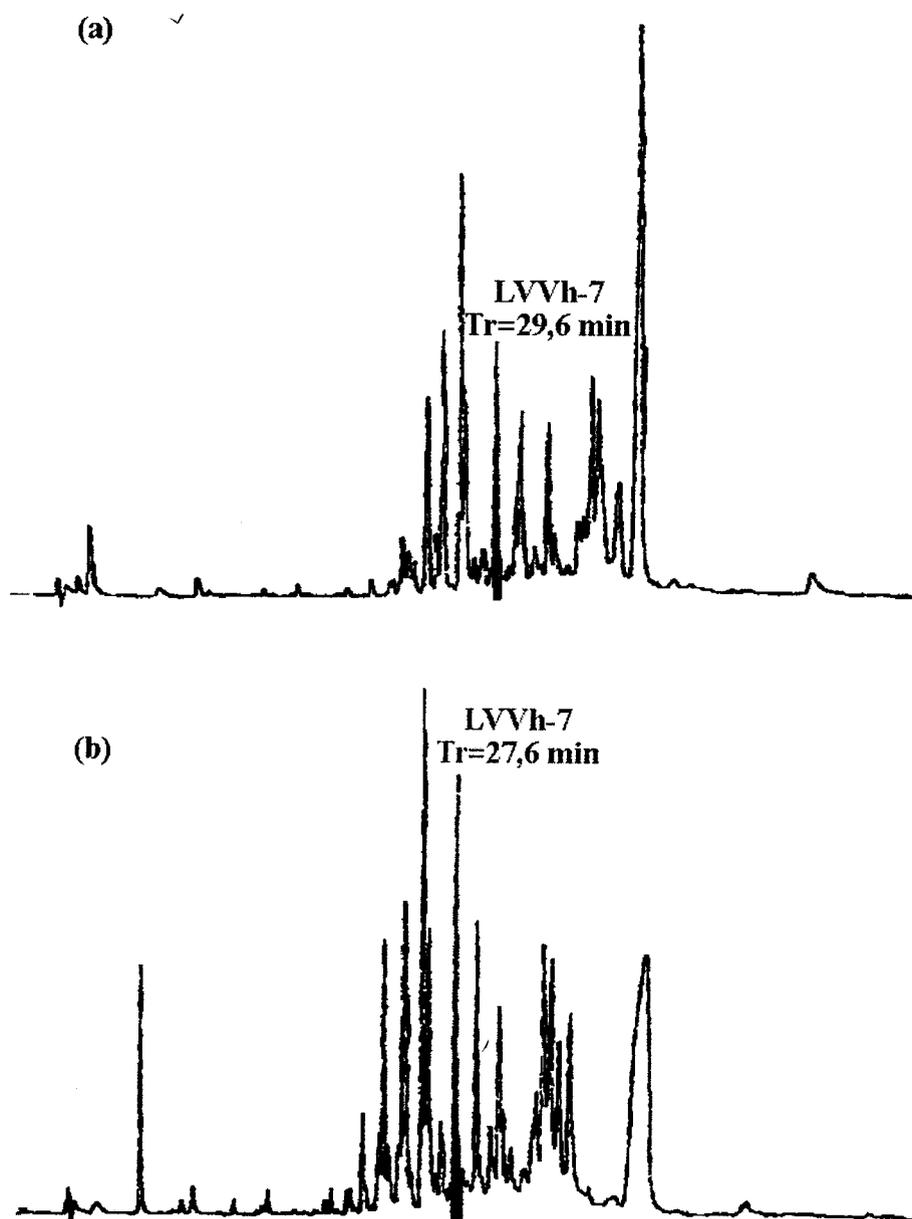
L'arrêt de la réaction enzymatique s'est faite en ajoutant du tétraborate de sodium 0,32 M, afin d'amener le pH final à 10, aux DHc désirés pour la préparation de la LVVh-7 (DHc= 3 %, correspondant à 2,5 minutes d'hydrolyse), de la VVh-7 (DHc= 11 %, qui correspond à 3 heures d'hydrolyse) et de la VVh-4 (DHc= 21 %, correspondant à 72 heures de réaction protéolytique).

Nous avons vérifié que les profils chromatographiques de CLHP en phase inverse analytique et préparative étaient conservés avant de collecter les fractions correspondant aux trois hémorphines. Les fractionnements ont été réalisées sur une colonne de type C4 pour les deux systèmes de CLHP, l'une ayant un diamètre interne de 4,6 mm et un débit de 1 ml/min (colonne analytique), l'autre un diamètre interne de 22 mm et un débit de 15 ml/min (colonne préparative). Les figures 39, 40 et 41 montrent respectivement la comparaison des profils chromatographiques de la CLHP analytique (39a, 40a, 41a) et de la CLHP préparative (39b, 40b, 41b) pour les DHc de 3 % (figure 39), de 11 % (figure 40) et 21 % (figure 41).

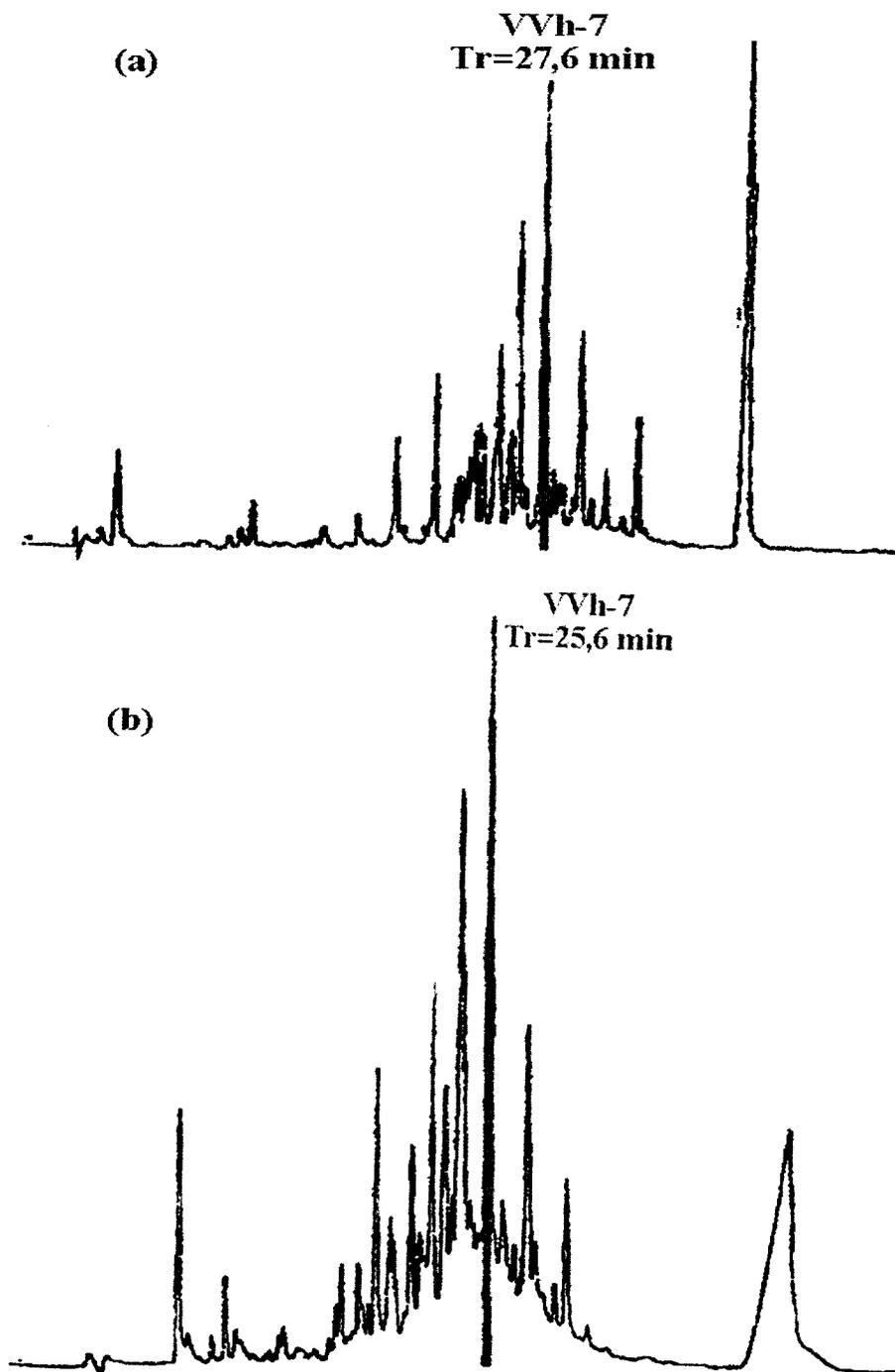
Nous avons constaté que les temps de rétention variaient peu (cas de la comparaison des profils relatifs à la préparation de la LVVh-7 et VVh-7) ou pas du tout (cas de la comparaison des profils relatifs à la préparation de la VVh-4).

Nous avons vérifié l'exactitude des précédentes constatations : la spectrométrie de masse en mode MALDI a été menée sur les fractions correspondant aux temps de rétention 27,6 minutes, 25,6 minutes et 24,5 minutes. Les spectres de masse, présentés sur la figure 42, montrent que chaque fraction contenait une hémorphine à l'état pur. La fraction, élue à 27,6 minutes, correspondait à la LVVh-7, de masse moléculaire protonée 1308 Da. La fraction, dont le temps de rétention était de 25,6 minutes, correspondait à la VVh-7, de masse moléculaire protonée 1195 Da. Enfin, la fraction qui était élue à 24,5 minutes était la VVh-4, de masse moléculaire protonée 764 Da.

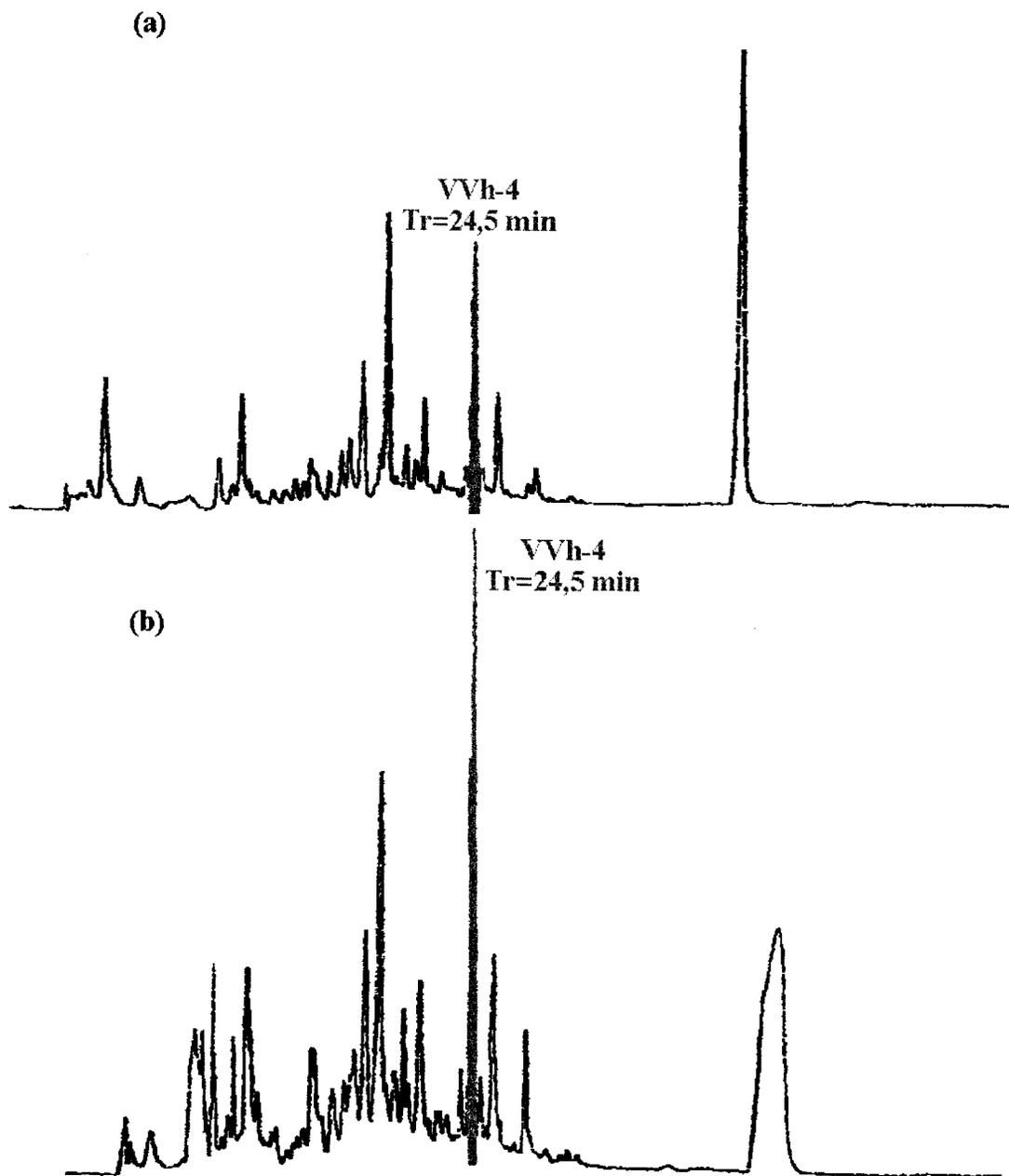
Ces résultats nous montrent qu'il est possible d'extrapoler la séparation des trois hémorphines à l'échelle préparative.



**Figure 39. Profils chromatographiques en phase inverse d'un hydrolysat pepsique d'hémoglobine à 5 % (p/v) dénaturée par l'urée à pH 4,5 pour un DHc de 3 % : (a) colonne CLHP analytique (dépôt 0,1 mg), (b) colonne CLHP préparative (dépôt 25 mg).**



**Figure 40. Profils chromatographiques en phase inverse d'un hydrolysate pepsique d'hémoglobine à 5 % (p/v) dénaturée par l'urée à pH 4,5 pour un DHc de 11 % : (a) colonne CLHP analytique (dépôt 0,1 mg), (b) colonne CLHP préparative (dépôt 25 mg).**



**Figure 41. Profils chromatographiques en phase inverse d'un hydrolysate pepsique d'hémoglobine à 5 % (p/v) dénaturée par l'urée à pH 4,5 pour un DHc de 21 % : (a) colonne CLHP analytique (dépôt 0,1 mg), (b) colonne CLHP préparative (dépôt 25 mg).**

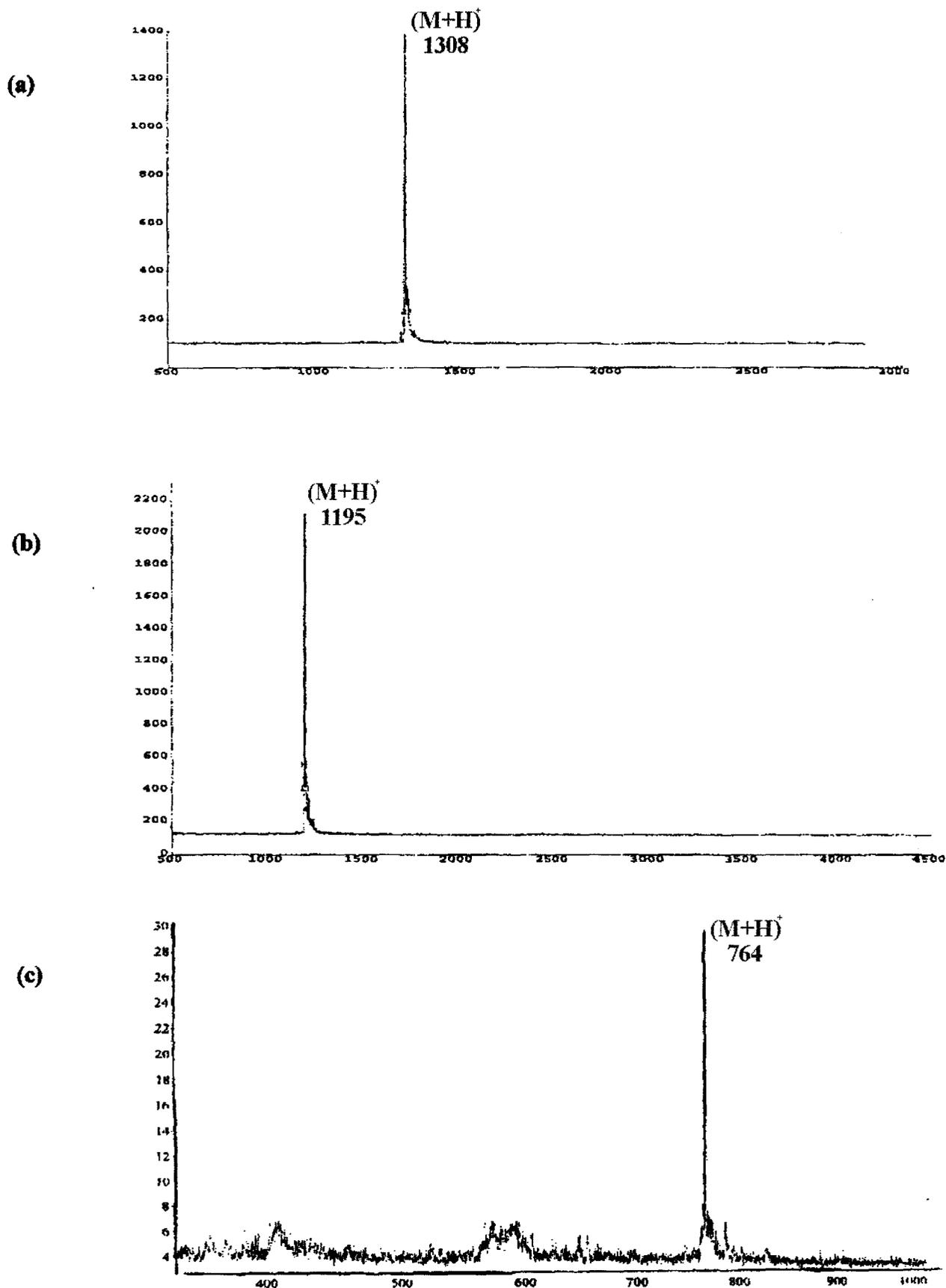


Figure 42. Spectres de masse en désorption laser des fractions contenant la LVV-hémorphine-7 (a), la VV-hémorphine-7 (b) et la VV-hémorphine-4 (c).

## III.2. Analyse spectrale des hémorphines.

### III.2.1. Spectrométrie UV des acides aminés aromatiques.

Le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine sont les seuls acides aminés responsables de l'absorption des protéines et des peptides dans la zone 240-300 nm. La figure 43 présente les spectres UV et leurs dérivées première et seconde pour chaque résidu aromatique.

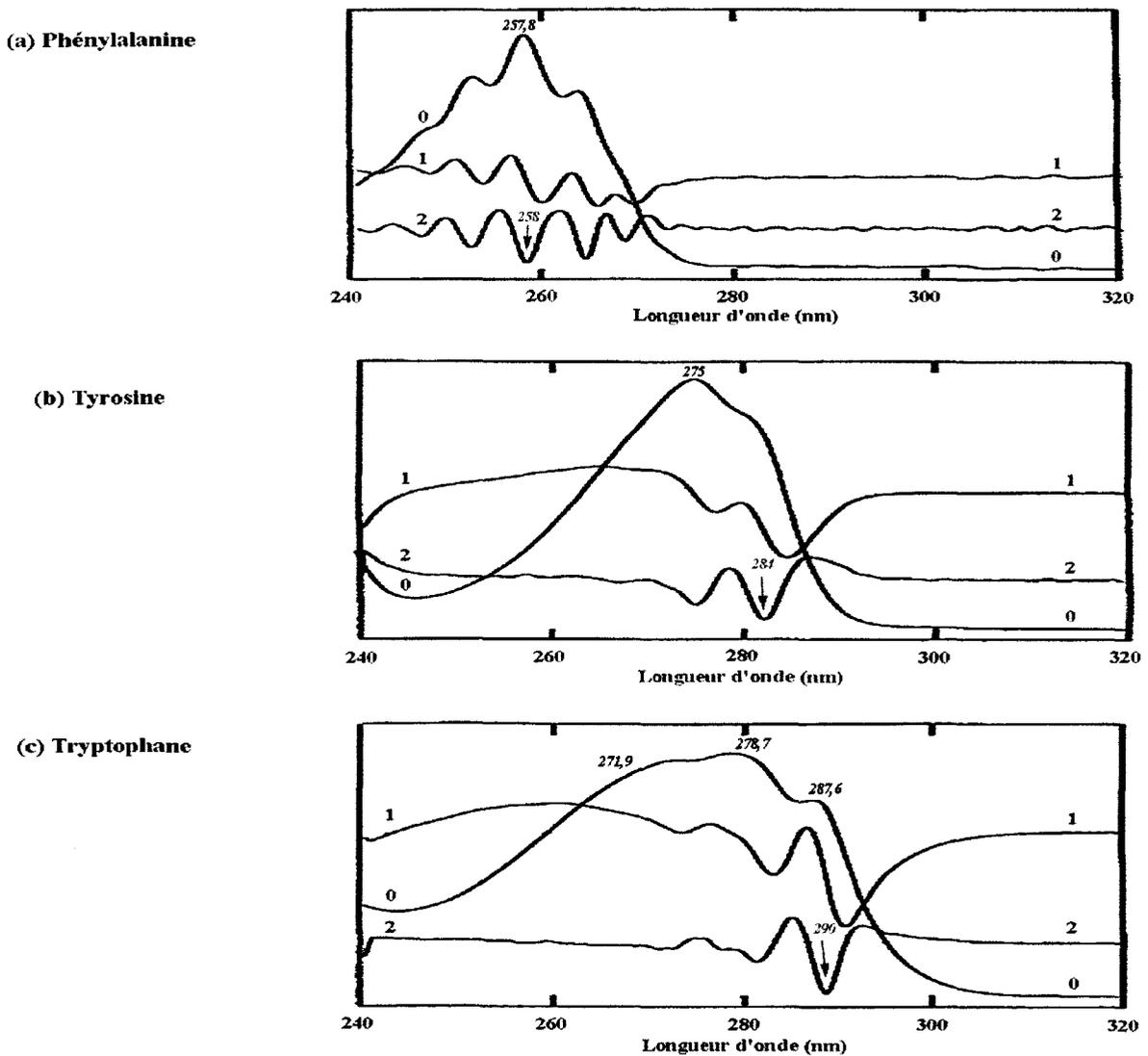


Figure 43. Spectres UV (0), dérivée première (1) du spectre et dérivée seconde (2) du spectre, de la phénylalanine (a), de la tyrosine (b) et du tryptophane (c), entre 240 et 320 nm.

La phénylalanine (figure 43a) se distingue des deux autres par une absorption caractéristique dans la zone 240-275 nm. Son absorption à 280 nm est nulle. Le spectre se caractérise par six pics, dont trois très marqués. Le maximum d'absorption se situe à 257,8 nm.

La bande spectrale de la tyrosine (figure 43b) en UV proche se situe entre 250 et 295 nm avec un maximum d'absorption à 275,0 nm.

Le tryptophane (figure 43c) absorbe également dans cette zone de l'UV proche avec une bande spectrale plus large : entre 250 et 310 nm. Le maximum d'absorption dans cette zone se situe à 278,7 nm. Un second maximum se visualise à 271,9 nm. Mais c'est surtout l'épaulement situé à 287,6 nm qui est caractéristique de cet acide aminé.

Ces comportements spectraux particuliers permettent la différenciation des acides aminés aromatiques uniquement par leur spectre UV.

La spectrométrie dérivée permet d'étudier qualitativement des mélanges de substances présentant des maxima d'absorption proches comme c'est le cas pour les acides aminés aromatiques. La différenciation par le calcul des dérivées n'augmente pas le contenu d'informations du spectre direct, mais elle permet de l'interpréter différemment et de manière plus intéressante (Levillain et Fompeydie, 1986). Elle met plus clairement en évidence les épaulements et les points d'inflexion. Il devient alors plus facile de discerner la présence de chaque acide aminé aromatique dans un mélange.

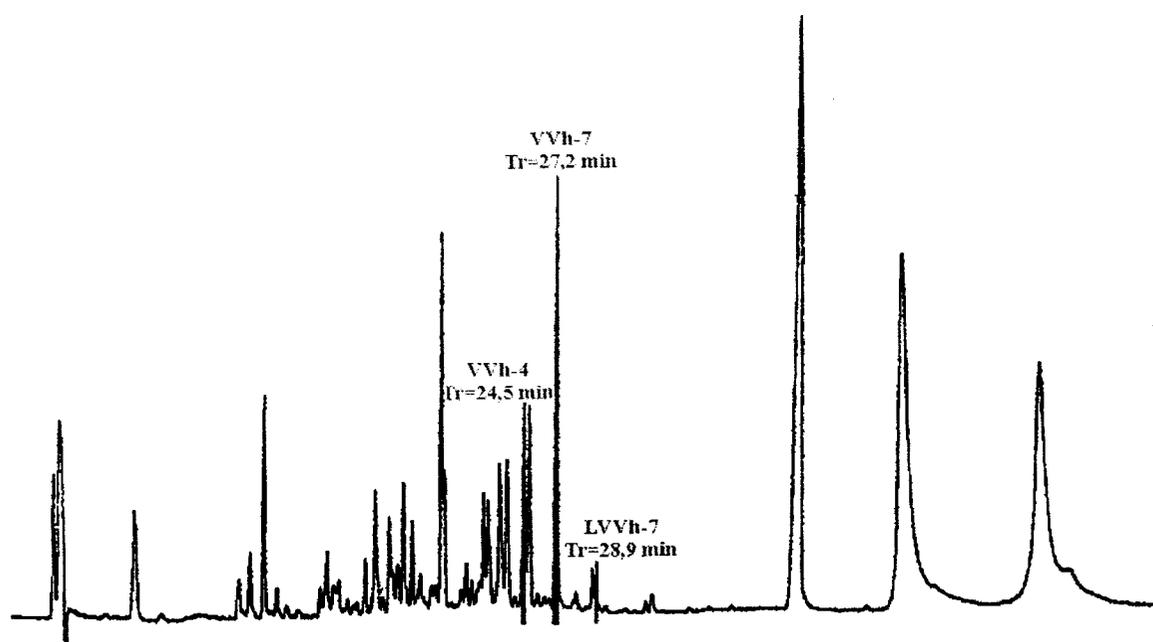
Cette représentation (figure 43), qui montre les dérivées premières et secondes des spectres de chaque résidu aromatique, facilite l'interprétation de ces spectres par l'obtention de données plus rigoureuses que les spectres non dérivés. En effet, la **vallée située à environ 258 nm**, sur le spectre de la dérivée seconde de la *phénylalanine* (figure 43a), permet de caractériser la présence de ce résidu. La présence de la *tyrosine* se caractérise par la **vallée située à environ 284 nm**, visible sur le spectre de la dérivée seconde du résidu aromatique (figure 43b). Enfin, la présence du *tryptophane* se caractérise par la **vallée située à environ 290 nm** sur le spectre de la dérivée seconde (figure 43c).

### III.2.2. Spectrométrie UV des hémorphines.

La LVVh-7 (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe), la VVh-7 (Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe) et la VVh-4 (Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr) comportent dans leur structure peptidique des résidus aromatiques. Nous avons utilisé les caractéristiques spectrales

de ces acides aminés pour retrouver leur présence ou leur absence au sein des trois hémorphines (ou d'un autre peptide).

La figure 44 représente le profil chromatographique de l'hydrolysât pepsique de l'hémoglobine bovine, issu de dix heures d'hydrolyse dans le tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5. La LVVh-7 est éluée avec un temps de rétention de 28,9 minutes, la VVh-7 avec un temps de rétention de 27,2 minutes et la VVh-4 avec un temps de rétention de 24,5 minutes.

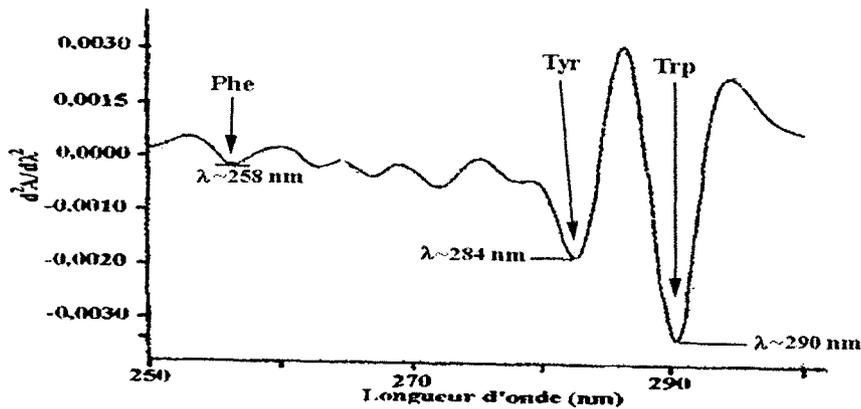


**Figure 44. Profil chromatographique de l'hydrolysât pepsique d'hémoglobine obtenu après 10 heures d'hydrolyse dans le tampon acétate de sodium (0,1 M, 23°C, E/S=1/11 mol/mol).**

Chaque peptide opioïde a été analysé à partir de la dérivée seconde de son spectre, de façon à identifier la présence des résidus aromatiques (voir la figure 45).

La dérivée seconde des spectres de la LVVh-7 (figure 45a) et de la VVh-7 (figure 45b) permettent de mettre en évidence la présence des trois résidus aromatiques. La vallée située à 290 nm caractérise la présence du tryptophane dans les deux hémorphines. La tyrosine est également présente dans les deux peptides opioïdes et se caractérise par la vallée située à 284 nm. Enfin, le résidu phénylalanine est caractérisé par la vallée située à 258 nm sur la dérivée seconde du spectre de chaque hémorphine. Les structures primaires des deux hémorphines permettent de vérifier la présence des trois résidus aromatiques.

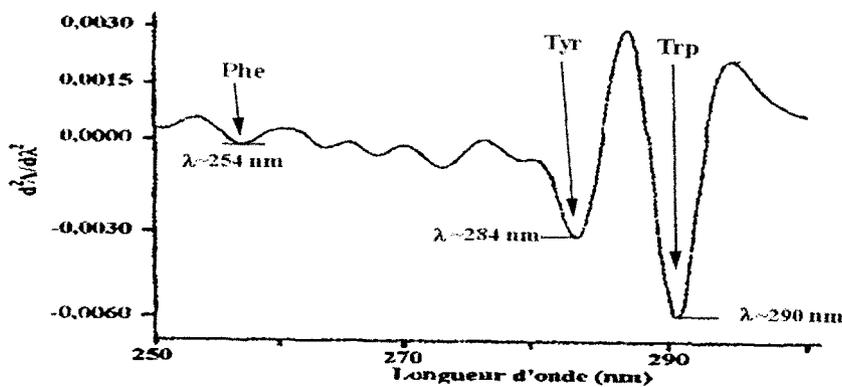
En ce qui concerne l'analyse de la dérivée seconde du spectre de la VVh-4 (figure 45c), nous observons la présence des deux résidus aromatiques tryptophane (vallée à 290 nm) et tyrosine (vallée à 284 nm), tandis que la vallée à 258 nm, caractéristique du résidu phénylalanine, n'est pas observée. La structure primaire de la VVh-4 permet de confirmer l'absence de la phénylalanine.



(c) LVV-hémorphine-7

(Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe)

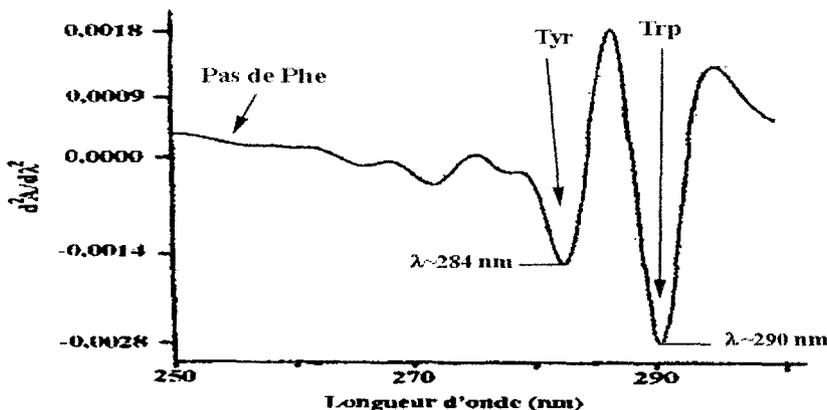
- présence Trp
- présence Tyr
- présence Phe



(a) VV-hémorphine-7

(Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe)

- présence Trp
- présence Tyr
- présence Phe



(b) VV-hémorphine-4

(Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr)

- présence Trp
- présence Tyr
- absence Phe

Figure 45. Mise en évidence de la présence ou de l'absence de chaque résidu aromatique à partir de la dérivée seconde des spectres UV dans la LVV-hémorphine-7 (a), la VV-hémorphine-7 (b) et la VV-hémorphine-4 (c).

### III.2.3. Détermination de la proportion d'acides aminés aromatiques dans les hémorphines.

Nous avons montré qu'à partir de la dérivée seconde des spectres, il était possible de mettre en évidence la présence ou l'absence du tryptophane, de la tyrosine et de la phénylalanine dans les trois hémorphines (ou d'autres peptides). Cependant cette analyse spectrale ne nous permet pas de déterminer dans quelle proportion les résidus aromatiques sont présents dans chaque peptide.

Miclo et coll. (1995) ont développé une méthodologie permettant de quantifier les rapports des résidus aromatiques, à partir des dérivées premières et secondes de leurs spectres UV, au sein de protéines et de peptides. Nous avons utilisé cette procédure dans le cas de la LVVh-7, de la VVh-7 et de la VVh-4.

Les figures 46, 47 et 48 montrent les procédures à appliquer pour déterminer les rapports tyrosine / tryptophane, tyrosine / phénylalanine et tryptophane / phénylalanine, dans la LVVh-7 (figure 46), la VVh-7 (figure 47) et la VVh-4 (figure 48).

Le rapport Tyr / Trp est calculé grâce à la dérivée première du spectre de chaque hémorphine, et de la relation établie par Miclo et coll. (1995) :

$$\log(B1/A1)=1,097 \times \log(\text{Tyr}/\text{Trp})-0,542$$

où B1 désigne la différence de la valeur  $dA/d\lambda$  des vallées à 284 et 290 nm et A1 désigne la valeur du minimum de la vallée située environs à 284 nm. Ces deux valeurs A1 et B1 caractérisent en fait la proportion de tyrosine (A1) et de tryptophane (B1) dans le peptide opioïde. L'application de cette relation permet de déterminer la présence des deux acides aminés tryptophane et tyrosine en proportion 1/1 (mol/mol) dans 1 mole de LVVh-7 (figure 46a), dans 1 mole de VVh-7 (figure 47a) et dans 1 mole de VVh-4 (figure 48a).

Le rapport Tyr / Phe est calculé grâce au spectre de la dérivée seconde de chaque hémorphine, et de la relation établie par Miclo et coll. (1995) :

$$\log(B2/A2)=0,953 \times \log(\text{Tyr}/\text{Phe})+0,321$$

où B2 désigne la différence de la valeur  $d^2A/d\lambda^2$  entre la vallée située à 284 nm et le pic à environ 279 nm et A2 désigne la différence de la valeur  $d^2A/d\lambda^2$  de la vallée à 258 nm et du

pic à environ 255nm. Ces deux différences caractérisent la proportion de tyrosine (B2) et de phénylalanine (A2) dans le peptide opioïde. L'application de cette relation nous permet de calculer la proportion des deux résidus aromatiques dans la LVVh-7 (figure 46b) et VVh-7 (figure 47b) : un rapport Tyr/Phe de 1/1 (mol/mol) dans 1 mole de LVVh-7 et dans 1 mole de VVh-7. Par contre, l'absence du résidu phénylalanine dans la VVh-4 (figure 48b) est caractérisée par l'absence de la série d'amplitudes dans la région de longueurs d'ondes 250-270 nm et donc par une valeur A3 nulle.

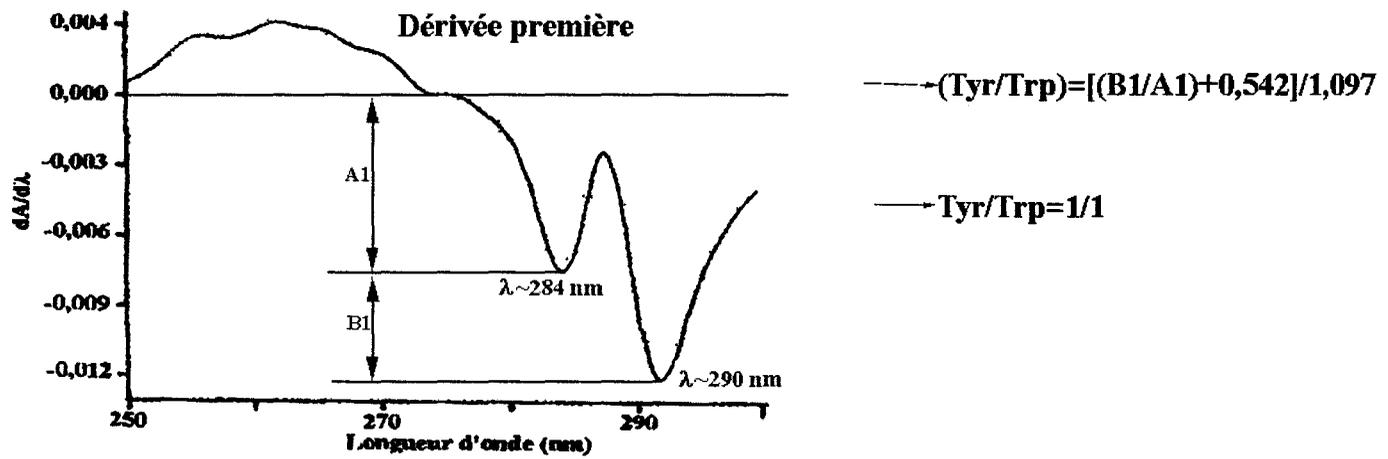
Le rapport entre les résidus tryptophane et phénylalanine est calculé à partir de la dérivée seconde du spectre UV de l'hémorphine et par la relation établie par Miclo et coll. (1995) :

$$\log(B3/A3)=0,891 \times \log(\text{Trp/Phe})+1,031$$

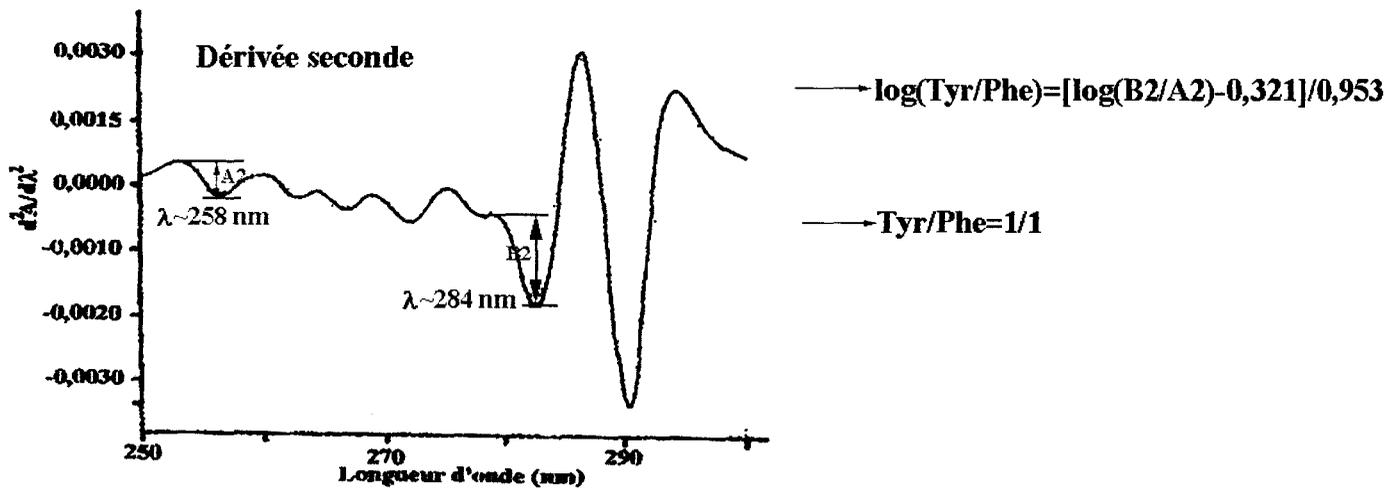
où B3 désigne la différence de la valeur  $d^2A/d\lambda^2$  du pic à 293 nm et de la vallée à 290 nm et A3 désigne la différence de la valeur  $d^2A/d\lambda^2$  du pic à 254 nm et de la vallée à 258 nm. Ces deux différences caractérisent en fait la proportion de tryptophane (B3) et de phénylalanine (A3) dans le peptide opioïde. L'application de cette relation nous permet de calculer la proportion des deux acides aminés aromatiques dans la LVVh-7 (figure 46c) et VVh-7 (figure 47c) : 1 mole de LVVh-7 et VVh-7 donne chacune un rapport Trp/Phe de 1/1 (mol/mol). Par contre, la VVh-4 ne contenant pas de résidu phénylalanine, nous constatons l'absence d'amplitudes entre 250 et 270 nm ce qui engendre une valeur A2 nulle.

Nous pouvons donc vérifier qu'une mole de LVVh-7 et une mole de VVh-7 contiennent chacune une mole de chaque résidu tyrosine, tryptophane et phénylalanine, et qu'une mole de VVh-4 contient la tyrosine et le tryptophane en quantité équimolaire (1 mole) mais ne contient pas de phénylalanine.

(a) Détermination du rapport tyrosine/tryptophane dans la LVVh-7



(b) Détermination du rapport tyrosine/phénylalanine dans la LVVh-7



(c) Détermination du rapport tryptophane/phénylalanine dans la LVVh-7

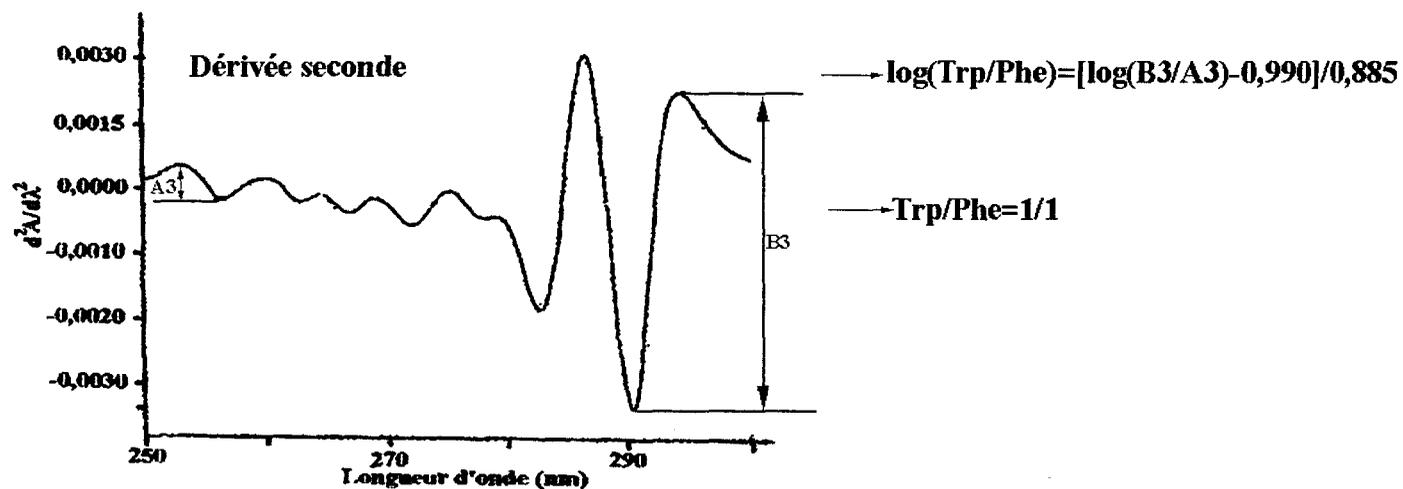
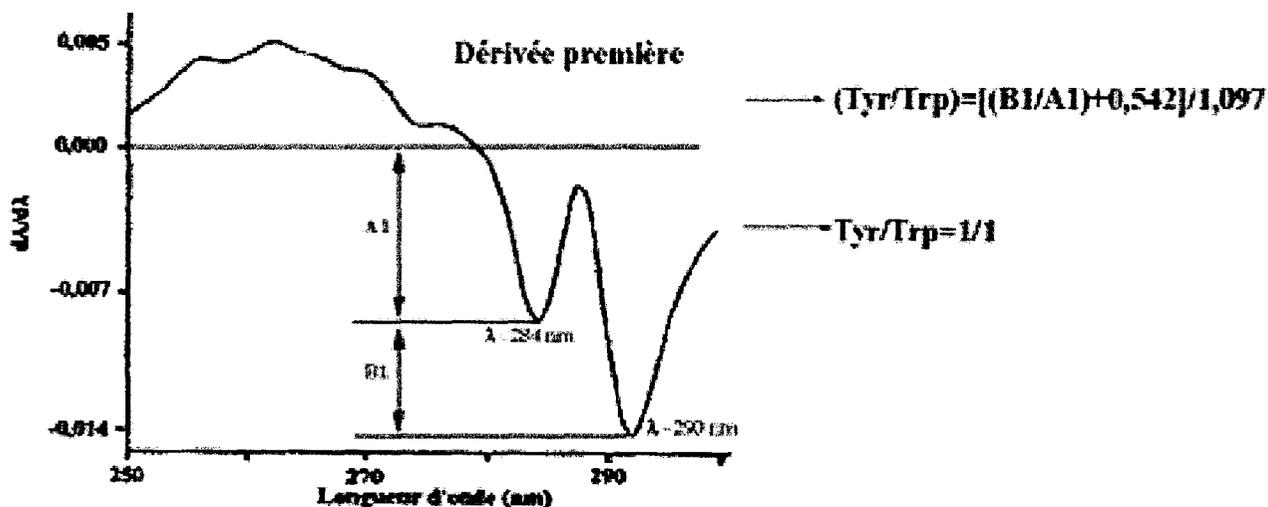
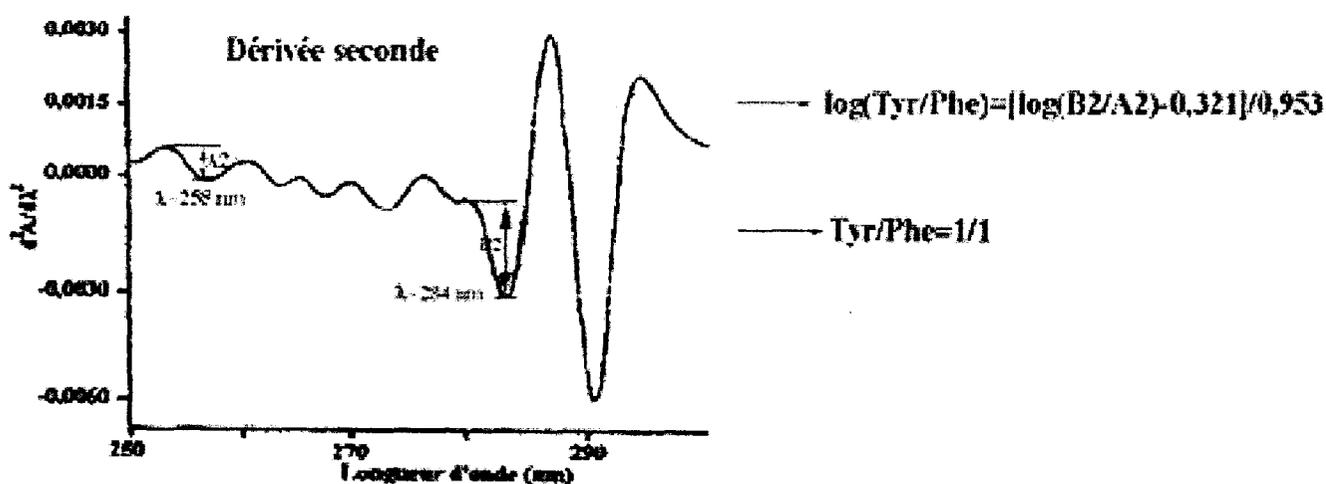


Figure 46. Procédure à appliquer pour la mesure des rapports des résidus aromatiques dans la LVV-hémorphine-7 à partir de la dérivée première et seconde de son spectre UV (structure primaire : Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe).

(a) Détermination du rapport tyrosine/tryptophane dans la VVh-7



(b) Détermination du rapport tyrosine/phénylalanine dans la VVh-7



(c) Détermination du rapport tryptophane/phénylalanine dans la VVh-7

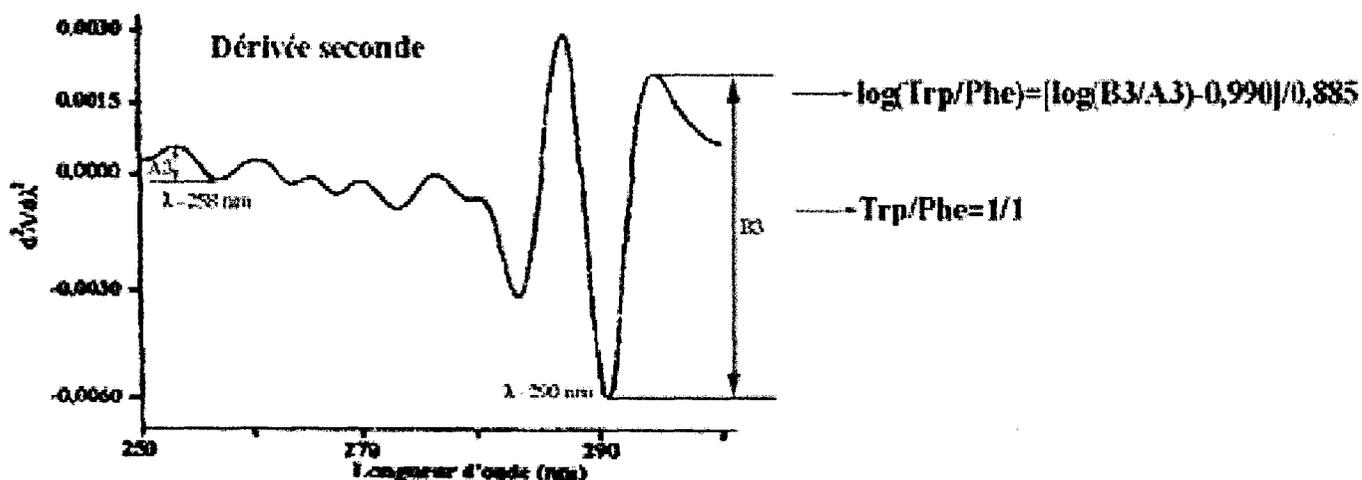
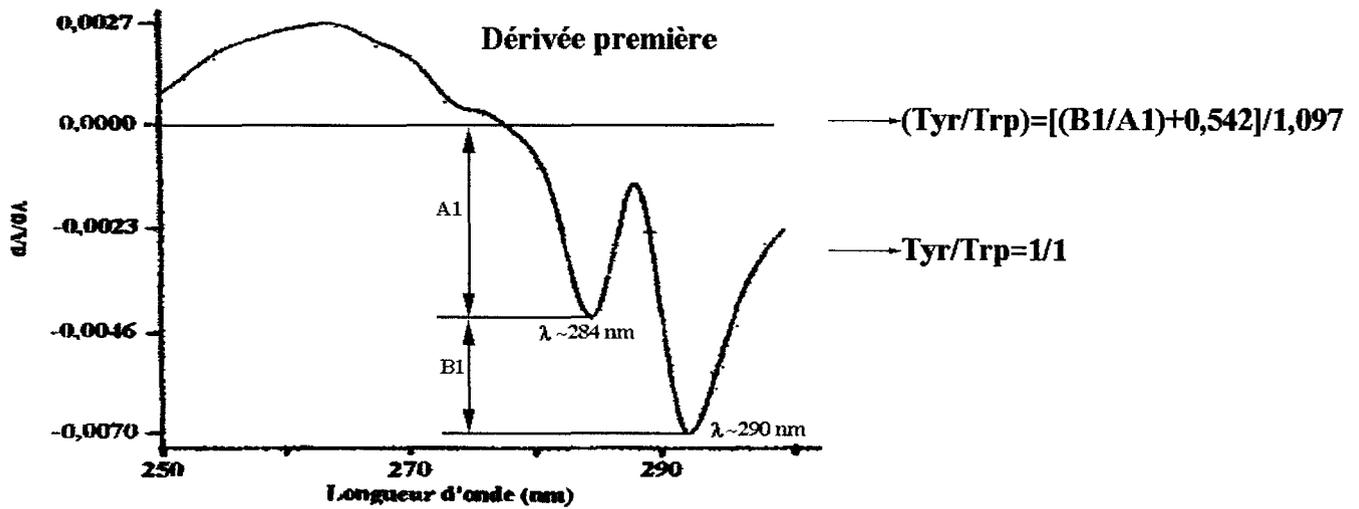
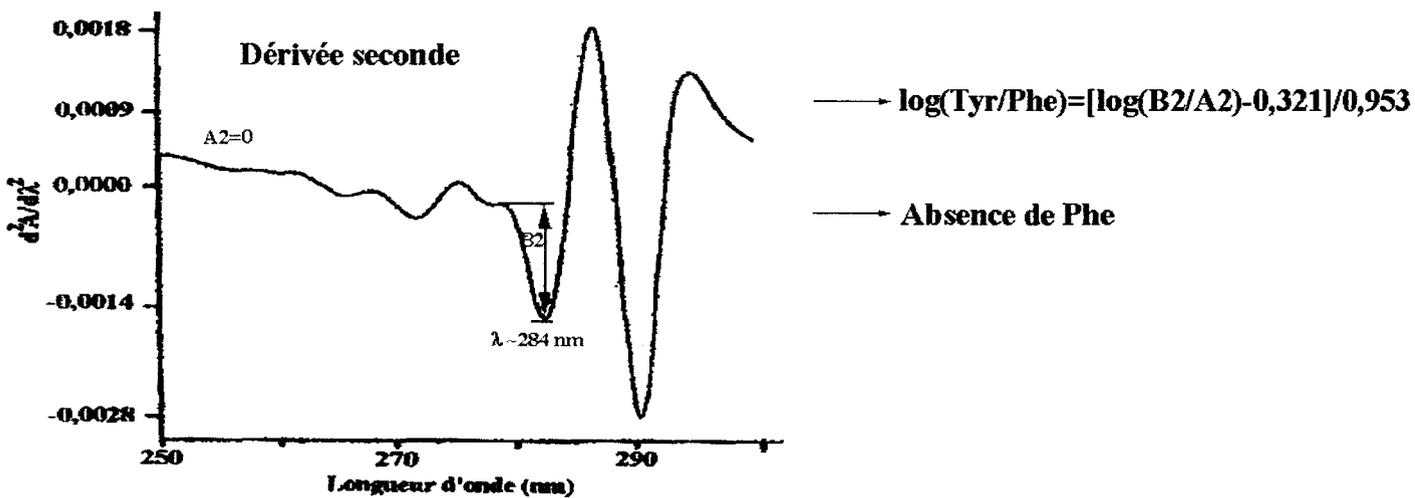


Figure 47. Procédure à appliquer pour la mesure des rapports des résidus aromatiques dans la VV-hémorphine-7 à partir de la dérivée première et seconde de son spectre UV (structure primaire : Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe).

(a) Détermination du rapport tyrosine/tryptophane dans la VVh-4



(b) Détermination du rapport tyrosine/phénylalanine dans la VVh-4



(c) Détermination du rapport tryptophane/phénylalanine dans la VVh-4

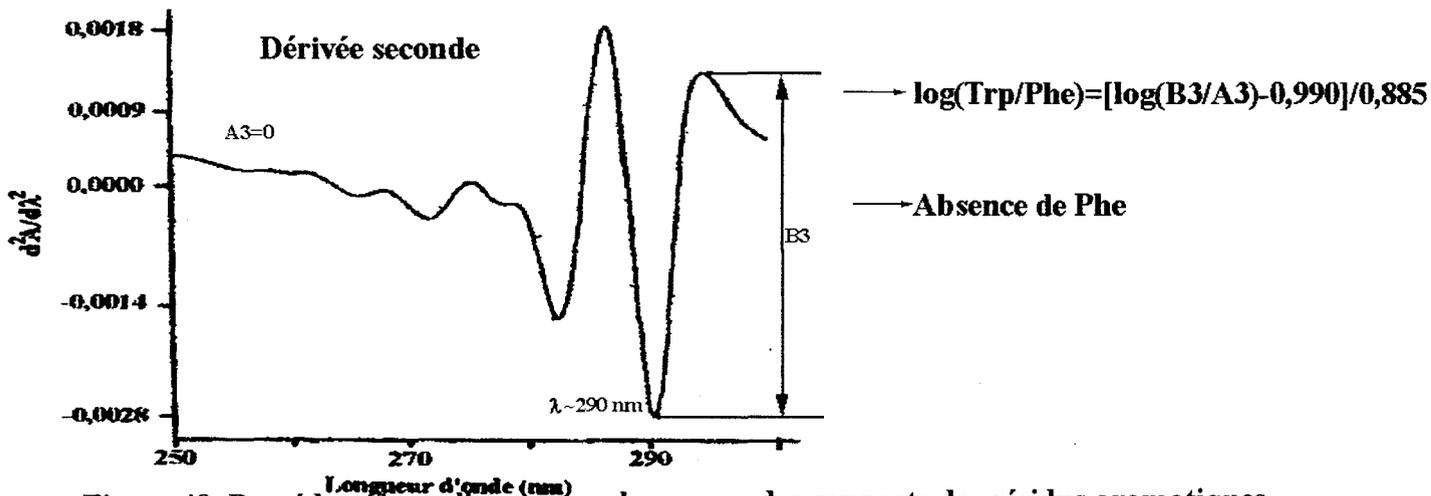


Figure 48. Procédure à appliquer pour la mesure des rapports des résidus aromatiques dans la VV-hémorphine-4 à partir de la dérivée première et seconde de son spectre UV (structure primaire : Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr).

### III.3. Analyse quantitative des hémorphines.

#### *Construction d'une librairie spectrale des hémorphines.*

Différentes quantités de la LVVh-7 (2,6 à 20,8 µg), de la VVh-7 (2,9 à 11,5 µg) et de la VVh-4 (2,6 à 10,4 µg), toutes trois purifiées, ont été déposées sur la colonne CLHP en phase inverse analytique de type C4. Nous avons déterminé l'aire de chaque pic, grâce à un système d'intégration prédéfinie dans le logiciel, en fonction de la quantité déposée sur la colonne. La figure 49 montre les droites de calibration correspondantes pour chaque hémorphine ((a) LVVh-7, (b) VVh-7 et (c) VVh-4). Les coefficients de régression de chaque droite étalon ( $r=1,000$  pour le calibration de la LVVh-7,  $0,999$  pour le calibration de la VVh-7 et  $0,998$  pour le calibration de la VVh-4) indiquent une bonne corrélation linéaire sur la gamme de concentrations étudiée entre les quantités de chaque hémorphine et des aires relatives correspondantes.

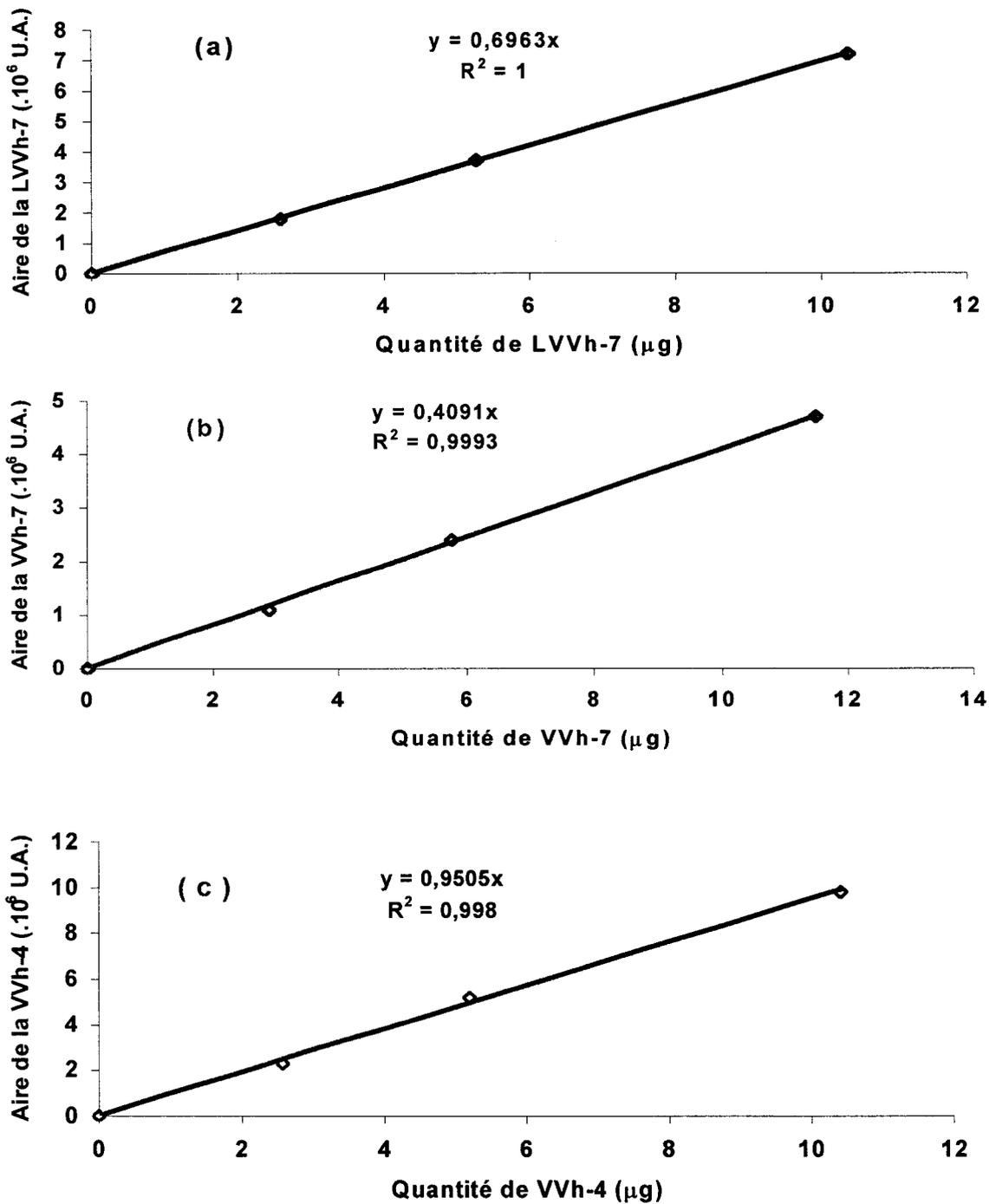


Figure 49. Evolution de l'aire du pic correspondant à la LVV-hémorphine-7 (a), à la VV-hémorphine-7 (b) et à la VV-hémorphine-4 (c) en fonction des quantités déposées sur la colonne CLHP en phase inverse analytique de type C4.

Lorsque nous devons identifier un peptide inconnu comme étant une des trois hémorphines, la comparaison et l'analyse mathématique des différences entre les spectres UV de l'hémorphine identifiée dans l'hydrolysate et de son semblable dans la librairie spectrale sont exprimées quantitativement par deux paramètres :

- l'angle de mesure (AM) de cette différence spectrale (ou encore "Match Angle" MA), qui peut être compris entre 0 et 90 degrés. Une faible valeur indique que les spectres comparés sont identiques;

- l'angle du seuil (AS) de mesure de cette différence spectrale (ou "Match Threshold" MT), qui rend compte de la sensibilité de la mesure et qui peut être compris entre 0 et 180 degrés. Une valeur élevée indique une faible sensibilité.

Ces valeurs AM et AS caractérisent le degré d'homogénéité entre ces différences spectrales, et les valeurs admises et acceptables ne doivent pas être supérieures à 5 degrés. En général, si  $AM > AS$ , cela indique que les deux spectres étudiés sont différents, et inversement si  $AM < AS$ , les deux spectres sont similaires et le peptide analysé dans l'hydrolysate peptidique correspond bien à l'hémorphine de notre librairie spectrale identifiée par le logiciel.

Après avoir mis en place la procédure d'identification et de quantification des trois hémorphines dans la librairie spectrale, il nous était possible de déterminer le degré d'homogénéité d'une de ces trois hémorphines présente dans notre librairie spectrale avec un peptide inconnu contenu dans un hydrolysate peptidique quelconque d'hémoglobine bovine. La détermination du degré d'homogénéité est indispensable avant d'entreprendre de quantifier l'hémorphine dans l'hydrolysate, car il nous permet de vérifier la pureté de la fraction analysée.

### **III.4. Identification et dosage des hémorphines dans un hydrolysate d'hémoglobine.**

Nous avons appliqué les procédures d'identification et de quantification de la LVVh-7, de la VVh-7 et de la VVh-4 au sein d'hydrolysats pepsiques d'hémoglobine bovine à 5 % (p/v) dénaturée par l'urée, avec un degré d'hydrolyse corrigé respectif de 3 %, 11 % et 21 % dans le tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5. Ces conditions correspondent à l'optimum de production de chaque hémorphine identifiée grâce au couplage CLHP-SM décrit dans le chapitre II.

La figure 50 montre les profils chromatographiques de l'hydrolysate à 3 % (figure 50a), 11 % (figure 50b) et 21 % (figure 50c) de degré d'hydrolyse.

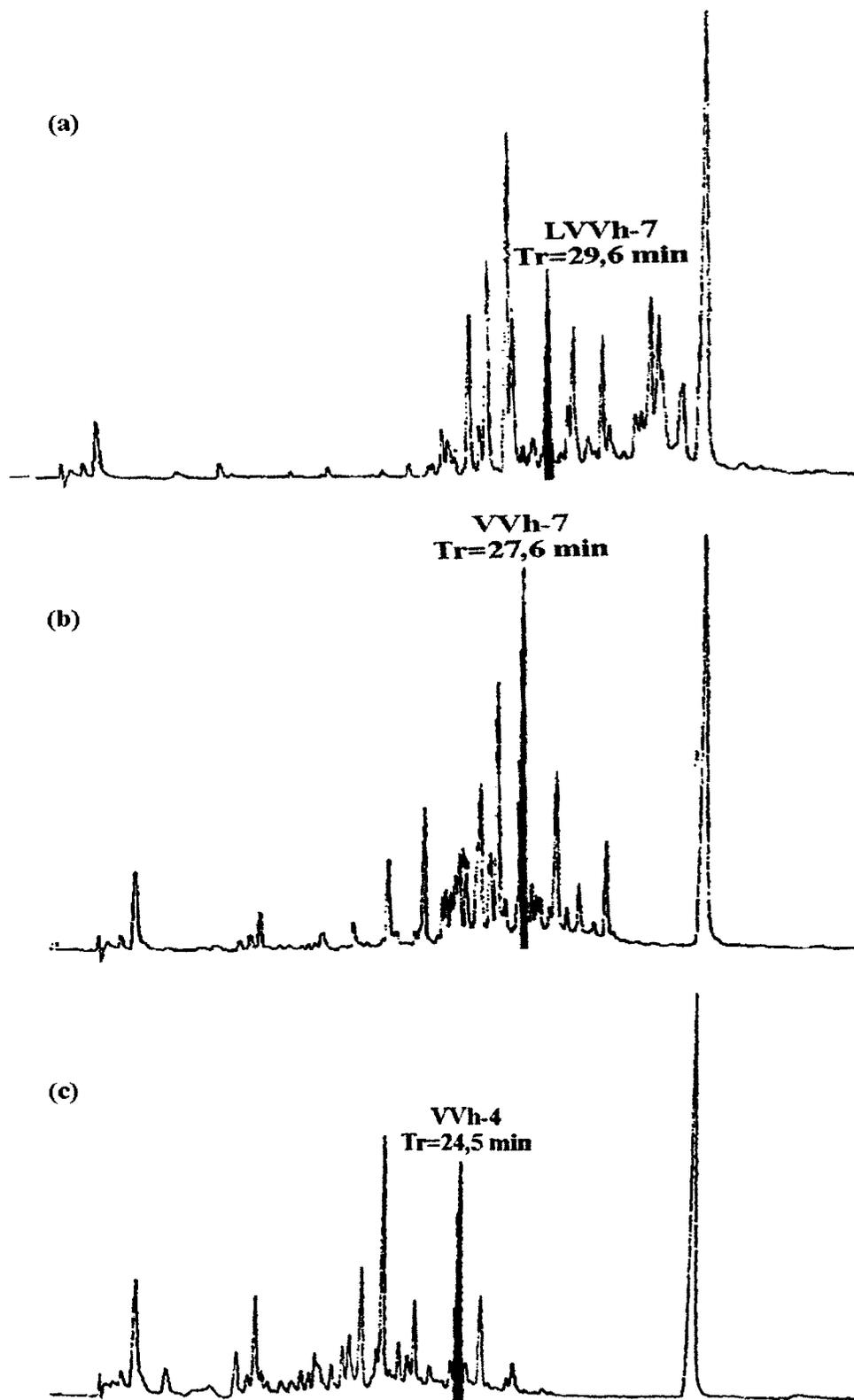


Figure 50. Profils chromatographiques de l'hydrolysate pepsique d'hémoglobine à 5 % (p/v) dénaturée par l'urée à pH 4,5 avec un DHc de 3 % (a), de 11 % (b) et de 21 % (c).

Après intégration et comparaison des spectres UV des fractions correspondantes à chaque pic avec ceux des trois hémorphines présentes dans notre librairie spectrale, la LVVh-7, la VVh-7 et la VVh-4 ont été identifiées. La LVVh-7 est éluée avec un temps de rétention de 29,6 minutes, la VVh-7 avec un temps de rétention de 27,6 minutes et la VVh-4 avec un temps de rétention de 24,5 minutes.

Puis nous avons accédé aux rapports des résidus aromatiques, grâce à l'application de la procédure d'identification (figure 46), ainsi qu'au degré d'homogénéité (valeurs AM et AS) entre les hémorphines identifiées dans les hydrolysats peptidiques totaux et celles de la librairie spectrale. Enfin nous avons déterminé la concentration de chaque hémorphine grâce à leur droite de calibration (figure 49). Le tableau 4 récapitule les résultats obtenus au cours des procédures d'identification et de quantification de la LVVh-7, de la VVh-7 et de la VVh-4.

Hémorphine identifiée	Temps de rétention	Librairie Spectrale						Rapport des acides aminés aromatiques			Concentration (mg/ml)
		LVVh-7		VVh-7		VVh-4		Trp/Tyr	Trp/Phe	Tyr/Phe	
		AM	AS	AM	AS	AM	AS				
<b>LVVh-7</b> (DHc=3%)	29,6 min	0,329	1,161	0,991	1,188	6,457	1,122	1/1	1/1	1/1	2,6
<b>VVh-7</b> (DHc=11%)	26,9 min	0,563	1,101	0,063	1,108	7,963	1,117	1/1	1/1	1/1	8,5
<b>VVh-4</b> (DHc=21%)	24,5 min	4,013	1,019	4,462	1,042	0,154	1,054	1/1			2,2

**Tableau 4. Résultats de l'identification de la LVV-hémorphine-7, de la VV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-4 au sein des hydrolysats pepsique d'hémoglobine dénaturée par l'urée à 5 % (p/v) dénaturée par l'urée.**

Les résultats des rapports des résidus aromatiques Trp/Tyr, Trp/Phe et Tyr/Phe montrent que les peptides analysés aux temps de rétention 29,6 et 27,6 minutes renferment dans leur structure les résidus aromatiques tryptophane, tyrosine et phénylalanine. Cependant, ces premiers résultats nous ont permis seulement de déduire une éventuelle présence de la LVVh-7 et de la VVh-7 dans les hydrolysats étudiés.

La correspondance des pics nous est finalement donnée grâce aux degrés d'homogénéité, c'est-à-dire grâce à la détermination des valeurs AM et AS par le logiciel de traitement des données spectrales. Les valeurs AM sont inférieures aux valeurs AS, pour les deux peptides LVVh-7 et VVh-7. En effet, il n'est pas possible de distinguer la présence de la LVVh-7 et de la VVh-7, qui ne diffèrent que d'un résidu leucine. Ce dernier absorbe peu à 226 nm et n'a donc pas d'influence sur les dérivées secondes des spectres UV de chaque hémorphine. Le temps de rétention permet alors de les départager.

En ce qui concerne la comparaison spectrale du pic étudié dans l'hydrolysate à 21 % de degré d'hydrolyse avec les hémorphines de la librairie spectrale, les valeurs AM sont inférieures aux valeurs AS pour la VVh-4. Cependant, l'absence du résidu aromatique phénylalanine est caractérisée par les valeurs AM supérieures aux valeurs AS pour la LVVh-7 et pour la VVh-7.

Nous avons corrélé l'aire des pics relatives à la LVVh-7, la VVh-7 et la VVh-4 avec la quantité correspondante, grâce à la droite de calibrage de chaque hémorphine (figure 49). Nous avons ainsi déduit une concentration de 2,6 mg de LVVh-7/ml de solution d'hydrolysate à 3 % de degré d'hydrolyse, de 8,5 mg de VVh-7/ml de solution d'hydrolysate à 11 % de degré d'hydrolyse et de 2,2 mg de VVh-4/ml de solution d'hydrolysate à 21 % de degré d'hydrolyse

## Conclusion

Nous avons préparé la LVVh-7, la VVh-7 et la VVh-4 par CLHP en phase inverse avec une colonne préparative de type C4, à partir des hydrolysats obtenus aux degrés d'hydrolyse corrigés optimum pour l'obtention de chaque hémorphine.

Ces trois hémorphines ont été utilisées comme des standards afin d'établir une procédure pour leur identification et leur quantification au sein d'hydrolysats pepsiques d'hémoglobine.

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

## **CHAPITRE IV .**

# **MISE EN ŒUVRE DE L'HYDROLYSE DE L'HEMOGLOBINE PAR LA PEPSINE DANS UN SYSTEME DE SOLVANTS BIPHASIQUES POUR LA PREPARATION DES HEMORPHINES**

L'extraction de peptides actifs, grâce à un système biphasique eau / solvant organique, représente un intérêt pratique dans la procédure de purification de telles molécules. Elle représente un moyen simple à mettre en œuvre et contribue à réduire quantitativement le nombre de peptides extraits, grâce à la sélectivité du solvant organique. Cela contribuerait à réduire les étapes nécessaires à l'isolement de ces peptides actifs, qui font souvent appel à la combinaison de différentes techniques chromatographiques (Piot et coll. 1992a, Karelín et coll. 1994, Aubes-Dufau et Combes 1997).

Les solvants organiques ont montré leur capacité à extraire des peptides amères, à partir d'hydrolysats complexes de protéines, telles que l'hémoglobine (Aubes-Dufau et coll. 1995) ou encore les protéines de soja (Piot et coll. 1998b). Ces peptides étaient tous des peptides hydrophobes.

La LVV-hémorphine-7 (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe) et la VV-hémorphine-7 (Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe) ont également fait l'objet de telles recherches. La présence de résidus leucine, valine, tryptophane, tyrosine et phénylalanine notamment, confère à ces deux hémorphines un caractère hydrophobe. D'ailleurs, d'après l'échelle de Bigelow (1967), la LVVh-7 a une hydrophobicité de 1675 cal/mol, et la VVh-7 une hydrophobicité de 1661 cal/mol.

Zhao et Piot (1998b) ont testé différentes classes de solvants organiques plus ou moins miscibles à l'eau (esters, éthers, hydrocarbures, cétones et alcools aliphatiques) sur un hydrolysat peptidique d'hémoglobine bovine, afin de trouver des solvants apolaires capables d'extraire des hémorphines. Cet hydrolysat peptidique complexe, qui renfermait une centaine de peptides, provenait d'une hydrolyse pepsique de l'hémoglobine à pH 2 (Piot et coll. 1988b). L'extraction était réalisée avec un système biphasique constitué de 50 % (v/v) de solvant organique et de 50 % (v/v) de phase aqueuse contenant l'hydrolysat peptidique. Le butan-1-ol et le butan-2-ol ont été retenus pour leur capacité d'extraction et de sélectivité élevées vis à vis de la LVVh-7 et de la VVh-7, ainsi que pour leur rendement d'extraction (environ 40 %) de ces deux peptides opioïdes.

Les propriétés hydrophobes des deux hémorphines ont donc permis leur solubilisation dans ce type de solvants organiques. Dès lors, la production enzymatique en continu de la LVVh-7 et de la VVh-7, grâce à leur extraction dans un système biphasique eau / alcools, pourrait constituer un moyen efficace et rapide dans un procédé de préparation de ces peptides actifs en réacteur enzymatique. Un tel procédé aurait des avantages sur le plan d'une production industrielle: la suppression des étapes séparatives par chromatographie et une réduction du coût d'investigation du procédé.

Nous avons, dans un premier temps, testé le butan-1-ol et le butan-2-ol comme solvants d'extraction de la LVVh-7 et de la VVh-7 dans les hydrolysats pepsiques d'hémoglobine. Deux hydrolysats ont été préparés, chacun avec le degré d'hydrolyse optimum d'obtention de chaque hémorphine (3 % dans le cas de la LVVh-7 et 11 % dans le cas de la VVh-7).

Nous avons dans un deuxième temps mis au point un système de solvants biphasiques capable à la fois d'extraire les hémorphines, et d'être compatible avec la stabilité de la pepsine. Le but est d'exploiter par la suite ce système dans un réacteur enzymatique pour la production de ces opioïdes en continu.

## **IV.1 Extraction de la LVV-hémorphine-7 et VV-hémorphine-7 à partir d'hydrolysats pepsiques de l'hémoglobine bovine.**

Nous avons utilisé le butan-1-ol et le butan-2-ol pour mener les extractions des hydrolysats pepsiques de l'hémoglobine bovine. Nous avons ainsi calculé les rendements d'extraction de la LVVh-7 et de la VVh-7 dans nos conditions de préparation des hydrolysats peptidiques.

Notre hydrolysate provenait d'une hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine à 5 % (p/v), dénaturée par l'urée, dans un tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 à 23°C. L'étude cinétique d'apparition des deux hémorphines, grâce au couplage de la CLHP avec la spectrométrie de masse (étude du chapitre II), a montré que chaque peptide était présent à un degré d'hydrolyse optimal de l'hémoglobine dénaturée: 3 % pour la LVVh-7, qui correspond à 2,5 minutes d'hydrolyse, et 11 % pour la VVh-7, correspondant à 3 heures de réaction protéolytique. Nous avons utilisé ces deux hydrolysats pepsiques pour tester l'extraction des hémorphines par le butan-1-ol et le butan-2-ol.

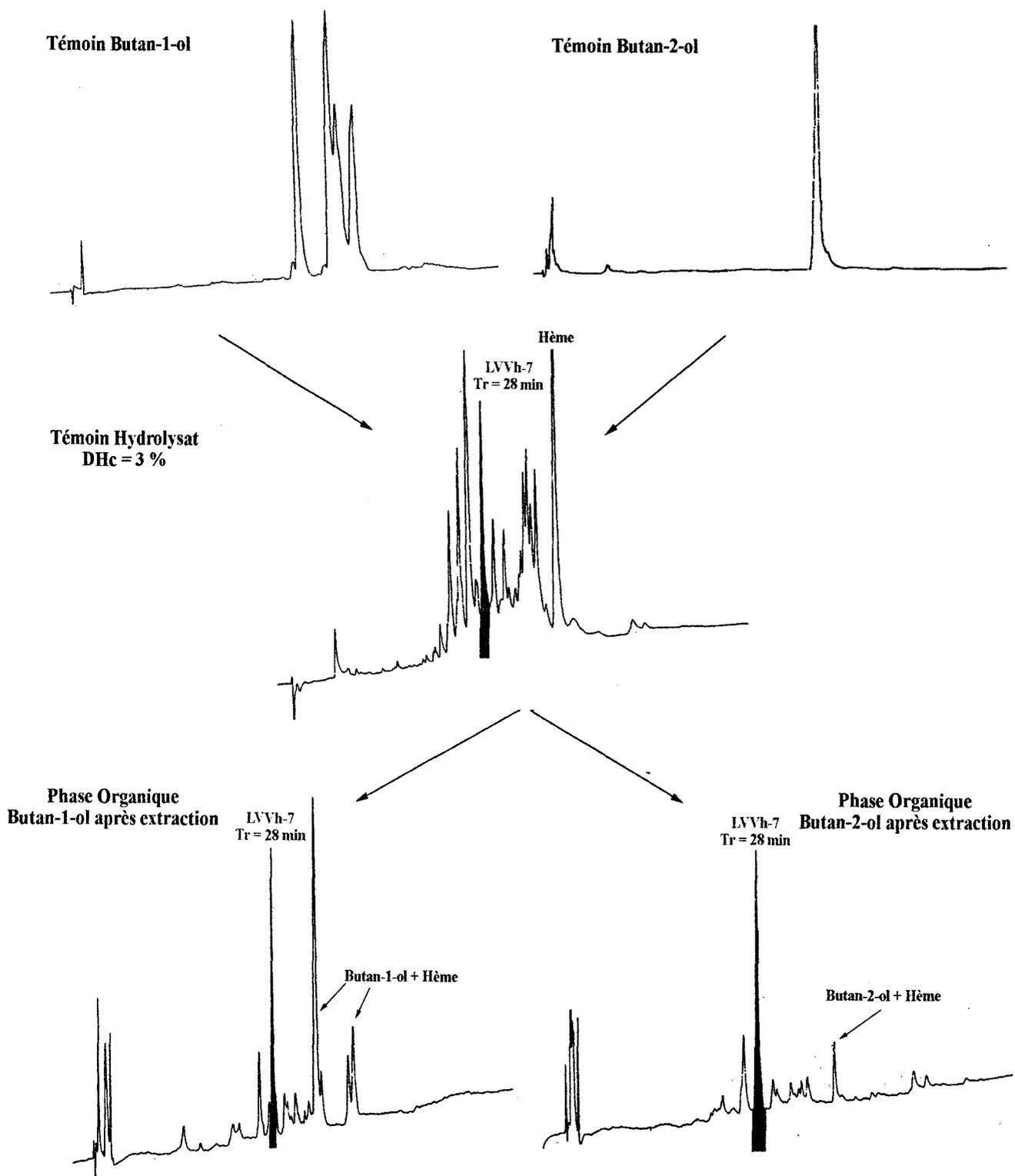
Les extractions étaient conduites sous forte agitation, de façon à créer une émulsion, pour offrir une surface d'échange importante au sein des systèmes biphasiques. La phase organique était constituée soit de butan-1-ol soit de butan-2-ol, et la phase aqueuse était constituée de l'hydrolysate peptidique, la proportion de chaque phase étant de 50 % (v/v). Après centrifugation à 3000 tours/min pendant dix minutes, les phases organiques ont été analysées par CLHP en phase inverse avec une colonne de type C4.

L'efficacité des deux solvants a été déterminée selon deux critères:

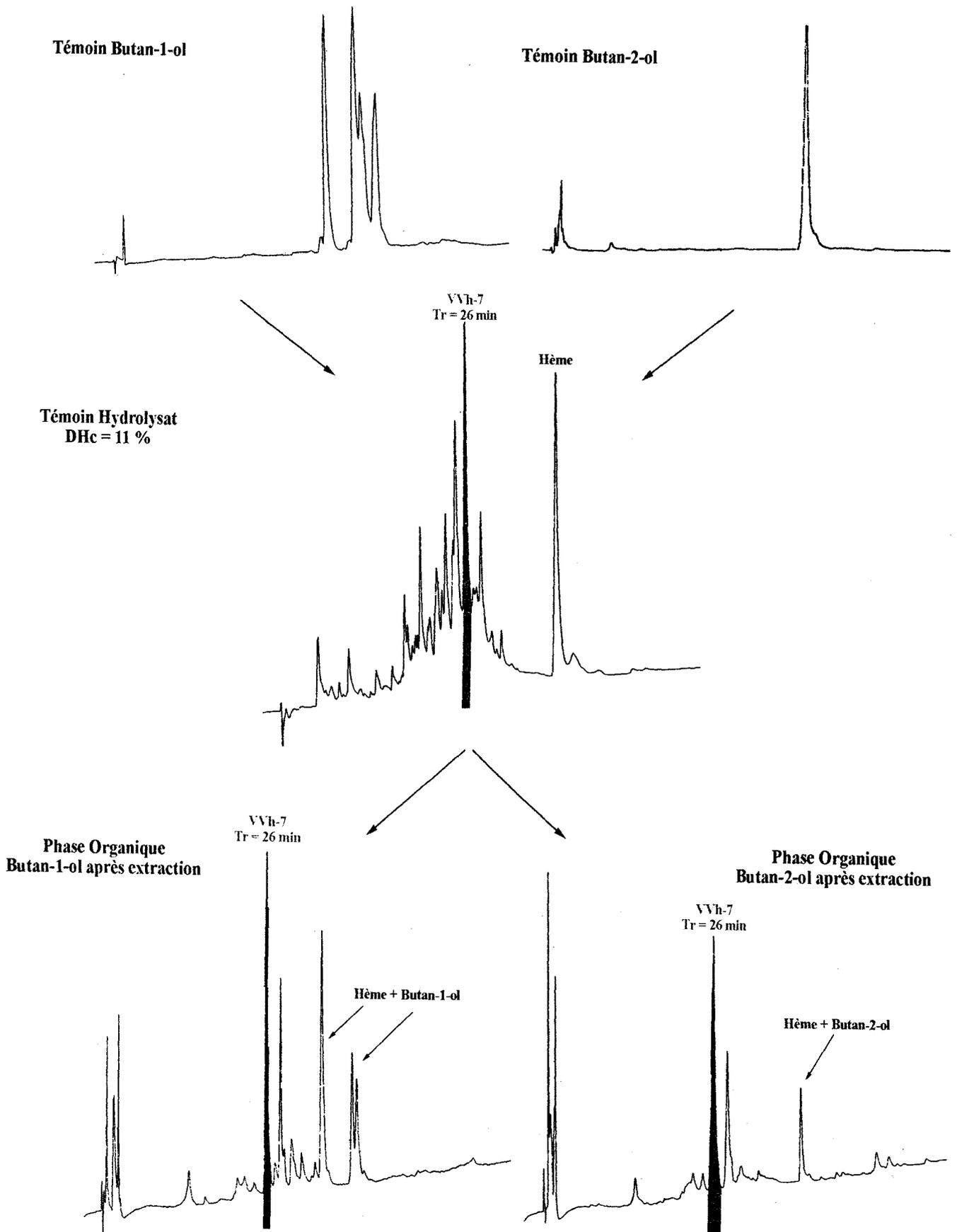
- que le pic correspondant au solvant organique utilisé ne se superpose pas à celui des deux hémorphines;
- que l'alcool utilisé soit sélectif des hémorphines.

Les figures 51 et 52 comparent les extractions de la LVVh-7 (figure 51) et de la VVh-7 (figure 52) réalisées avec les systèmes biphasiques eau/butan-1-ol et eau/butan-2-ol.

Peu de peptides sont extraits par la phase organique butan-1-ol et butan-2-ol. De plus, il n'y a pas de recouvrement des pics correspondant aux alcools testés (temps de rétention d'environ 40 minutes pour le butan-2-ol, tandis que le butan-1-ol présente plusieurs pics d'élution compris dans la zone de rétention 38 à 40 minutes) avec celui des peptides extraits (zone de rétention entre 25 et 30 minutes). Cependant, l'hème est extrait par chaque phase alcoolique. Les densités optiques mesurées à 400 nm, longueur d'onde spécifique pour la



**Figure 51. Comparaison des profils chromatographiques des phases organiques butan-1-ol et butan-2-ol, issues de l'extraction (v/v) de l'hydrolysat pepsique d'hémoglobine bovine à un DHc de 3 %.**



**Figure 52. Comparaison des profils chromatographiques des phases organiques butan-1-ol et butan-2-ol, issues de l'extraction (v/v) de l'hydrolysate pepsique d'hémoglobine bovine à un DHc de 11 %.**

détection de l'hème, ont montré des valeurs supérieures dans la phase butan-1-ol (densité optique moyenne de 0,3 dans le cas des études d'extraction des hydrolysats peptidiques à 3 % et à 11 % de DHc) que dans la phase butan-2-ol (absorbance moyenne de 0,1 dans le cas des études d'extraction des hydrolysats peptidiques à 3 % et 11 % de DHc), les deux alcools n'absorbant pas à cette longueur d'onde. Notre but est d'extraire les hémorphines de manière sélective. Malheureusement, l'hème est extrait en même temps que les deux hémorphines.

Nous avons analysé les phases organiques en comparant les dérivées secondes des spectres UV des peptides extraits et celles des spectres UV des hémorphines de notre librairie spectrale (créée dans le chapitre III). Le pic correspondant à 28 minutes de temps de rétention dans les phases organiques butan-1-ol et butan-2-ol, correspondant à l'extraction de l'hydrolysate à 3 % de degré d'hydrolyse corrigé (figure 51), a été identifié comme étant la LVVh-7. De même, le pic correspondant à 26 minutes de temps d'éluion dans les mêmes phases organiques mais relatives à l'extraction de l'hydrolysate à 11 % de degré d'hydrolyse corrigé (figure 52) a été identifié comme étant la VVh-7.

L'identification des deux hémorphines a pu se faire grâce à l'étude du tableau suivant.

Solvant organique	DHc	Hémorphine identifiée	Temps de rétention	Librairie Spectrale				Proportion des acides aminés aromatiques		
				LVVh-7		VVh-7		Trp/Tyr	Trp/Phe	Tyr/Phe
				AM	AS	AM	AS			
Butan-1-ol	3 %	LVVh-7	28 min	0,481	1,197	0,998	1,205	1/1	1/1	1/1
Butan-2-ol	3 %	LVVh-7	28 min	0,581	1,269	1,131	1,272	1/1	1/1	1/1
Butan-1-ol	11 %	VVh-7	26 min	0,872	1,210	0,116	1,214	1/1	1/1	1/1
Butan-2-ol	11 %	VVh-7	26 min	1,140	1,373	0,292	1,376	1/1	1/1	1/1

**Tableau 5. Résultats de l'identification des hémorphines au sein des phases organiques, obtenues après extraction avec les systèmes biphasiques tampon/butan-1-ol (50/50, v/v) et tampon/butan-2-ol (50/50, v/v).**

Dans ce tableau sont indiqués la phase alcoolique (butan-1-ol ou butan-2-ol) et le degré d'hydrolyse corrigé (3 % ou 11 %) étudiés, les temps de rétention, ainsi que les rapports des résidus aromatiques Tyr/Trp, Trp/Phe et Tyr/Phe après l'application des procédures décrites dans le chapitre III (voir figures 46 et 47). Les valeurs des angles de mesure (AM) et

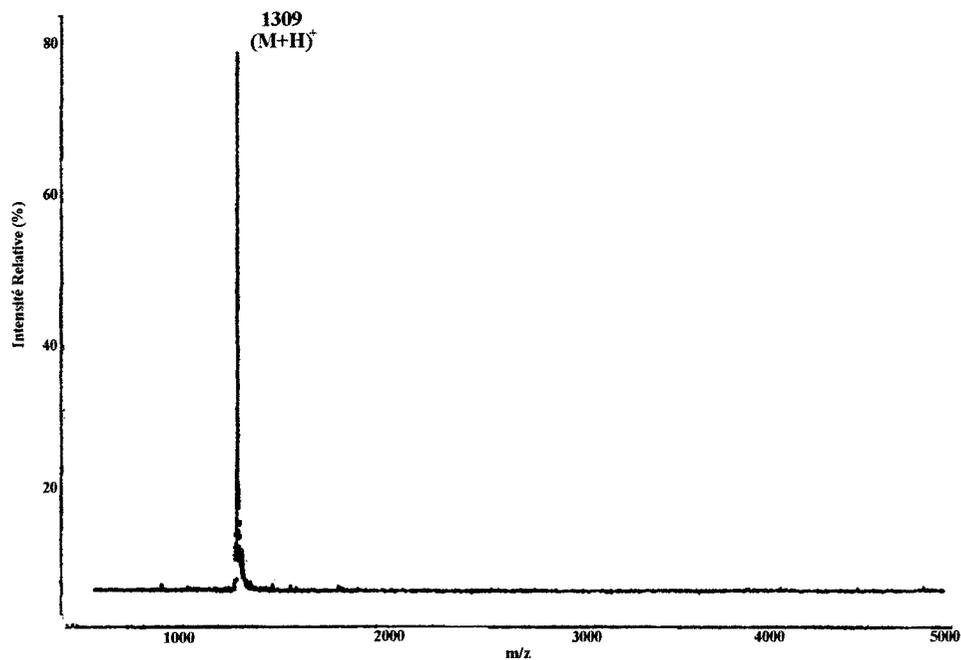
des angles de seuil (AS) de chaque hémorphine identifiée par le logiciel par rapport aux hémorphines (LVVh-7 et VVh-7) de la librairie spectrale sont également notées.

Les résultats des rapports des résidus aromatiques tryptophane/tyrosine, tryptophane/phénylalanine et tyrosine/phénylalanine, montrent que les peptides extraits avec des temps de rétention de 26 minutes et de 28 minutes renferment les résidus aromatiques tryptophane, tyrosine et phénylalanine. Cependant, ces premiers résultats nous permettaient seulement de déduire une éventuelle présence de la LVVh-7 et de la VVh-7 dans les phases alcooliques butan-1-ol et butan-2-ol.

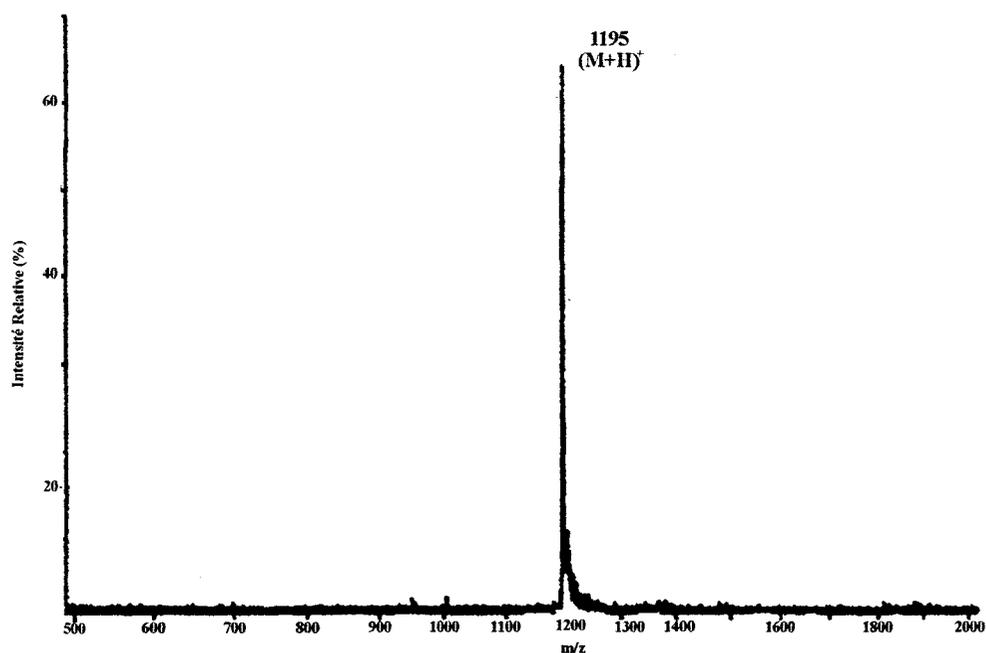
La correspondance des pics, identifiés comme étant la LVVh-7 et la VVh-7, nous est finalement donnée grâce aux degrés d'homogénéité (AM et AS), déterminés par le logiciel de traitement des données spectrales entre chaque hémorphine de notre librairie spectrale et les éventuelles hémorphines présentes dans les phases organiques.

Ces degrés d'homogénéité, appuyés par les temps de rétention nous ont permis d'identifier la VVh-7 (temps de rétention de 26 minutes) et la LVVh-7 (temps de rétention de 28 minutes). La présence de ces deux hémorphines a toutefois été vérifiée par spectrométrie de masse en mode MALDI. Les figures 53 et 54 montrent respectivement que la LVVh-7 et la VVh-7 correspondent bien aux pics identifiés grâce à notre librairie spectrale. De plus, ces spectres indiquent que les deux hémorphines sont pures puisque aucun autre peptide n'est détecté.

Nous observons donc que le butan-1-ol et le butan-2-ol extraient tous les deux la LVVh-7 et la VVh-7. De plus, la sélectivité des extractions est importante vis à vis de ces deux hémorphines, puisque peu de peptides sont présents dans les phases alcooliques.



**Figure 53. Spectre de masse de la LVV-hémorphine-7, identifiée dans les phases butan-1-ol et butan-2-ol lors de l'extraction de l'hydrolysât pepsique de l'hémoglobine bovine à 3 % de DHc.**



**Figure 54. Spectre de masse de la VV-hémorphine-7, identifiée dans les phases butan-1-ol et butan-2-ol lors de l'extraction de l'hydrolysât pepsique de l'hémoglobine bovine à 11 % de DHc.**

Nous avons calculé les rendements d'extraction de chaque hémorphine par le butan-1-ol et le butan-2-ol, aux degrés d'hydrolyse corrigé de 3 % et de 11 %. Les volumes récupérés après centrifugation ont été mesurés et les quantités de la LVVh-7 et de la VVh-7 ont été rapportés à ces volumes, grâce aux gammes étalon de chaque hémorphine créées dans le chapitre précédent. Ces rendements d'extraction sont récapitulés dans le tableau 6, ils correspondent aux rapports des quantités de la LVVh-7 et de la VVh-7 extraites sur les quantités totales de ces mêmes hémorphines présentes dans les hydrolysats de départ aux degrés d'hydrolyse corrigés de 3 %, en ce qui concerne l'extraction de la LVVh-7, et de 11 % dans le cas de la VVh-7.

Peptide opioïde	Phase alcoolique	
	Butan-1-ol	Butan-2-ol
<b>LVV-hémorphine-7</b>	85 %	86 %
<b>VV-hémorphine-7</b>	70 %	70 %
<b>Hème</b>	10 %	5 %

**Tableau 6. Rendements d'extraction de la *LVV-hémorphine-7*, de la *VV-hémorphine-7* et de l'hème avec les systèmes biphasiques tampon/butan-1-ol (50/50, v/v) et tampon/butan-2-ol (50/50, v/v).**

Nous constatons que le butan-2-ol et le butan-1-ol présentent une affinité similaire pour la LVVh-7 et la VVh-7.

Les résultats obtenus sur l'extraction de la LVVh-7 et de la VVh-7 par le butan-1-ol et le butan-2-ol, dans nos conditions de préparation des hydrolysats pepsiques d'hémoglobine bovine sont en accord avec les résultats de Zhao et coll. en 1998. Ces derniers ont testé différents solvants apolaires (esters, éthers, hydrocarbures, cétones et alcools aliphatiques) pour l'extraction d'un hydrolysat pepsique d'hémoglobine bovine obtenu à pH 2. Ils ont montré que le butan-1-ol et le butan-2-ol étaient les plus efficaces vis à vis de l'extraction de ces deux hémorphines.

Les deux butanols ont montré une sélectivité importante lors de l'extraction des deux hémorphines, compte tenu du nombre élevé de peptides présents dans les hydrolysats peptidiques. Les deux alcools extraient quantitativement autant de LVVh-7 que de VVh-7. Cependant, dans le cas du butan-1-ol une plus grande quantité d'hème est extraite (valeur moyenne des extractions à 3 et 11 % de DHc). Aussi nous avons donc choisi le butan-2-ol

pour la suite de nos recherches afin d'obtenir des extraits les plus enrichis possible en hémorphines.

## **IV.2. Etude de l'extraction de la LVV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-7 au cours de la réaction enzymatique par le système octan-1-ol / butan-2-ol.**

Nous avons étudié dans ce chapitre l'extraction de la LVVh-7 et de la VVh-7 avec un système dynamique, c'est-à-dire au cours de la réaction d'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine. L'efficacité du système reposera sur la capacité du butan-2-ol à solubiliser les hémorphines avant qu'elles ne soient hydrolysées. En effet, il faut rappeler que la LVVh-7 et la VVh-7 sont deux peptides intermédiaires substrats de la pepsine. Dans ce système, la concentration des hémorphines dans la phase aqueuse est sous contrôle cinétique ; l'adjonction d'un phénomène de partage en faveur du solvant organique devrait permettre de réduire considérablement leur hydrolyse et donc d'accentuer leur accumulation.

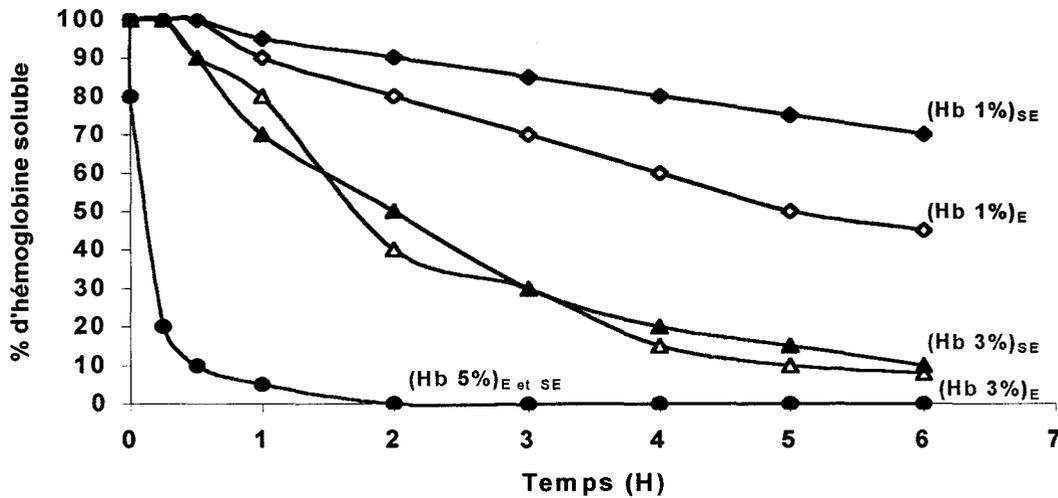
Les études précédentes ont montré l'efficacité du butan-2-ol pour l'extraction des deux hémorphines, à partir des deux hydrolysats d'hémoglobine bovine dénaturée par l'urée aux degrés d'hydrolyse de 3 % pour la LVVh-7 et de 11 % pour la VVh-7. De plus il est difficilement admissible de concevoir un réacteur ouvert en maintenant une concentration en urée de 5,3 M ; aussi nous avons étudié la mise en œuvre de l'extraction par butan-2-ol de la LVVh-7 et de la VVh-7 au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine à 23°C en l'absence d'urée.

### **IV.2.1. Etude de la dénaturation de l'hémoglobine dans le système biphasique tampon / butan-2-ol.**

Dans un premier temps, l'effet de la concentration en hémoglobine sur sa stabilité dans le système biphasique eau/butan-2-ol a été étudié, avant de mettre en œuvre, la réaction enzymatique dans le système eau / butan-2-ol.

La stabilité d'hémoglobine bovine à différentes concentrations dans le tampon acétate de sodium 0,1 M a été déterminée en présence de 50 % (v/v) de butan-2-ol. Nous avons également comparé la stabilité de l'hémoglobine dans un système biphasique avec et sans émulsions, afin de déterminer l'impact d'une forte agitation sur la dénaturation de la protéine.

L'hémoglobine dénaturée étant insoluble, l'absorption à 500 nm du surnageant de la solution aqueuse a été suivie pendant six heures pour quantifier l'hémoglobine restant en solution.



**Figure 55. Influence du mode d'agitation (Emulsion ou Sans Emulsion) et de la concentration en hémoglobine (1, 3 et 5 % (p/v)) sur sa solubilité dans le système biphasique constitué de 50 % (v/v) d'un tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 et de 50 % (v/v) de butan-2-ol.**

La figure 55 montre que la solubilité de l'hémoglobine diminue au cours du temps et d'autant plus que sa concentration est élevée. En effet, pour les concentrations en hémoglobine de 3 % et de 5 %, le taux de protéine soluble est très affecté : nous avons constaté une perte en hémoglobine d'environ 50 % pour une concentration en hémoglobine de 3 %, et de 100 % pour une concentration de 5 %, et dans ce dernier cas seulement au bout de deux heures d'agitation.

Nedjar-Arroume et coll. (1991) ont étudié la stabilité de l'hémoglobine à différentes concentrations dans le mélange eau / butan-1-ol. Ils ont montré qu'au fur et à mesure que la concentration de la protéine augmentait (de 0,11 % à 10), la stabilité de l'hémoglobine diminuait de manière importante, particulièrement pour des concentrations au-delà de 1 %.

De même, le mode d'agitation influence la solubilité de l'hémoglobine pour chaque concentration testée. Le système biphasique eau/butan-2-ol sous forte agitation montre une diminution de la stabilité de l'hémoglobine. Par contre, le même système sans émulsion montre un taux d'hémoglobine soluble plus important, surtout pour l'hémoglobine à 1 % : après six heures d'agitation, seulement 30 % d'insolubilité sont constatés pour l'hémoglobine

1 % dans le système biphasique sans émulsion, contre 55 % pour l'hémoglobine 1 % dans le système biphasique avec émulsion.

Cette étude a permis de déterminer l'impact du mode d'agitation et de la concentration en hémoglobine sur la stabilité de l'hémoglobine dans le système d'extraction biphasique tampon acétate / butan-2-ol. Nous avons donc choisi de travailler par la suite avec une concentration en hémoglobine de 1 % (p/v), afin de limiter l'insolubilisation de la protéine, et avec un mode d'agitation sans émulsion qui réduit la dénaturation interfaciale de la protéine.

#### IV.2.2. Etude de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine dans le système tampon / butan-2-ol.

##### *Suivi de l'hydrolyse de l'hémoglobine*

Nous avons comparé la cinétique d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine à 1 % (p/v) par la pepsine à pH 4,5 dans le tampon acétate seul et dans le système biphasique tampon / butan-2-ol. Nous avons suivi la disparition des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  (figure 56).

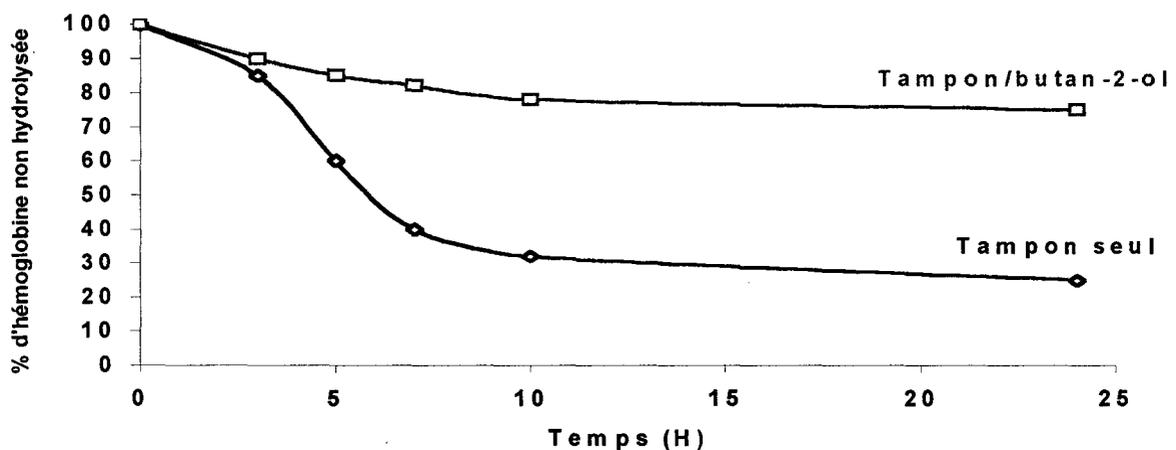


Figure 56. Evolution de la concentration en hémoglobine au cours de l'hydrolyse pepsique à pH 4,5 et à 23°C dans le tampon acétate seul et dans le système biphasique tampon/butan-2-ol (50/50, v/v).

Cette figure montre que les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine sont peu clivées par la pepsine dans le système tampon/butan-2-ol. Après cinq heures d'hydrolyse, le pourcentage d'hémoglobine restant dans la phase aqueuse demeure pratiquement constant au cours de

l'hydrolyse en présence de butan-2-ol. Par contre, l'hydrolyse des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine en l'absence du solvant organique, c'est-à-dire dans le tampon acétate seul, suit une cinétique plus rapide. Au bout de cinq heures d'hydrolyse, environ 85 % des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont encore présentes dans la phase aqueuse du système tampon/butan-2-ol, alors que seulement 60 % des chaînes sont présentes dans le tampon seul.

### *Suivi des populations peptidiques.*

Nous avons suivi l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine 1 % (p/v) par la pepsine (E/S=1/11, mol/mol) dans le système biphasique tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 / butan-2-ol (50/50 v/v). La réaction a été conduite avec un mode d'agitation sans émulsion.

Des prélèvements ont été effectués au cours du temps sur une période de 24 heures. Après centrifugation, les phases aqueuses et organiques ont été fractionnées par Chromatographie Liquide Haute Performance en phase inverse sur une colonne de type C4. La figure 57 montre l'évolution des profils peptidiques des phases aqueuses au cours du temps. Ces profils mettent en évidence un très faible avancement de la réaction d'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine. En effet, les gros peptides hydrophobes produits en début d'hydrolyse (indiqués en vert sur la figure 57) sont toujours présents au bout de 24 heures de réaction protéolytique. La LVVh-7 et la VVh-7 n'ont pas été détectées dans les phases aqueuses quelque soit la durée de l'hydrolyse. Des analyses ont été menées par comparaison des dérivées secondes des spectres UV des peptides de l'hydrolysate avec ceux des hémorphines de la librairie spectrale.

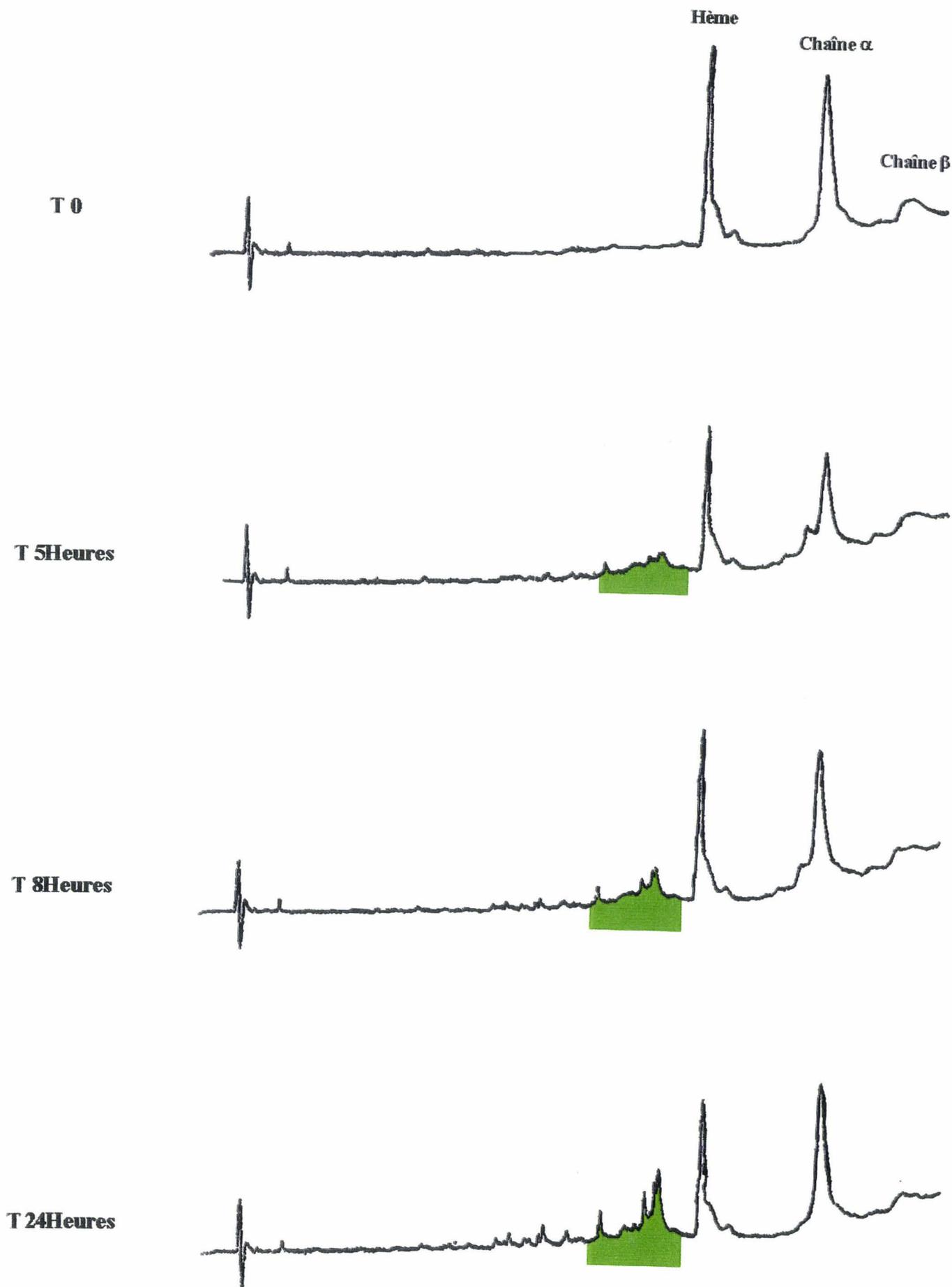
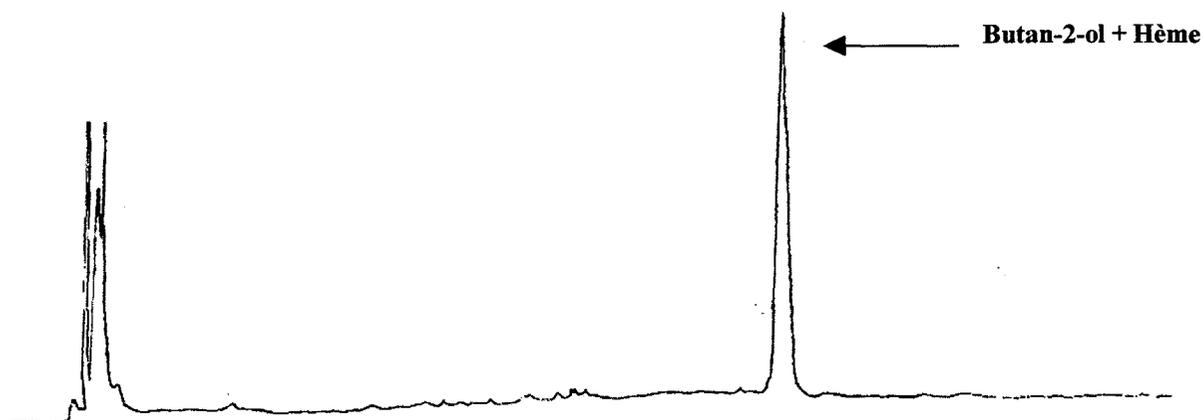


Figure 57. Profils peptidiques des phases aqueuses, issues de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine dans le système biphasique tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 / butan-2-ol (50/50, v/v).

En ce qui concerne l'analyse des phases organiques, quelque soit le temps d'hydrolyse nous avons toujours constaté le même profil chromatographique, où seuls le butan-2-ol et l'hème sont présents. Le profil chromatographique de la phase organique, présentée sur la figure 58, est représentatif de la situation de l'extraction par le butan-2-ol. En effet, aucune hémorphine n'est détectée dans la phase butan-2-ol.



**Figure 58. Profil chromatographique représentatif des phases organiques, issues de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine dans le système biphasique tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 / butan-2-ol (50/50, v/v).**

***Recherche d'un système de solvant biphasique à base de butan-2-ol totalement non miscible à l'eau.***

Cette perte d'activité importante de la pepsine, probablement due à la miscibilité partielle du butan-2-ol avec l'eau (environ 8,5 % v/v) est donc observée dans le système biphasique avec pour conséquence d'apparition des deux hémorphines dans le milieu réactionnel. Tang (1965) et Antonov (1977) ont rapporté l'effet inhibiteur des alcools aliphatiques sur la pepsine. Cette inhibition provient de la compétition entre le groupement hydrocarboné de l'alcool et le substrat pour le site de fixation hydrophobe de la pepsine. Plus tard, Cottrell et coll. (1995) ont attribué la perte de l'activité de la pepsine à un changement substantiel des indices de flexibilité de divers sites considérés comme essentiels pour la catalyse. Ces sites incluent une boucle repliée couvrant le site actif, des régions proches de l'entrée du site et des sous-domaines du domaine C-terminal (Abad-Zapatero et coll. 1990).

Une rigidité structurale accrue de la pepsine en présence d'alcools aliphatiques restreindrait les mouvements locaux de ces régions contribuant ainsi à empêcher la fixation du substrat.

Nous avons donc recherché un moyen pour retrouver l'activité de la pepsine et ainsi permettre l'hydrolyse des gros peptides hydrophobes accumulés dans la phase aqueuse, afin d'obtenir la formation de la LVVh-7 et de la VVh-7. Notre volonté de conserver le système tampon / butan-2-ol, très efficace pour l'extraction des hémorphines, nous a conduit à utiliser un co-solvant capable d'extraire le butan-2-ol présent dans la phase aqueuse. Il nous fallait trouver un co-solvant respectant deux critères importants: qu'il soit non miscible à l'eau, pour ne pas perturber l'activité enzymatique et que le butan-2-ol présente une solubilité plus élevée dans le co-solvant que dans le tampon acétate.

Les alcools aliphatiques à longues chaînes, au delà de quatre carbones, sont intéressants, car le butan-2-ol est miscible avec ces alcools lourds. Cependant, les alcools aliphatiques à cinq, six et sept carbones sont solubles dans l'eau, même dans une faible proportion. Ils ne peuvent donc pas convenir car ils pourraient perturber l'activité de la pepsine comme le butan-2-ol.

Notre intérêt s'est porté sur l'octan-1-ol. Ce solvant organique n'est pas miscible à l'eau et est souvent utilisé comme modèle pour la détermination des coefficients de partage de molécules par rapport à un environnement aqueux (Leo et coll. 1971).

Nous avons mesuré le coefficient de partage du butan-2-ol dans le système biphasique tampon/octan-1-ol, afin de vérifier l'efficacité de l'octan-1-ol vis à vis de l'extraction du butan-2-ol. La totalité du butan-2-ol a été dosée au sein de la phase aqueuse par une réaction d'oxydo-réduction avec le dichromate de potassium en milieu acide sulfurique (Hart et Conia 1987, matériels et méthodes chapitre XI). Ainsi, le butan-2-ol est aisément oxydé en butan-2-one par le dichromate de potassium ; les ions dichromate ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ), de couleur orangée, sont réduits en ions chromiques ( $\text{Cr}^{3+}$ ) bleu-vert. Le virage de la couleur est mesurable par spectrophotométrie dans le visible à 590 nm.

Le coefficient de partage du butan-2-ol, entre le tampon et l'octan-1-ol, est donné par le rapport de la concentration en butan-2-ol dans l'octan-1-ol à celle dans le tampon à l'équilibre. Un coefficient de partage de 5,2 a été obtenu. Nous pouvions alors espérer réduire considérablement la concentration en butan-2-ol miscible à l'eau lors de la mise en œuvre de la pepsine dans les systèmes tampon / butan-2-ol - octan-1-ol, et obtenir une activité enzymatique suffisante permettant l'apparition des hémorphines.

### **IV.2.3. Etude de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine dans le système tampon / octan-1-ol.**

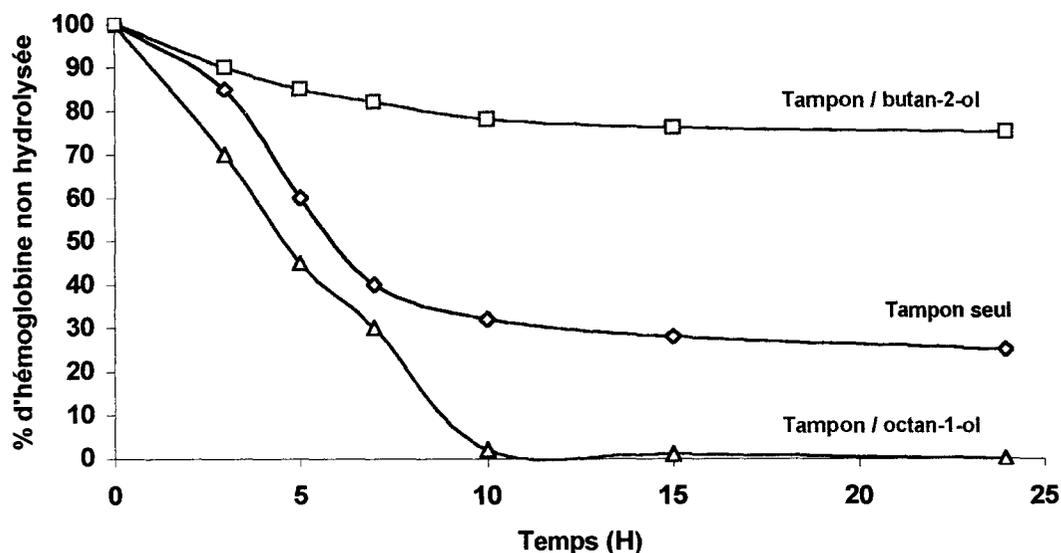
Avant de mener l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine dans le tampon acétate en présence des deux solvants organiques miscibles butan-2-ol et octan-1-ol, il nous fallait étudier l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine en présence de l'octan-1-ol seul.

#### ***Suivi de l'hydrolyse de l'hémoglobine.***

Nous avons comparé la cinétique d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine à 1 % (p/v) par la pepsine, dans le tampon acétate seul et dans les systèmes biphasiques tampon / octan-1-ol et tampon / butan-2-ol. Nous avons suivi la disparition des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  au cours de l'hydrolyse (figure 59).

Les chaînes d'hémoglobine sont clivées plus rapidement dans le tampon acétate en présence d'octan-1-ol qu'en présence de butan-2-ol. La cinétique d'hydrolyse, dans le système tampon / octan-1-ol, suit la même évolution en début d'hydrolyse que celle dans le tampon seul. Puis le taux de dégradation des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  est plus accentué après sept heures d'hydrolyse pepsique en présence d'octan-1-ol. Au bout de dix heures de réaction protéolytique, aucune chaîne n'est détectée dans le système tampon / octan-1-ol, alors qu'environ 30 % d'hémoglobine non hydrolysée sont encore présents dans le tampon seul. Après cinq heures d'hydrolyse pepsique, le taux des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  reste pratiquement identique (85 %) dans le système biphasique tampon / butan-2-ol. Par contre, ce taux diminue fortement dans le tampon seul (60 %) et dans le système biphasique tampon / octan-1-ol (45 %).

L'activité de la pepsine ne semble donc pas être perturbée dans le système biphasique tampon / octan-1-ol. L'octan-1-ol, très peu miscible au tampon, aurait très peu d'interactions avec l'enzyme et l'activité de la pepsine serait donc conservée au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine.



**Figure 59. Evolution de la concentration en hémoglobine au cours de l'hydrolyse pepsique à pH 4,5 et à 23°C: dans le tampon acétate de sodium seul et dans les systèmes tampon/butan-2-ol (50/50, v/v) et tampon/octan-1-ol (50/50, v/v).**

Cependant les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  disparaissent plus rapidement lorsque l'octan-1-ol est présent, contrairement à l'hydrolyse pepsique dans le tampon acétate seul. Même si le système biphasique tampon / octan-1-ol n'est pas en émulsion, des tensions de surface subsistent néanmoins à l'interface des deux phases tampon et alcool. Ces tensions de surface auraient alors pour conséquence de dénaturer les chaînes d'hémoglobine pendant le déroulement de la réaction protéolytique.

Cette dénaturation est intéressante car, outre permettre l'apparition des gros peptides hydrophobes non visibles lors de l'hydrolyse de l'hémoglobine dans le tampon seul Elle permet aussi l'accumulation des deux hémorphines et notamment de la LVVh-7. La formation de la LVVh-7 est peu favorisée lorsque l'hémoglobine est hydrolysée par la pepsine selon un mécanisme "one by one", caractéristique de la présence de la protéine substrat dans son état natif dans le tampon seul (étude du chapitre I). Or, dans le cas de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine dans le système biphasique tampon / octan-1-ol, la dénaturation favoriserait d'avantage l'apparition d'un mécanisme "zipper" (figure 59), tel qu'il apparaît lors de l'hydrolyse de l'hémoglobine en présence d'urée. Nous avons montré, d'après les études du chapitre I, que ce mécanisme favorise nettement la production de la LVVh-7, ainsi que la VVh-7, qui sont des peptides intermédiaires, comparé au mécanisme "one by one".

### *Suivi des populations peptidiques.*

L'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine à 1 % (p/v) a été menée à 23°C sur une période de 24 heures dans le tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5, en présence de 50 % (v/v) d'octan-1-ol, sous faible agitation de façon à ne pas créer d'émulsion.

Des prélèvements ont été effectués au cours du temps. Après centrifugation, les phases aqueuses et organiques ont été fractionnées par CLHP en phase inverse sur une colonne de type C4. La figure 60 montre l'évolution des profils peptidiques des phases aqueuses au cours du temps.

Les profils des phases aqueuses mettent en évidence un avancement de la réaction d'hydrolyse de l'hémoglobine beaucoup plus marquée par rapport à celui observé avec le système biphasique tampon / butan-2-ol (figure 57) pour lequel les gros peptides hydrophobes s'accumulaient dans le milieu réactionnel. De plus, nous avons mis en évidence l'apparition de la LVVh-7 (colorée en bleu) et de la VVh-7 (colorée en rouge), comme indiqué sur la figure 60.

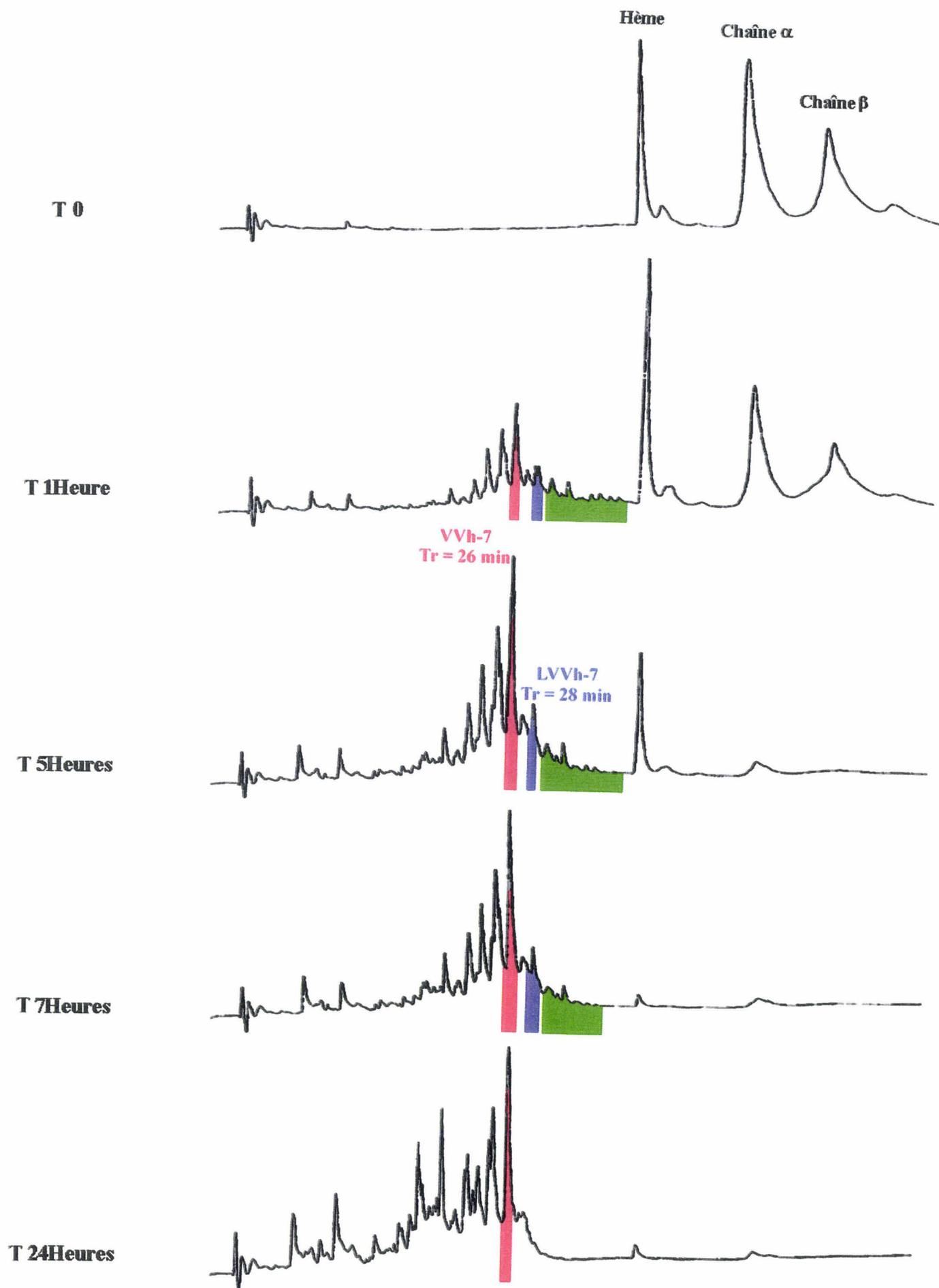
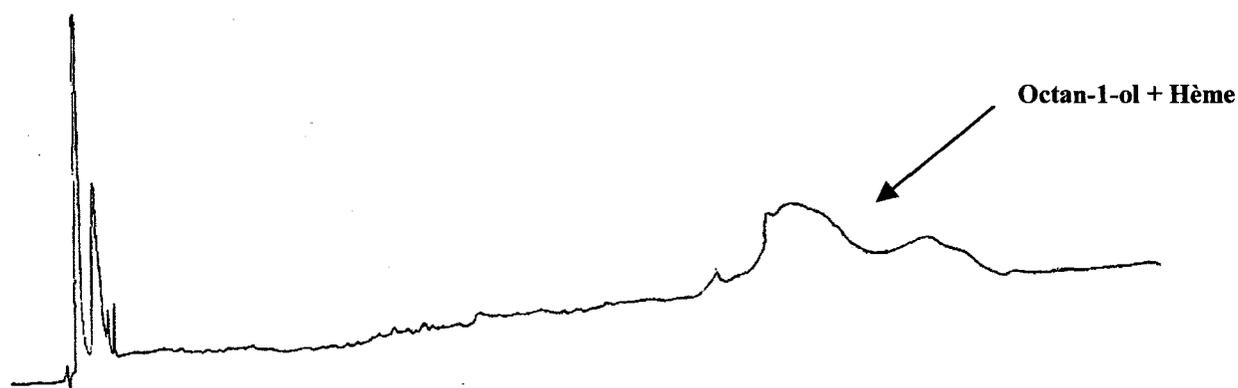


Figure 60. Profils peptidiques des phases aqueuses, issues de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine dans le système biphasique tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 / octan-1-ol (50/50, v/v).

L'analyse des phases organiques montre que, quelque soit le temps d'hydrolyse, comme dans le cas de l'hydrolyse de l'hémoglobine dans le système tampon / butan-2-ol, les mêmes profils chromatographiques sont obtenus. En effet, seuls l'octan-1-ol et l'hème sont présents dans chaque phase alcoolique prélevée. Le profil de la phase alcoolique, après cinq heures d'hydrolyse, présentée figure 61, montre qu'il n'y a pas de pics correspondant aux deux hémorphines. Ce phénomène est d'ailleurs constaté pendant toute la durée de l'hydrolyse pepsique. L'octan-1-ol seul n'est donc pas capable d'extraire les hémorphines produites dans la phase aqueuse au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine à pH 4,5.



**Figure 61. Profil chromatographique représentatif des phases organiques, issues de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine dans le système biphasique tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 / octan-1-ol (50/50, v/v).**

Zhao et Piot (1998b) ont mené l'extraction de la LVVh-7 et de la VVh-7 par des alcools aliphatiques de moins en moins polaires, à partir d'un hydrolysats peptidique final décoloré obtenu par hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine à pH 2. Ils ont ainsi montré que le taux d'extraction de la LVVh-7 et de la VVh-7 diminuait lorsque la polarité de l'alcool aliphatique utilisé augmentait. Leur résultat est donc en accord avec l'absence des deux hémorphines dans notre phase octan-1-ol, lors de l'hydrolyse pepsique à pH 4,5 de l'hémoglobine dans le système tampon / octan-1-ol.

Nous avons constaté la présence d'insolubles au cours de l'hydrolyse, aussi nous avons récupéré cette partie insoluble par centrifugation. Après resolubilisation dans du tampon borate pH 10, et filtration sur un filtre de cellulose 0,45  $\mu\text{m}$ , nous avons fractionné l'échantillon par CLHP en phase inverse sur une colonne de type C4. Cette partie insoluble ne

contenait pas de peptides mais était essentiellement constituée d'hème. La précipitation de l'hème est confirmée par sa disparition dans les profils chromatographiques des phases aqueuses du système tampon / octan-1-ol (figure 60). Lors de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine, dans le système biphasique tampon / octan-1-ol, nous avons montré que l'hémoglobine se dénature. Les interactions de l'hème avec les chaînes sont affaiblies et les tensions de surface présentes à l'interface des phases tampon et octan-1-ol engendreraient sa précipitation. Cependant, l'insolubilisation de l'hème ne semble pas perturber la réaction protéolytique.

Cette étude nous a montré que la pepsine est active et que la LVVh-7 et la VVh-7 sont produites au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine en présence d'octan-1-ol. Cependant, cet alcool n'est pas capable d'extraire les deux hémorphines. Nous avons alors étudié l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine dans le système biphasique tampon / octan-1-ol / butan-2-ol.

#### **IV.2.4. Etude de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine dans le système tampon / octan-1-ol / butan-2-ol.**

Le but de cette étude était d'obtenir à la fois une activité pepsique produisant la LVVh-7 et la VVh-7, grâce à la présence de l'octan-1-ol, une extraction efficace des deux hémorphines grâce à la présence du butan-2-ol.

##### ***Suivi de l'hydrolyse de l'hémoglobine.***

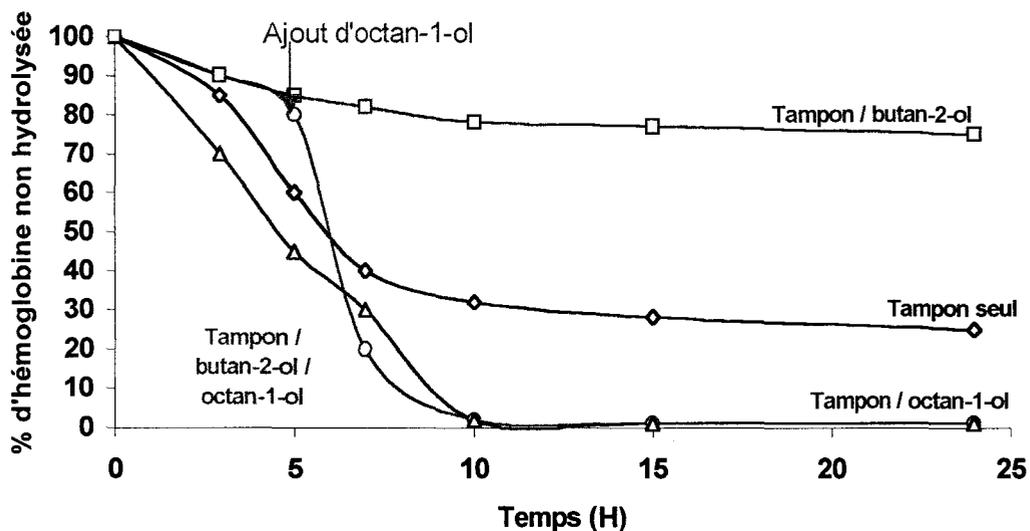
Nous avons mené l'hydrolyse de l'hémoglobine à 1 % (p/v) par la pepsine, à 23°C et sans émulsion, dans le tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5, en présence de butan-2-ol et d'octan-1-ol.

La mise en œuvre de cette hydrolyse a été menée en deux temps. Tout d'abord, l'hydrolyse pepsique a été réalisée dans le tampon acétate 0,1 M pH 4,5 en présence du butan-2-ol seul pendant cinq heures. Après ce temps d'hydrolyse, nous avons montré que les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  n'étaient plus hydrolysées probablement à cause de l'inactivation partielle de la pepsine. Ainsi nous avons ajouté l'octan-1-ol au système tampon / butan-2-ol, afin de montrer l'efficacité de l'octan-1-ol à recouvrer l'activité pepsique grâce à l'extraction du butan-2-ol

présent dans la phase aqueuse. Ceci a eu pour conséquence de favoriser la production de la LVVh-7 et de la VVh-7.

Pendant les cinq premières heures, l'hémoglobine a été hydrolysée par la pepsine dans le tampon acétate en présence de 35 % (v/v) de butan-2-ol (cette proportion d'alcool a été choisie arbitrairement). Ensuite, 15 % (v/v) d'octan-1-ol ont été ajoutés au système tampon / butan-2-ol sans émulsion.

Nous avons suivi l'évolution de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine à 1 % (p/v) et à pH 4,5 par la pepsine dans les conditions suivantes : dans le tampon acétate de sodium seul, dans ce même tampon en présence de butan-2-ol ou d'octan-1-ol, et enfin dans le système tampon / butan-2-ol, dans un premier temps, puis après l'ajout d'octan-1-ol dans un second temps. Nous avons suivi des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  au cours du temps (figure 62).



**Figure 62. Evolution de la concentration en hémoglobine au cours de l'hydrolyse pepsique à pH 4,5 et à 23°C: dans le tampon acétate de sodium seul et dans les systèmes tampon/butan-2-ol (50/50, v/v), tampon/octan-1-ol (50/50, v/v) et tampon/butan-2-ol/octan-1-ol (50/35/15, v/v/v).**

Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont hydrolysées lentement lors de l'hydrolyse en présence de butan-2-ol ; après cinq heures d'hydrolyse, 85 % de l'hémoglobine ne sont pas hydrolysés. Ce taux diminue très rapidement après l'ajout de l'octan-1-ol : toute l'hémoglobine est dégradée seulement cinq heures après l'ajout d'octan-1-ol. Cela traduit le recouvrement de l'activité de

la pepsine lorsque l'octan-1-ol est ajouté au système tampon / butan-2-ol, comme on a pu l'observer avec l'évolution des profils peptidiques en CLHP en phase inverse.

### *Suivi des populations peptidiques.*

La cinétique d'évolution de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine au cours de ces deux phases, est observable sur les profils chromatographiques des phases aqueuses de la figure 63. Ces profils proviennent du fractionnement, par CLHP en phase inverse sur une colonne de type C4, des prélèvements des phases aqueuses et organiques à B<sub>5H</sub>, BO<sub>3H</sub>, BO<sub>5H</sub>, BO<sub>7H</sub> et BO<sub>20H</sub>, ("B" désignant l'hydrolyse pepsique en présence du butan-2-ol seul et "BO" l'hydrolyse pepsique après l'ajout de l'octan-1-ol au système tampon / butan-2-ol).

Lors de la première phase d'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine, en présence du butan-2-ol, l'évolution cinétique de la réaction protéolytique est fortement ralentie. Seuls les gros peptides hydrophobes (colorés en vert) s'accumulent dans la phase aqueuse. Ce résultat confirme l'étude de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine dans le système tampon / butan-2-ol (paragraphe IV.2.2.), qui a montré l'inactivation partielle de la pepsine par la présence du butan-2-ol dans le tampon acétate de sodium.

L'ajout de l'octan-1-ol, après cinq heures d'hydrolyse dans le système tampon / butan-2-ol, provoque une cinétique d'hydrolyse pepsique plus rapide que celle dans le système sans octan-1-ol. Nous observons une accumulation plus importante des gros peptides hydrophobes mais aussi la génération de peptides de plus en plus hydrophiles, tout au long de la réaction protéolytique. Ce résultat serait montré clairement le recouvrement de l'activité de la pepsine, grâce à l'extraction du butan-2-ol présent dans la phase aqueuse par l'octan-1-ol. Parmi les peptides générés dans le tampon acétate, nous avons détecté la présence de la LVVh-7 et de la VVh-7, par comparaison des dérivées secondes des spectres UV entre les peptides élués avec celles des hémorphines de la librairie spectrale.

La figure 64 montre les profils chromatographiques des phases organiques : le profil correspondant à cinq heures d'hydrolyse dans le système tampon / butan-2-ol (désigné par B<sub>5H</sub>), puis les profils correspondant à 3, 5, 7 et 20 heures d'hydrolyse dans le système tampon / butan-2-ol / octan-1-ol (désignés par BO<sub>3H</sub>, BO<sub>5H</sub>, BO<sub>7H</sub> et BO<sub>20H</sub>).

Lorsque l'hydrolyse pepsique a lieu dans le tampon acétate pH 4,5 en présence du butan-2-ol seul, les deux hémorphines ne sont pas détectées. Cependant, après l'ajout de l'octan-1-ol dans le système tampon / butan-2-ol, la LVVh-7 et la VVh-7 sont détectées dans la phase organique composée du butan-2-ol et de l'octan-1-ol. Après comparaison des

dérivées secondes des spectres avec notre librairie spectrale, nous avons détecté la présence de la LVVh-7, avec un temps de rétention d'environ 28,5 minutes, et de la VVh-7, avec un temps de rétention d'environ 27 minutes.

Ces résultats sont en accord avec les hydrolyses dans les systèmes tampon / butan-2-ol et tampon / octan-1-ol. En effet, nous avons montré l'inactivation partielle de la pepsine lors de la mise en œuvre de l'hydrolyse enzymatique dans le système biphasique tampon / butan-2-ol, ce qui a engendré l'absence de la LVVh-7 et VVh-7 dans le milieu réactionnel. Par contre, la mise en œuvre de la pepsine dans le système biphasique tampon / octan-1-ol a montré la production des deux hémorphines dans la phase aqueuse, mais leur présence n'a pas été détectée dans la phase alcoolique.

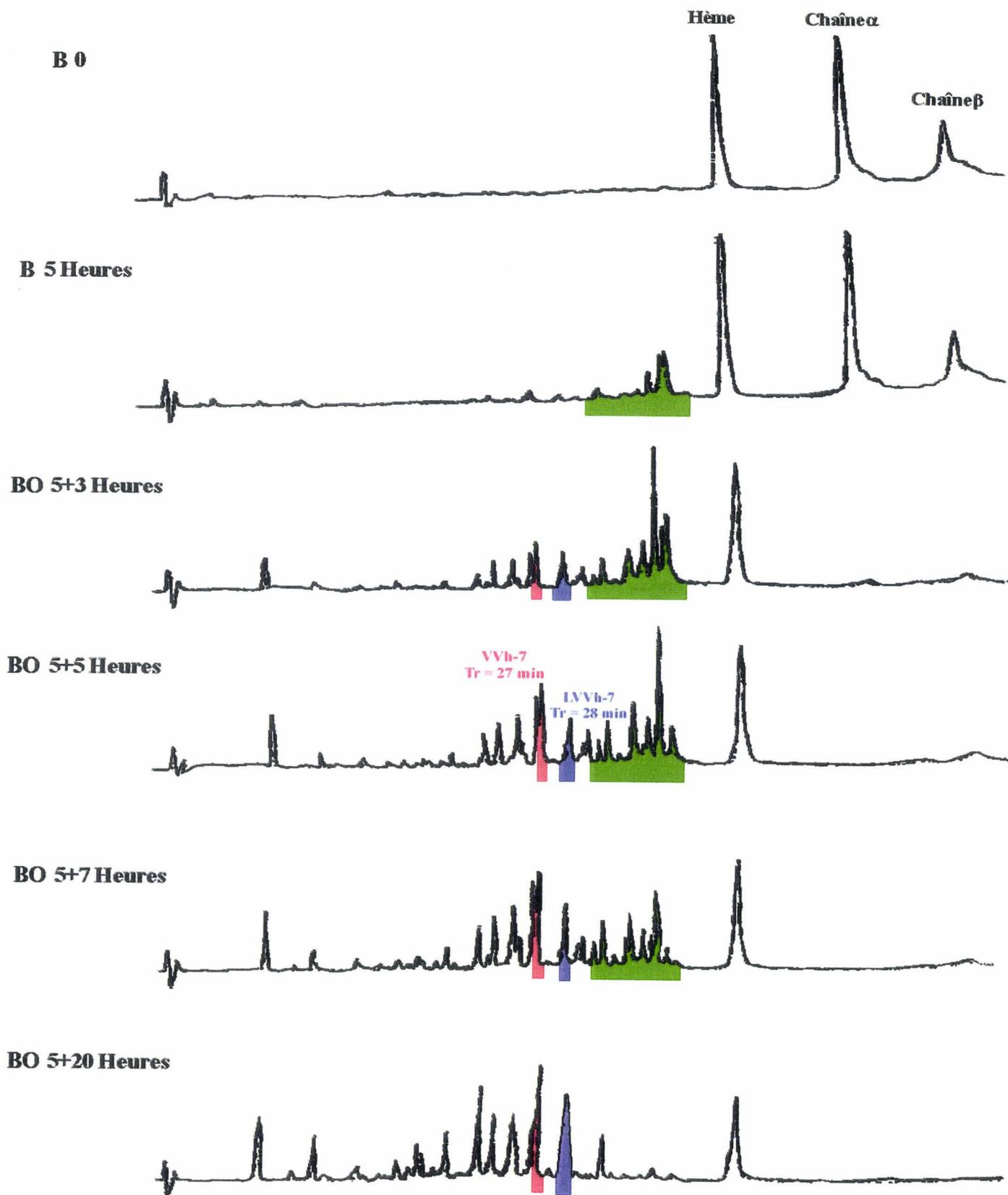


Figure 63. Profils chromatographiques des phases aqueuses, issues de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine dans le système tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 / butan-2-ol (50/35, v/v) puis après l'ajout d'octan-1-ol, proportion finale tampon/butan-2-ol/octan-1-ol (50/35/15, v/v/v) .

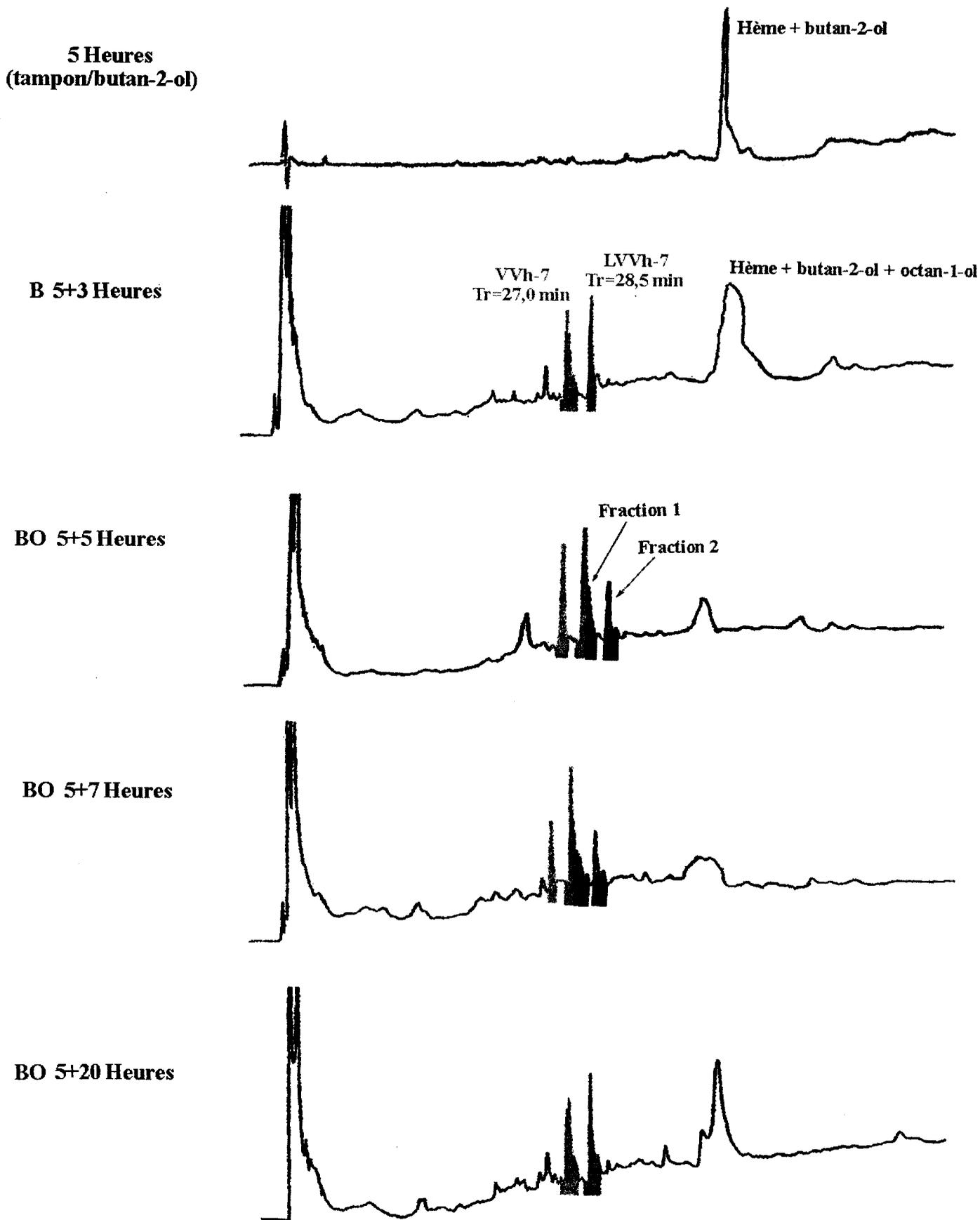


Figure 64. Profils chromatographiques des phases organiques, issues de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine dans le système tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 / butan-2-ol (50/35, v/v) puis après l'ajout d'octan-1-ol (proportion finale tampon/butan-2-ol/octan-1-ol (50/35/15, v/v/v) .

Nous avons montré que la production et l'extraction des deux hémorphines ont seulement lieu lorsque le butan-2-ol et l'octan-1-ol sont présents. Au cours de l'hydrolyse, deux autres peptides sont extraits par la phase alcoolique (désignés par fraction 1 et fraction 2) de ce système biphasique. Chaque fraction contient un seul peptide et leurs masses ont été déterminées par spectrométrie de masse en mode MALDI (figure 65).

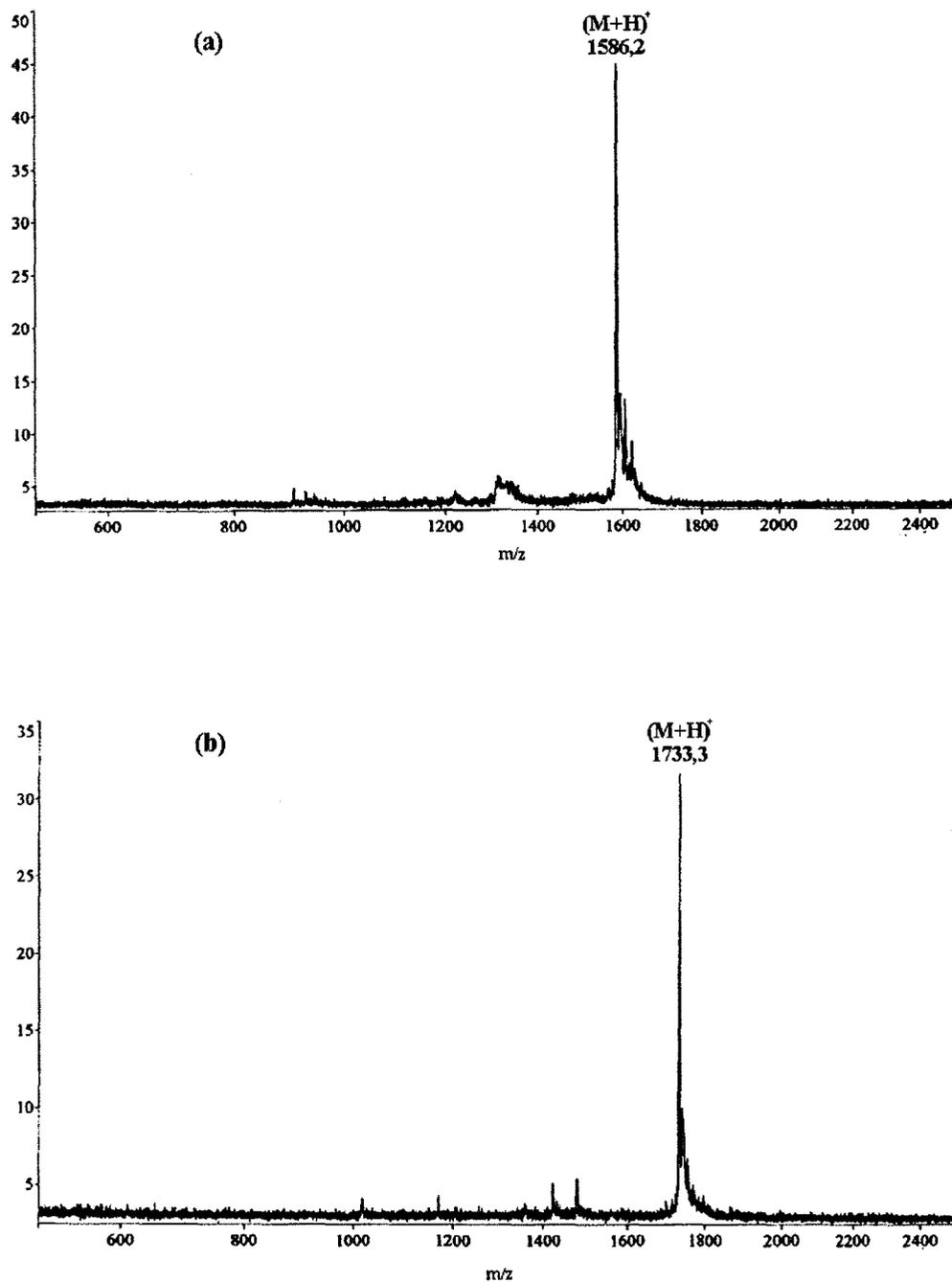


Figure 65. Spectre de masse en désorption laser de la fraction 1 (a) et de la fraction 2 (b).

## Conclusion

La nécessité de la présence du butan-2-ol et de l'octan-1-ol, au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine, est indispensable à l'extraction de la LVVh-7 et de la VVh-7.

Lors de la mise en œuvre de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine dans le système biphasique tampon / butan-2-ol à pH 4,5 et sans émulsion, nous avons montré une inactivation partielle de l'activité de la pepsine, qui s'est caractérisée par l'absence des deux hémorphines dans la phase tampon. Cependant, cet alcool aliphatique était indispensable à l'extraction des hémorphines. Nous avons donc utilisé l'octan-1-ol comme co-solvant, afin d'extraire le butan-2-ol présent dans la phase aqueuse.

Lors de la mise en œuvre de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine dans le système biphasique tampon / octan-1-ol à pH 4,5 et sans émulsion, nous avons montré que la pepsine était active et la présence des deux hémorphines dans le milieu réactionnel. Cependant, l'octan-1-ol était incapable d'extraire les deux peptides opioïdes.

La combinaison des deux alcools a donc été mise en œuvre au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine à pH 4,5 et sans émulsion. Nous avons montré un recouvrement de l'activité de la pepsine, lié à la présence de l'octan-1-ol, ainsi que l'extraction de la LVVh-7 et VVh-7 produites dans le milieu réactionnel, liée à la présence du butan-2-ol dans la phase organique.

## **CHAPITRE V**

# **UTILISATION D'UN PLAN DE MELANGES POUR LA MISE AU POINT D'UN REACTEUR AVEC LA PEPSINE INSOLUBILISEE DANS UN SYSTEME DE SOLVANTS BIPHASIQUES POUR LA PREPARATION DES HEMORPHINES**

Nous avons montré dans le chapitre précédent que la mise en œuvre de l'extraction de la LVVh-7 et de la VVh-7 nécessite la présence du butan-2-ol et de l'octan-1-ol. D'une part, l'octan-1-ol permet de rendre non miscible à l'eau le butan-2-ol responsable de la perte d'activité de la pepsine présente en solution dans la phase aqueuse ; d'autre part, le butan-2-ol, permet la solubilisation des deux hémorphines dans la phase alcoolique.

Afin d'optimiser la productivité des deux hémorphines avec le système tampon/butan-2-ol/octan-1-ol, nous avons utilisé un ensemble de techniques de la Méthodologie de la Recherche Expérimentale (Cornell 1990 ; Pierlot et coll. 1998) appliqués aux mélanges.

Une démarche classique aurait consisté à faire varier chaque paramètre étudié de manière indépendante les uns des autres, jusqu'à obtention du résultat désiré. Cette démarche est coûteuse en nombre d'essais et elle ne traduit que l'effet du paramètre étudié indépendamment de tous les autres.

Une autre démarche, plus sûre et dans l'ensemble plus économe en nombre d'essais à faire, revient à traduire les variations de Y en fonction de la composition du mélange par une relation  $Y=f(x_i)$ . Cette relation devra être valide, c'est-à-dire traduire fidèlement les variations de Y en fonction des  $x_i$ , et aussi simple que possible car le nombre de mélanges à réaliser croît avec la complexité de la relation. Lorsque cette équation est à disposition, le tracé des courbes de réponses donne la région des mélanges conforme à la spécification, telle que la détermination d'un mélange optimum recherché. Cette seconde démarche expérimentale nécessite l'utilisation des matrices d'expériences appliquées aux mélanges et rend de ce fait cette méthode plus rationnelle que la première démarche décrite auparavant. Ces matrices d'expériences ont été décrites par Scheffé en 1958 et en 1962 sous le nom de réseaux-simplex.

Le plan de mélange a été réalisé avec la pepsine insolubilisée dans la perspective d'un réacteur ouvert pour préparer la LVVh-7 et la VVh-7 à partir de l'hémoglobine bovine. L'insolubilisation de l'enzyme fera l'objet de la première partie de ce chapitre.

L'application d'un plan de mélanges pour l'extraction des deux hémorphines a ensuite permis de déterminer un mélange tampon/butan-2-ol/octan-1-ol optimum et de définir un futur réacteur biphasique ouvert.

A cause des points d'ébullition du butan-2-ol et de l'octan-1-ol trop élevés, la récupération des deux hémorphines par évaporation était impossible. Nous avons donc recherché un support solide capable d'adsorber les peptides opioïdes. Cette étude fera l'objet de la dernière partie de ce chapitre. Ainsi le couplage de l'extraction des deux hémorphines au

cours de l'hydrolyse dans un réacteur ouvert, leur recouvrement par adsorption sur le support solide et le recyclage du solvant sera défini.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article accepté à publication dans *Biotechnology and Applied Biochemistry* : Article 4.

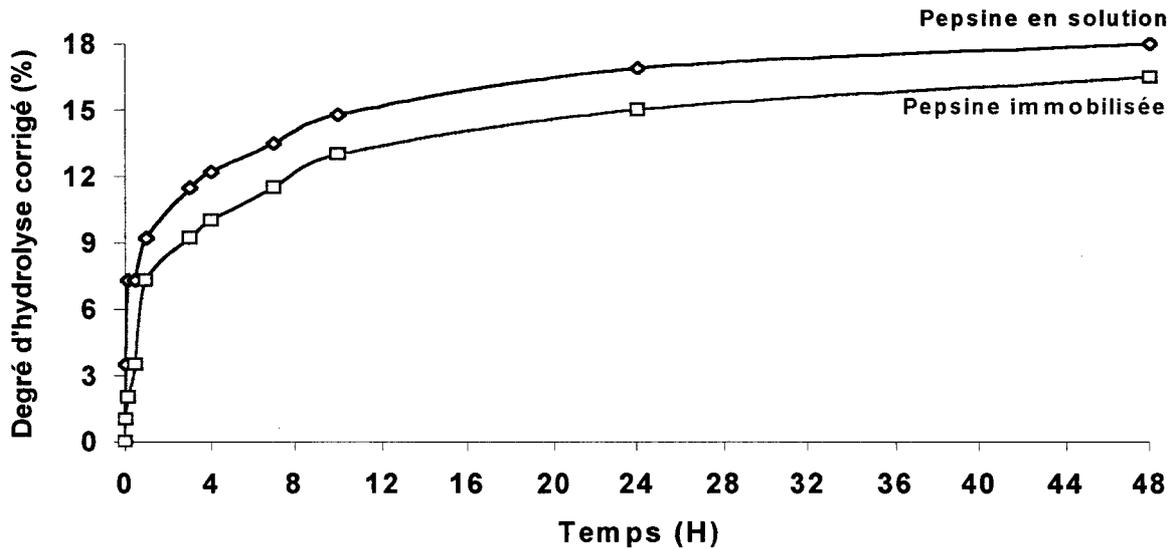
## **V.1 Optimisation de l'extraction de la LVV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-7 au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine insolubilisée.**

### **V.1.1. Insolubilisation de la pepsine.**

Afin de concevoir un réacteur pour la préparation de la LVVh-7 et de la VVh-7, nous avons insolubilisé la pepsine sur la Duolite A568, résine hydrophobe comportant des groupements amine tertiaire. La pepsine, de p*H*i voisin de 1, à pH 4,5 (pH utilisé pendant l'immobilisation), est chargée négativement. Après insolubilisation nous sommes parvenus à un rendement de fixation de l'enzyme sur la résine de 100 %.

Nous avons mené l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine à 1 % (p/v), dénaturée par l'urée, par la pepsine insolubilisée sur la Duolite A568. 7,5 grammes de résine, correspondant à  $6 \cdot 10^5$  Unités d'activité Enzymatique, ont été ajoutés à 50 ml de tampon acétate de sodium 0,1 M à pH 4,5 et à 23°C, contenant l'hémoglobine 1 % (p/v). Dans le chapitre précédent, nous avons montré que le mécanisme d'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine, dans le système tampon / butan-2-ol / octan-1-ol, s'apparentait fortement à un mécanisme "zipper", comme celui rencontré lors de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine dénaturée par l'urée (chapitre I). Nous avons donc étudié l'hydrolyse de l'hémoglobine dénaturée par l'urée, par la pepsine immobilisée, de façon à déterminer l'évolution de la cinétique d'hydrolyse de l'hémoglobine. Nous avons augmenté d'un facteur 6 la quantité de pepsine, insolubilisée sur la résine, dans le réacteur de façon à limiter les contraintes diffusionnelles et à obtenir une cinétique d'hydrolyse de l'hémoglobine à 1 % (p/v) dénaturée par l'urée similaire à celle obtenue avec la pepsine en solution.

Nous avons comparé les cinétiques d'hydrolyse de l'hémoglobine à 1 % (p/v), dans le tampon acétate pH 4,5 contenant 5,3 M d'urée, par la pepsine en solution ( $1 \cdot 10^5$  U.A.E.), et par la pepsine insolubilisée ( $6 \cdot 10^5$  U.A.E.). La figure 66 montre l'évolution du degré d'hydrolyse corrigé en fonction du temps d'hydrolyse, au cours de 48 heures de réaction protéolytique.



**Figure 66. Comparaison de la cinétique d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine à 1 % (p/v) (50 ml) dans le tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 contenant 5,3 M d'urée: avec la pepsine en solution ( $1.10^5$  U.A.E., 30 mg) et avec la pepsine immobilisée sur la Duolite A568 ( $6.10^5$  U.A.E., 180 mg/7,5 g résine).**

Nous pouvons constater que, malgré l'augmentation de la quantité de pepsine, une différence peu sensible est observée quant aux cinétiques d'hydrolyse. La cinétique d'hydrolyse à pH 4,5 de l'hémoglobine dénaturée est sensiblement plus rapide avec la pepsine en solution qu'avec celle menée avec la pepsine immobilisée. En effet, un DHc de 15 % est atteint au bout de 10 heures d'hydrolyse avec la pepsine en solution, tandis qu'un DHc de 13 % est atteint dans le cas de l'hydrolyse par la pepsine insolubilisée au bout du même temps.

Par conséquent, nous avons comparé les cinétiques d'apparition de la LVVh-7 (figure 67) et de la VVh-7 (figure 68) au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine dénaturée par l'urée, par la pepsine en solution et immobilisée sur la résine.

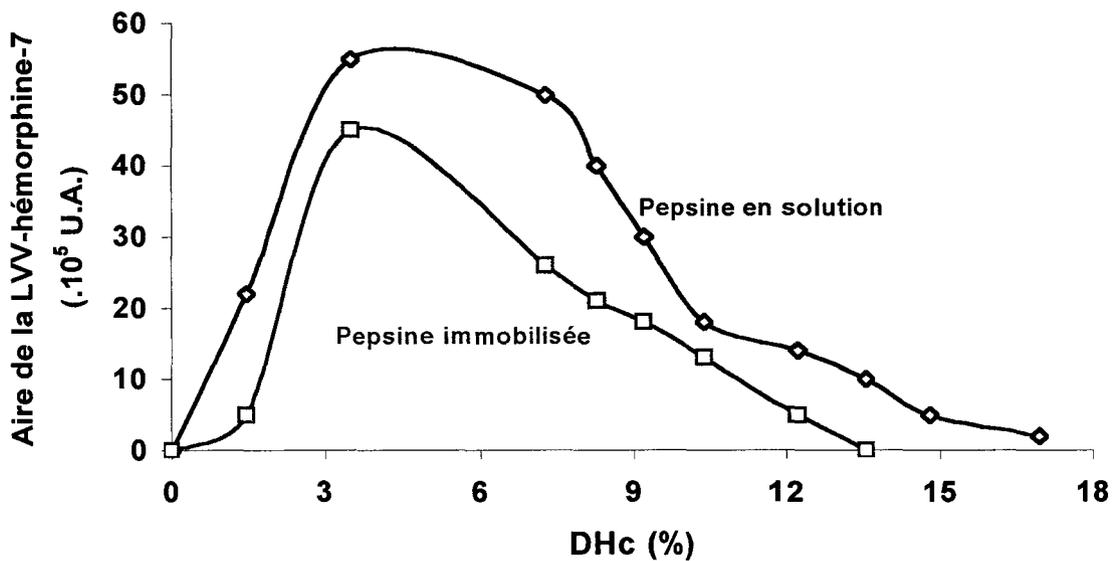


Figure 67. Comparaison des cinétiques d'apparition de la *LVV-hémorphine-7* au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine à 1 % (p/v), dénaturée à l'urée et à pH 4,5, par la pepsine en solution ( $1.10^5$  U.A.E., 30 mg) et par la pepsine immobilisée sur la Duolite A568 ( $6.10^5$  U.A.E., 180 mg/7,5 g résine).

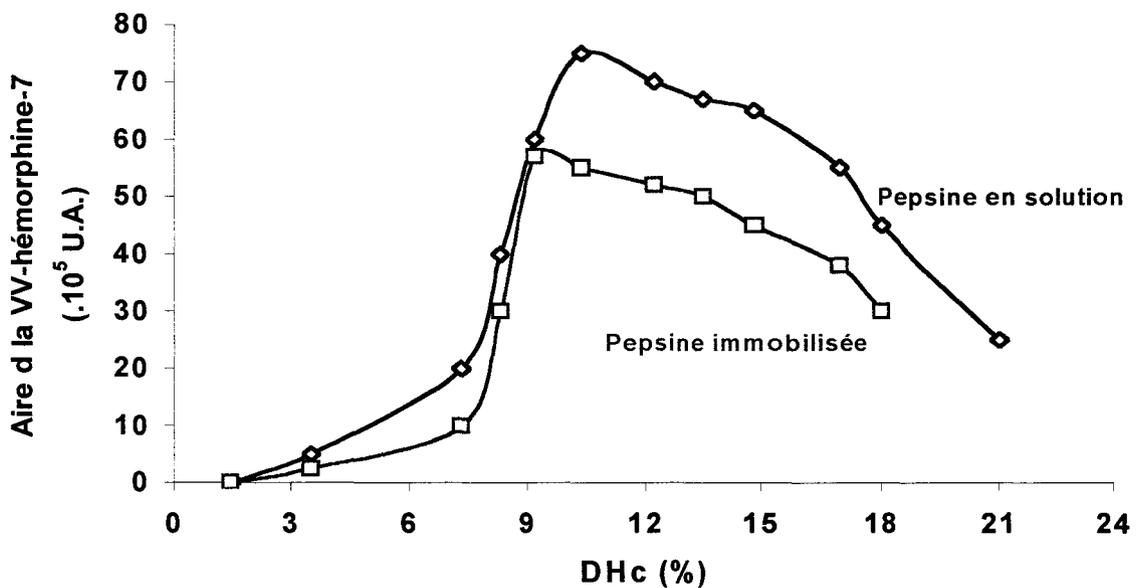


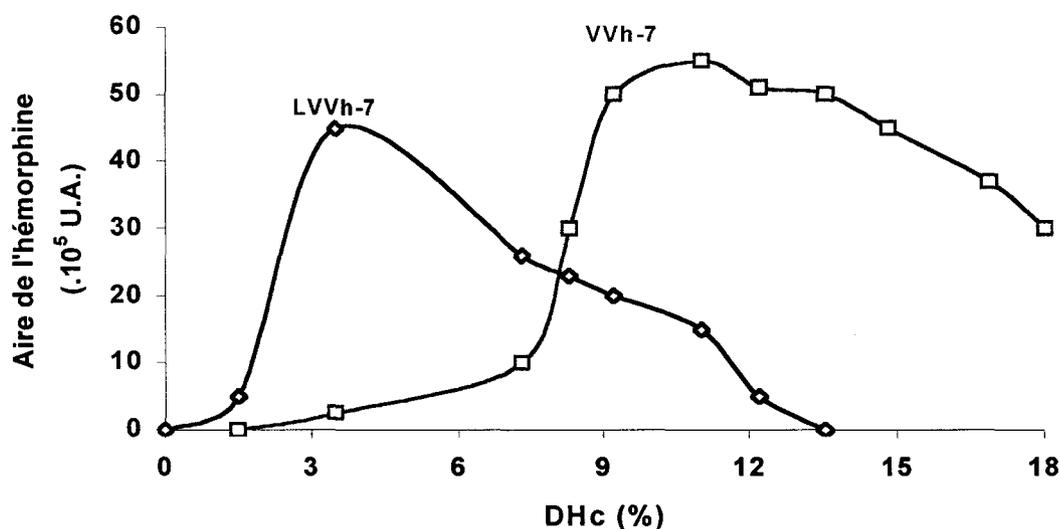
Figure 68. Comparaison des cinétiques d'apparition de la *VV-hémorphine-7* au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine 1 % (p/v), dénaturée à l'urée et à pH 4,5, par la pepsine en solution ( $1.10^5$  U.A.E., 30 mg) et par la pepsine immobilisée sur la Duolite A568 ( $6.10^5$  U.A.E., 180 mg/7,5 g résine).

La concentration de la LVVh-7 croît jusqu'à un DHc d'environ 3 %, que ce soit pour l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine en solution ou immobilisée. Puis, dans les deux cas, la concentration de l'hémorphine diminue.

En ce qui concerne la VVh-7, sa concentration augmente pour atteindre son maximum aux environs de 11 % de DHc, puis elle diminue, et cela que ce soit pendant l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine en solution ou immobilisée sur la résine Duolite.

Nous pouvons donc constater que les deux hémorphines sont produites en quantité maximale pour le même DHc, quelque soit le type de mise en œuvre de la pepsine (en solution ou immobilisée).

La figure suivante montre les cinétiques d'apparition de la LVVh-7 et de la VVh-7 au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine à 1 % (p/v), dénaturée à l'urée, par la pepsine insolubilisée sur la Duolite.



**Figure 69. Cinétiques d'apparition de la LVV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-7 au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine à 1 % (p/v), dénaturée à l'urée et à pH 4,5, par la pepsine immobilisée sur la Duolite A568 ( $6 \cdot 10^5$  U.A.E., 180 mg/7,5 g résine).**

Ces cinétiques ressemblent à celles d'apparition des deux hémorphines dans le milieu urée, comme décrit dans les chapitres I et II. Nous observons que la LVVh-7 et la VVh-7 sont toutes les deux détectées dans le milieu réactionnel au DHc 11 %, qui correspond environ à trois heures de réaction protéolytique avec la pepsine immobilisée sur la résine. Nous avons conservé ce temps d'hydrolyse pour notre étude d'optimisation de l'extraction des deux hémorphines dans le système tampon / butan-2-ol / octan-1-ol.

### V.1.2. Mise en place des plans de mélanges pour l'optimisation de l'extraction des hémorphines par le système tampon/butan-2-ol/octan-1-ol.

Nous avons fait appel à l'approche méthodologique des mélanges pour optimiser la composition des constituants tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 ; butan-2-ol et octan-1-ol. Dans ce cas, les facteurs dont nous allons mesurer l'impact sur l'extraction des deux hémorphines sont les proportions de chaque composant. Ils ont deux particularités importantes :

- leur somme est égale à l'unité, ils ne sont donc pas indépendants;
- leurs valeurs sont des nombres sans dimension, parfaitement comparables; une valeur de 0,1 a la même signification, qu'elle représente la proportion d'un antioxydant dans une crème dessert, ou la proportion d'un cépage dans un vin.

On représente généralement le nombre de composants d'un mélange par  $q$  et la proportion du composant  $i$  par  $X_i$ . Dans notre cas:

$q=3$  et  $i$  désignent le tampon acétate de sodium, l'octan-1-ol et le butan-2-ol;

avec les contraintes suivantes :

$$X_i \geq 0 \text{ et } \sum_i X_i = 1, i = 3$$

Ces contraintes sur les valeurs que peut prendre  $X_i$  font que les mélanges ne peuvent pas être traités de la même façon. Toute variation de la proportion d'un composant entraîne une variation de la proportion des autres composants.

#### V.1.2.1. Domaine expérimental.

Le domaine expérimental possible est un simplexe régulier de dimension  $(q-1)$ . Dans notre cas où  $q=3$ , le domaine expérimental est un triangle équilatéral, représenté sur la figure suivante :

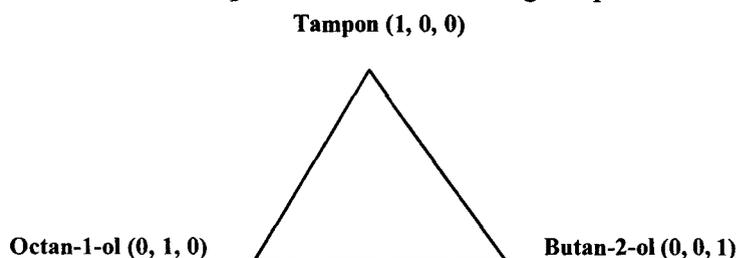


Figure 70. Domaine expérimental dans l'espace des facteurs pour  $q=3$ .

Les coordonnées représentant les valeurs de  $X_i$ ,  $i=3$ , sont appelées: coordonnées du simplexe. Les sommets du simplexe représentent les composants purs, tandis les points intérieurs constituent des mélanges dans lesquels tous les composants sont présents.

*V.1.2.2. Modèles de surfaces de réponses.*

Les premiers travaux portant sur cette approche méthodologique datent d'une quarantaine d'année, mais c'est en 1958, que Scheffé a publié les bases de la stratégie expérimentale optimale appliquée aux mélanges. Les travaux de Scheffé peuvent être considérés comme étant ceux qui ont apporté les fondements dans ce domaine et sont restés (et restent encore) à l'origine de beaucoup d'applications (Scheffé (1958, 1962)).

Scheffé (1958) propose que, dans le domaine expérimental défini par les  $q$  composants, la réponse expérimentale étudiée soit représentée par un polynôme de la forme:

$$Y = b_0 + \sum_i b_i X_i + \sum_{i,j} b_{ij} X_i X_j + \sum_{i,j,n} b_{ijn} X_i X_j X_n + \dots$$

où  $b_0$  représente la moyenne des effets (b) de chaque constituant  $i, j, n$ ,  $\sum_i b_i X_i$  représente l'effet (b) de la proportion ( $X$ ) de chaque constituant  $i$ ,  $\sum_{i,j} b_{ij} X_i X_j$  représente la somme des effets (b), résultant des interactions entre les constituants  $i$  et  $j$ , et  $\sum_{i,j,n} b_{ijn} X_i X_j X_n$  représente la somme des effets (b), résultant des interactions entre les constituants  $i, j, n$ . Les termes  $b_0, b_i, b_{ij}$  et  $b_{ijn}$  sont les coefficients du polynôme.

En ce qui concerne notre système de mélanges tampon / octan-1-ol / butan-2-ol, où  $q=3$ , nous avons un polynôme de la forme:

$$Y_{LVVh-7 \text{ ou } VVh-7} = b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{23} X_2 X_3,$$

avec  $Y$  représentant la réponse que l'on mesure (extraction quantitative de la LVVh-7 et de la VVh-7), et "1", "2" et "3" correspondant respectivement aux constituants "tampon", "octan-1-ol" et "butan-2-ol".

Pour obtenir les estimations des coefficients des modèles avec la possibilité d'avoir la meilleure qualité prévisionnelle dans le domaine expérimental étudié, Scheffé propose une matrice d'expériences qu'il désigne sous le nom de **Réseau Simplexe**. Dans le cas de  $q$

constituants et pour un polynôme de degré  $m$ , le Réseau Simplexe correspondant est noté  $\{q, m\}$ . Les coordonnées de chaque point sont des multiples de  $1/m$  et telles que:

$$\sum_i X_i = 1, i = 1, 2, \dots, q.$$

Chaque constituant peut donc prendre les  $m+1$  valeurs espacées:  $0, 1/m, 2/m, \dots, m/m$ . Le Réseau Simplexe de Scheffé comprend tous les points obtenus en faisant toutes les combinaisons possibles de ces  $(m+1)$  valeurs. Le nombre de points d'un Réseau Simplexe  $\{q, m\}$  est donné par la formule:

$$N = (m+q-1)! / (q-1)!m!$$

Dans le cas de notre système d'extraction, le modèle de Scheffé est de la forme:

$$\{3, 2\}, \text{ avec } q = 3 \text{ et } m = 2,$$

et le Réseau Simplexe est donné dans le tableau 7 suivant :

Expérience N°	Tampon	Octan-1-ol	Butan-2-ol
1	1,0	0,0	0,0
2	0,0	1,0	0,0
3	0,0	0,0	1,0
4	0,5	0,5	0,0
5	0,5	0,0	0,5
6	0,0	0,5	0,5

**Tableau 7. Réseau Simplexe  $\{3, 2\}$  utilisé pour l'optimisation de l'extraction de la LVVh-7 et de la VVh-7, dans le système tampon/octan-1-ol/butan-2-ol.**

#### *V.1.2.3. Avantages et inconvénients.*

Les Réseaux Simplexes de Scheffé présentent de nombreuses qualités:

- une construction facile avec un nombre d'expériences minimal. Ils contiennent autant de points qu'il y a de coefficients dans le polynôme correspondant, ce qui permet une résolution directe qui n'a plus beaucoup d'intérêt depuis la banalisation par outil informatique;
- une démarche séquentielle: du moins jusqu'au modèle de degré 3, en effet, la démarche n'est strictement séquentielle que jusqu'au modèle cubique réduit (désignation du modèle de troisième degré) inclus. Lorsqu'on étudie les modèles de degré supérieur, beaucoup de points

déjà obtenus n'entrent pas dans le nouveau Réseau Simplexe. Cependant, on peut tourner cet inconvénient en prenant ces points comme points tests;

- un test de validité du modèle par l'adjonction de points tests;
- un modèle prévisionnel permettant d'obtenir une prévision de la réponse avec une variance minimale.

Mais les Réseaux Simplexes présentent également certains inconvénients:

- ils sont coûteux en nombre de points quand le degré augmente. Le tableau 8 établit le nombre de points et de coefficients d'un Réseau Simplexe  $\{q, m\}$ .

Ceci n'est dû qu'à l'accroissement du nombre de coefficients et non au mode de construction.

Le nombre de points d'un Réseau Simplexe  $\{q, m\}$  est donné par la formule :

$$N = (m+q-1)! / (q-1)! m!$$

<i>q</i>	<i>m</i>		
	2	3	4
3	6	10	15
4	10	20	35
5	15	35	70
6	21	56	126
8	36	120	330
10	55	220	715

**Tableau 8. Nombre de points et de coefficients d'un Réseau Simplexe  $\{q, m\}$ .**

Cela explique en partie, pourquoi l'étude des modèles polynomiaux de degré supérieur à quatre est très rarement effectuée.

- Les coefficients d'un modèle, en général prévisionnel (c'est-à-dire destiné à calculer la réponse correspondant à un mélange quelconque où tous les constituants sont présents) sont calculés à partir d'expériences ne faisant intervenir, dans la plupart des cas, que des mélanges plus simples à  $q'$  constituants ( $q' < q$ ) (corps purs, mélanges binaires, etc). C'est une évidence pour le modèle du premier degré où les expériences sont faites seulement sur les corps purs.

#### V.1.2.4. Les Réseaux Simplexes Centrés de Scheffé.

Scheffé (1962) a proposé une modification de ses Réseaux Simplexes. Il propose alors un modèle empirique réduit ne contenant que des termes produit. Dans ce modèle, comme d'ailleurs tous les autres modèles de surface de réponse, les termes produit de degré croissant sont additionnés au fur et à mesure. Le modèle proposé, appelé modèle **Simplexe Centré**, est donc le suivant :

$$Y = \sum_i b_i X_i + \sum_i \sum_j b_{ij} X_i X_j + \dots + b_{12\dots q} X_1 X_2 \dots X_q$$

Son degré maximum est égal à  $q$  et il comprend au maximum  $2^q - 1$  termes. Un seul Réseau Simplexe Centré pour un nombre  $q$  de constituants existe avec autant de points qu'il figure de coefficients. Le Réseau Simplexe Centré construit pour  $q$  constituants comprend  $2^q - 1$  points, ce qui devient vite prohibitif quand  $q$  augmente. On se limitera généralement aux degrés 2 ou 3. Dans le cas du degré 3, le modèle simplexe centré est souvent désigné par le terme : **modèle cubique réduit**.

Dans le cas de notre système tampon / octan-1-ol / butan-2-ol, c'est-à-dire un modèle simplexe centré avec  $q=3$ , le Réseau Simplexe centré est donné dans le tableau 9.

Expérience N°	Tampon	Octan-1-ol	Butan-2-ol
1	1,000	0,000	0,000
2	0,000	1,000	0,000
3	0,000	0,000	1,000
4	0,500	0,500	0,000
5	0,500	0,000	0,500
6	0,000	0,500	0,500
7	0,333	0,333	0,333

Tableau 9. Réseau Simplexe centré pour  $q=3$ .

### V.1.2.5. Points tests.

Il est conseillé d'ajouter aux réseaux simplexes, des **points tests**. Ces points doivent permettre de tester la validité du modèle postulé. En général, les points situés à l'intérieur du domaine expérimental sont ajoutés. Ils correspondent donc à des mélanges comprenant l'ensemble des composants.

Le tableau suivant décrit les points tests utilisés dans notre système d'extraction de chaque hémorphine, en fonction du nombre de constituants ( $q = 3$ ).

Expérience N°	Tampon	Octan-1-ol	Butan-2-ol
1	1,000	0,000	0,000
2	0,000	1,000	0,000
3	0,000	0,000	1,000
4	0,500	0,500	0,000
5	0,500	0,000	0,500
6	0,000	0,500	0,500
7	0,333	0,333	0,333
8	0,666	0,166	0,166
9	0,166	0,666	0,166
10	0,166	0,166	0,666

**Tableau 10. Réseau Simplexe centré et points tests pour  $q=3$ , utilisés dans nos plans de mélanges pour l'optimisation de l'extraction de la LVVh-7 et de la VVh-7 par le système tampon/octan-1-ol/butan-2-ol.**

Les points tests sont indiqués en rouge dans le tableau. Ils correspondent à des points internes au domaine expérimental, faisant ainsi intervenir ensemble les trois constituants tampon, octan-1-ol et butan-2-ol dans chaque expérience.

### V.1.2.6. Mélanges avec contraintes.

Jusqu'ici nous avons établi le domaine expérimental pour une étude de corps purs. Dans notre cas il nous faut imposer la présence des trois constituants tampon, octan-1-ol et butan-2-ol dans chaque expérience. Les études du chapitre précédent ont montré la nécessité

des deux solvants organiques octan-1-ol et butan-2-ol présents ensemble pour permettre l'extraction de la LVVh-7 et VVh-7.

Le domaine expérimental d'intérêt n'est donc pas tout le domaine expérimental possible : il est nécessaire de bien le décrire et pour cela, bien spécifier les contraintes sur les proportions des constituants. De plus, les points tests peuvent être augmentés puisque chaque constituant est présent dans tous les mélanges du domaine expérimental réduit.

Nous avons mené l'hydrolyse de l'hémoglobine (1 %, p/v) à 23°C dans le tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 par la pepsine immobilisée sur la résine Duolite ( $6.10^5$  U.A.E.) et en présence d'octan-1-ol et de butan-2-ol. Nous avons utilisé différentes quantités de solvants organiques, de façon à déterminer les contraintes sur les proportions en tampon, octan-1-ol et butan-2-ol. Nous avons imposé que la somme des trois constituants soient égales à 100 % (v/v).

Différentes hydrolyses pepsiques ont été menées pendant trois heures en présence soit de:

- 5 % (v/v) de tampon acétate / 5 % (v/v) d'octan-1-ol / 90 % (v/v) de butan-2-ol ;
- 5 % (v/v) de tampon acétate / 90 % (v/v) d'octan-1-ol / 5 % (v/v) de butan-2-ol
- 90 % (v/v) de tampon acétate / 5 % (v/v) d'octan-1-ol / 5 % (v/v) de butan-2-ol.

Ces proportions ont été choisies afin de vérifier si les deux hémorphines étaient extraites par la phase alcoolique des trois mélanges, au bout des trois heures de réaction protéolytique.

Après centrifugation à 3000 tours/min pendant dix minutes, les trois phases organiques ont été fractionnées par CLHP en phase inverse sur une colonne de type C4. Les deux hémorphines n'ont pas été détectées dans les phases alcooliques des trois mélanges testés. Nous avons donc restreint les proportions de chaque constituant à un minimum de 10 % (v/v) en tampon acétate, 10 % (v/v) en octan-1-ol et 10 % (v/v) en butan-2-ol. Par conséquent, les teneurs maximales en tampon, octan-1-ol et butan-2-ol étaient de 80 % (v/v).

Finalement, pour le plan de mélanges tampon / octan-1-ol / butan-2-ol pour l'extraction de la LVVh-7 et de la VVh-7 sont compris dans les proportions (v/v):

$$10 \% \leq \text{tampon} \leq 80 \%$$

$$10 \% \leq \text{octan-1-ol} \leq 80 \% \text{ et}$$

$$10 \% \leq \text{butan-2-ol} \leq 80 \%$$

La figure 71 résume le domaine expérimental restreint (présent dans le domaine expérimental possible) que nous avons utilisé dans le plan de mélanges pour l'optimisation de l'extraction de la LVVh-7 et pour l'optimisation de l'extraction de la VVh-7.

Cette figure délimite bien le domaine expérimental possible, qui se caractérise par le grand triangle équilatéral. Les sommets correspondent aux trois constituants tampon octan-1-ol et butan-2-ol. Dans le domaine expérimental restreint, utilisé dans nos plans de mélanges, les points de 1 à 7 constituent les sept mélanges du Réseau Simplexe centré et les points 8, 9 et 10 correspondent aux trois mélanges tests.

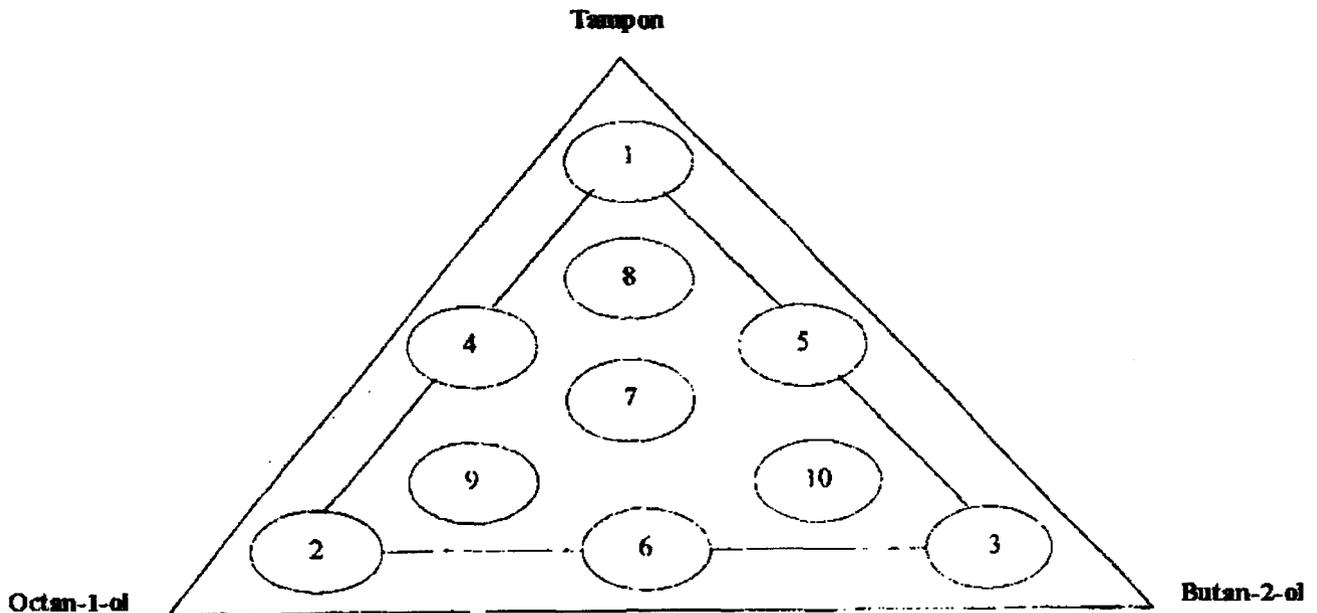


Figure 71. Représentation graphique des domaines expérimentaux possible et restreint, ce dernier étant utilisé pour l'extraction de la LVV-hémorphine-7 et VV-hémorphine-7.

Afin de déterminer les proportions volumiques de chaque constituant, nous avons établi les équations qui corrént la détermination des fractions volumiques (notée Z) des constituants tampon ( $Z_{tp}$ ), octan-1-ol ( $Z_{oct}$ ) et butan-2-ol ( $Z_{but}$ ), et les proportions X de chaque constituant:

$$Z_{tp} = 80 X_{tp} + 10 X_{oct} + 10 X_{but}$$

$$Z_{oct} = 10 X_{tp} + 80 X_{oct} + 10 X_{but}$$

$$Z_{but} = 10 X_{tp} + 10 X_{oct} + 80 X_{but}$$

avec  $Z_{tp} + Z_{oct} + Z_{but} = 100 \%$  et  $10 \% \leq Z_{tp} \leq 80 \%$

$$10 \% \leq Z_{oct} \leq 80 \%$$

$$10 \% \leq Z_{but} \leq 80 \%$$

Cela conduit à la construction du plan de mélanges, utilisés pour les extractions de la LVVh-7 et VVh-7, présenté dans le tableau suivant.

N° exp	Matrice d'expériences			Plan de mélanges		
	X <sub>tp</sub>	X <sub>oct</sub>	X <sub>but</sub>	% Tampon	% Octan-1-ol	% Butan-2-ol
1	1	0	0	80	10	10
2	0	1	0	10	80	10
3	0	0	1	10	10	80
4	1/2	1/2	0	45	45	10
5	1/2	0	1/2	45	10	45
6	0	1/2	1/2	10	45	45
7	1/3	1/3	1/3	33.3	33.3	33.3
8	2/3	1/6	1/6	56.6	21.7	21.7
9	1/6	2/3	1/6	21.7	56.6	21.7
10	1/6	1/6	2/3	21.7	21.7	56.6

**Tableau 11. Matrice d'expériences et plan de mélanges utilisés pour l'extraction de la LVV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-7.**

Les mélanges de 1 à 10, que nous avons utilisés pour extraire les deux hémorphines, sont désignés en rouge: les sept premiers constituent le Réseau Simplexe centré, tandis que les trois derniers mélanges permettront de tester la validité du modèle postulé.

### **V.1.3. Mise en application des plans de mélanges pour optimiser l'extraction des hémorphines au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine insolubilisée.**

Nous avons, dans un premier temps, fixé certaines conditions de mise en œuvre de l'hydrolyse pepsique, afin de déterminer uniquement l'influence de la composition en tampon, octan-1-ol et butan-2-ol sur le taux d'extraction de chaque hémorphine par la phase organique.

Selon l'étude effectuée au début de ce chapitre, la LVVh-7 et la VVh-7 sont détectées ensemble au même temps d'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine dénaturée (3 heures). Nous avons donc fixé ce temps d'hydrolyse de trois heures, dans le système tampon / octan-1-ol / butan-2-ol.

Nous avons fixé une vitesse d'agitation faible, de façon à ne pas créer d'émulsion entre la phase tampon et les solvants organiques utilisés, et la quantité de pepsine insolubilisée sur la Duolite.

L'extraction de la LVVh-7 et de la VVh-7 a été effectuée avec le mélange octan-1-ol / butan-2-ol, au cours des trois heures d'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine dans le tampon

acétate de sodium 0,1 M pH 4,5. L'application d'un plan de mélanges (figure 71), pour chaque hémorphine, nous a alors permis de déterminer un milieu optimal en tampon, octan-1-ol et butan-2-ol, par la mesure quantitative de chaque hémorphine au sein des phases organiques.

Celui-ci a été appliqué aux dix points du domaine expérimental réduit afin d'obtenir un modèle mathématique représentatif du système tampon / octan-1-ol / butan-2-ol pour chaque hémorphine, capable de prédire le résultat quantitatif de l'extraction en un point quelconque situé à l'intérieur du domaine expérimental réduit. Ce modèle mathématique a été construit de manière séquentielle, en testant des modèles de plus en plus compliqués utilisant des polynômes de degré de plus en plus élevé. Des points expérimentaux sont sélectionnés pour calculer les coefficients du modèle postulé. Puis, ce modèle est validé ou rejeté en comparant les résultats prédits en un point du domaine avec les valeurs expérimentales obtenues en ce point. Ces dernières sont obtenues après analyse quantitative de chaque hémorphine lors du fractionnement des phases alcooliques de chaque mélange tampon / octan-1-ol / butan-2-ol, par CLHP en phase inverse sur une colonne de type C4. Le modèle postulé est considéré comme donnant une prédiction adéquate de la réponse expérimentale si la différence des valeurs expérimentales et prédictives de l'extraction est inférieure à une valeur  $\Delta_{max}$ , calculée pour chaque expérience d'extraction de la LVVh-7 et de la VVh-7.

La valeur  $\Delta_{max}$  est obtenue grâce à la formule suivante :

$$\Delta_{max} = \Delta_{moy} + \mu \times \sigma / (n)^{0,5}$$

$\Delta_{moy}$  correspond à la moyenne des expériences pour chaque mélange réalisé au sein du plan d'expérience ;  $\mu$  représente le facteur de Student pris pour un intervalle de confiance de 95 % ;  $\sigma$  représente la différence des écarts type ; et  $n$  désigne le nombre d'expériences réalisé pour chaque mélange.

La figure 72 montre les modèles testés sur nos deux domaines expérimentaux réduits. Le premier modèle testé est un **modèle linéaire**, qui postule que la réponse  $Y$  (mesure quantitative de la LVVh-7 ou de la VVh-7 dans chaque phase organique) est strictement proportionnelle à la quantité maximale de chaque constituant, c'est-à-dire les points noircis 1, 2 et 3. Dans ce cas le polynôme du premier degré est de la forme :

$$Y = b_{tp} \cdot X_{tp} + b_{but} \cdot X_{but} + b_{oct} \cdot X_{oct}$$

Les trois réponses expérimentales sont obtenues pour chaque sommet et conduisent directement aux coefficients  $b_i$  ( $b_i = Y_i$ ) pour l'extraction de la LVVh-7 et VVh-7. La validité du polynôme est contrôlée grâce aux autres points. Dans ce cas tous les points peuvent être pris comme points tests car chaque constituant est présent dans tous les mélanges.

Le second modèle testé est désigné par le terme **modèle quadratique**, dans le cas présent un modèle simplexe centré. Ce modèle postule qu'il existe des interactions entre les constituants tampon, octan-1-ol et butan-2-ol. Les points noircis de 1 à 6 sur la figure 72 ont été utilisés pour calculer les coefficients d'interaction  $b_{tp/oct}$ ,  $b_{tp/but}$  et  $b_{oct/}$ . Le polynôme du second degré résultant de ce modèle est :

$$Y = b_{tp} \cdot X_{tp} + b_{but} \cdot X_{but} + b_{oct} \cdot X_{oct} + b_{tp-but} \cdot X_{tp} \cdot X_{but} + b_{tp-oct} \cdot X_{tp} \cdot X_{oct} + b_{but-oct} \cdot X_{but} \cdot X_{oct}$$

Les coefficients d'interaction sont donc déterminés grâce aux milieux des trois segments, c'est-à-dire les points 4 ( $X_{tp} = X_{but} = 0,5$  et  $X_{oct} = 0$ ), 5 ( $X_{tp} = X_{oct} = 0,5$  et  $X_{but} = 0$ ) et 6 ( $X_{but} = X_{oct} = 0,5$  et  $X_{tp} = 0$ ).

$Y_4 = (b_1 + b_2)/2 + b_{12}/4$  qui permet de déduire le coefficient d'interaction tampon/butan-2-ol

$$b_{tp-but} = 4 \cdot Y_{tp-but} - 2 \cdot (Y_{tp} + Y_{but})$$

$Y_5 = (b_1 + b_3)/2 + b_{13}/4$  qui permet de déduire le coefficient d'interaction tampon/octan-1-ol

$$b_{tp-oct} = 4 \cdot Y_{tp-oct} - 2 \cdot (Y_{tp} + Y_{oct})$$

$Y_6 = (b_2 + b_3)/2 + b_{23}/4$  qui permet de déduire le coefficient d'interaction butan-2-ol/octan-1-ol

$$b_{but-oct} = 4 \cdot Y_{but-oct} - 2 \cdot (Y_{but} + Y_{oct})$$

La validité de ce modèle quadratique est contrôlé grâce aux points tests de 7 à 10.

Enfin, le troisième modèle testé, le **modèle cubique réduit**, postule une interaction entre les trois constituants tampon, octan-1-ol et butan-2-ol. Les points de 1 à 7 permettent de calculer le coefficient d'interaction maximum  $b_{tp/oct/but}$ . Le polynôme du troisième degré est de la forme :

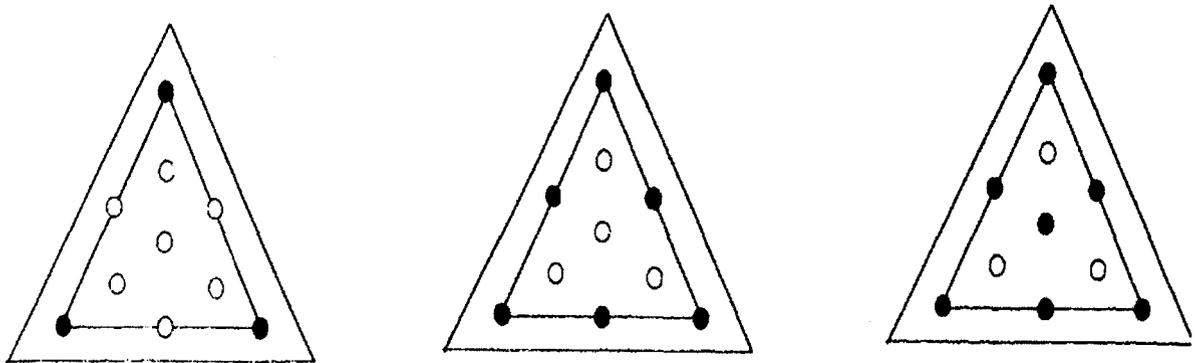
$$Y = b_{tp} \cdot X_{tp} + b_{but} \cdot X_{but} + b_{oct} \cdot X_{oct} + b_{tp-but} \cdot X_{tp} \cdot X_{but} + b_{tp-oct} \cdot X_{tp} \cdot X_{oct} + b_{but-oct} \cdot X_{but} \cdot X_{oct} + b_{tp-but-oct} \cdot X_{tp} \cdot X_{but} \cdot X_{oct}$$

Le coefficient d'interaction est déterminé grâce au point 7 ( $X_{tp} = X_{but} = X_{oct} = 0,3$ ) situé au centre de gravité du triangle équilatéral réduit.

$Y_7 = 4.(b_{12}+b_{13}+b_{23})/9 - (b_1+b_2+b_3)/9 + b_{123}/27$  qui permet de déduire le coefficient d'interaction tampon/butan-2-ol/octan-1-ol

$$b_{tp-but-oct} = 27 \cdot Y_{tp-but-oct} - 12 \cdot (Y_{tp-but} + Y_{tp-oct} + Y_{but-oct}) + 3 \cdot (Y_{tp} + Y_{but} + Y_{oct})$$

Les points tests 8, 9 et 10 sont utilisés pour contrôler la validité de ce modèle cubique réduit.



*Modèle linéaire*

*Modèle quadratique*

*Modèle cubique réduit*

**Figure 72. Représentation graphique des modèles linéaire, quadratique et cubique réduit. Les points noircis correspondent aux points nécessaires à chaque modèle, tandis que les points creux correspondent aux points tests.**

Dans les tableaux 12 et 13 sont notées les réponses expérimentales issues des dix expériences d'extraction de la LVVh-7 (tableau 12) et de la VVh-7 (tableau 13). Chaque expérience a été réalisée trois fois (noté séries I, II et III) de façon à calculer l'erreur expérimentale sur la mesure. Pour le calcul des valeurs  $\Delta_{max}$  nous avons déterminé les différences entre chaque série (notées  $\Delta_1$ ,  $\Delta_2$  et  $\Delta_3$ ). Les valeurs  $\Delta_{moy}$  décrites auparavant sont calculées à partir de ces trois différences. Enfin, les écart-types (notés  $\sigma$ ) ont été calculés pour chaque mélange avec un intervalle de confiance de 95 % et les valeurs du facteur de Student ( $\mu$ ) et du nombre d'expériences ( $n$ ) sont respectivement égales à 4,3 et 3.

		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>Série d'expériences (µg)</b>	<b>I</b>	22	25	170	28	360	39	29	65	16	152
	<b>II</b>	15	15	188	12	375	28	30	55	8	128
	<b>III</b>	28	20	180	30	346	42	35	50	20	140
<b>Moyenne (Y<sub>exp</sub>) (µg)</b>		21.7	20	179	23.3	360	36.3	31	56.7	14.7	140
Difference	$\Delta_1$ (I-II)	7	2	18	16	15	11	1	10	8	24
	$\Delta_2$ (I-III)	13	5	8	18	29	14	5	5	12	12
	$\Delta_3$ (II-III)	6	7	10	2	14	3	6	15	4	12
<b>Ecart-type (<math>\sigma</math>)</b>		6.5	3.6	9.02	9.9	15.5	7.4	3.2	7.6	6.1	12

**Tableau 12. Résultats des dix expériences d'extraction de la LVV-hémorphine-7.**

		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>Série d'expériences (µg)</b>	<b>I</b>	95	33	307	34	550	100	93	130	47	268
	<b>II</b>	96	36	327	42	575	120	100	150	67	290
	<b>III</b>	100	23	300	38	542	112	110	142	49	278
<b>Moyenne (Y<sub>exp</sub>) (µg)</b>		97	36	311	38	556	111	101	141	50	279
Difference	$\Delta_1$ (I-II)	1	3	20	8	25	20	7	20	20	22
	$\Delta_2$ (I-III)	4	13	27	4	33	8	10	8	18	12
	$\Delta_3$ (II-III)	5	10	7	4	8	12	17	12	2	10
<b>Ecart-type (<math>\sigma</math>)</b>		2.6	6.8	14	4	17	10	8.5	10	11	11

**Tableau 13. Résultats des dix expériences d'extraction de la VV-hémorphine-7.**

Chaque expérience a été réalisée trois fois (séries I, II et III), de façon à calculer l'erreur expérimentale sur chaque réponse ( $Y_{exp}$ ). Cette valeur  $Y_{exp}$  résulte de la moyenne des trois expériences.

A partir des résultats d'extraction issus de la moyenne des trois expériences, nous avons appliqué les différents modèles précédemment cités. Dans les tableaux 14 et 15 les valeurs expérimentales (moyenne  $Y_{exp}$ ) et celles prédites par chaque modèle ( $Y$  calculées). Afin de contrôler la validité du modèle postulé, nous avons comparé la valeur de la différence entre les résultats expérimentaux et ceux prédits par le modèle ( $Y_{exp}-Y_{calc}$ , notée  $\Delta$ ) avec la valeur du  $\Delta_{max}$  et ceci pour chaque expérience.

N° exp	Yexp	Modèle linéaire		Modèle quadratique		Modèle cubique réduit		$\Delta_{max}$
		Ycalc	$\Delta$	Ycalc	$\Delta$	Ycalc	$\Delta$	
1	21,7	21,7	0	21,7	0	21,7	0	26,55
2	20	20	0	20	0	20	0	19,35
3	179	179	0	179	0	179	0	32,79
4	23,3	20,9	2,4	23,3	0	23,3	0	34,89
5	360	100	259,7	360	0	360	0	46,4
6	36,3	99,5	-63,2	36,3	0	36,3	0	28,7
7	31	73,6	-42,6	162	-131	31	0	18,38
8	56,7	27,6	29,1	157	-100	106	-49,3	19,36
9	14,7	46,8	-32,1	48,6	-34	2,35	12,3	25,57
10	140	126	14	214	-74	163	-23	40,19

**Tableau 14. Résultats expérimentaux (Yexp) et calculés (Ycalc), correspondant au plan de mélanges d'extraction de la LVV-hémorphine-7.**

N° exp	Yexp	Modèle linéaire		Modèle quadratique		Modèle cubique réduit		$\Delta_{max}$
		Ycalc	$\Delta$	Ycalc	$\Delta$	Ycalc	$\Delta$	
1	97	97	0	97	0	97	0	18,7
2	36	36	0	36	0	36	0	29
3	311	311	0	311	0	311	0	46,9
4	38	66,5	-28,5	66,5	0	66,5	0	22,1
5	556	194	362	556	0	556	0	54,9
6	111	173	-62,5	111	0	111	0	37,1
7	101	129	-28	363	-144	101	0	33,3
8	141	122,5	18,5	259	-118	187,3	-46,3	37,1
9	50	92	-42	90,7	-40,7	81,3	31,3	39,5
10	279	229,5	49,5	355	-76	283	-4	39,5

**Tableau 15. Résultats expérimentaux (Yexp) et calculés (Ycalc), correspondant au plan de mélanges d'extraction de la VV-hémorphine-7.**

Le modèle linéaire a été le premier modèle testé. Les valeurs expérimentales 1, 2 et 3 correspondent aux coefficients ( $b_{tp}$ ,  $b_{oct}$  et  $b_{but}$ ) du modèle. La comparaison entre les valeurs de  $\Delta$  et celles de  $\Delta_{max}$  montre que certains points tests (5 et 8 pour la LVVh-7, 5 et 10 pour la VVh-7) présentent un  $\Delta$  supérieur à  $\Delta_{max}$ . Le modèle linéaire est donc de qualité médiocre dans la prédiction des résultats d'extraction de ces deux hémorphines. Il ne caractérise pas notre système tampon / octan-1-ol / butan-2-ol dans nos conditions d'extraction, c'est-à-dire que chaque constituant n'a pas une influence indépendante sur l'extraction. Ce constat va en faveur des études du chapitre précédent, où nous avons montré que le butan-2-ol et l'octan-1-ol devaient être présents tous les deux pour permettre une extraction efficace des deux hémorphines.

Le second modèle postulé est le modèle quadratique. Il postule que les constituants tampon, octan-1-ol et butan-2-ol interagissent deux à deux, au sein du système tampon / octan-1-ol / butan-2-ol. Dans les tableaux 14 et 15 les valeurs  $\Delta$  des points tests 7 à 10 de chaque expérience d'extraction pour les deux hémorphines, c'est-à-dire les points tests 7 à 10, sont inférieures aux valeurs  $\Delta_{max}$  correspondantes, ce qui valide le modèle quadratique.

Cependant, comme les valeurs  $\Delta_{max}$  sont quelque peu arbitraires, il est possible qu'un modèle, plus compliqué que le modèle du second degré, donne de meilleures prédictions d'extraction des deux hémorphines. C'est pourquoi nous avons testé le modèle cubique réduit pour les deux peptides opioïdes. Les valeurs  $\Delta$  des expériences tests 8, 9 et 10 sont inférieures aux valeurs  $\Delta_{max}$  correspondantes, mais elles n'améliorent pas les résultats obtenus à partir du modèle quadratique.

Aussi, pour permettre l'extraction efficace de la LVVh-7 et de la VVh-7, il apparaît clairement que la présence des deux solvants organiques est souhaitable. L'octan-1-ol est indispensable pour favoriser l'activité de la pepsine et le butan-2-ol pour permettre l'extraction des deux hémorphines.

De plus, nous pouvons localiser la région optimale d'extraction de chaque hémorphine au sein du système tampon / octan-1-ol / butan-2-ol en substituant les valeurs quantitatives d'extraction ( $Y_{exp}$ ) aux dix expériences réalisées dans les deux plans de mélanges. Ces valeurs sont alors placées dans les domaines expérimentaux réduits de la LVVh-7 (figure 73) et de la VVh-7 (figure 74).

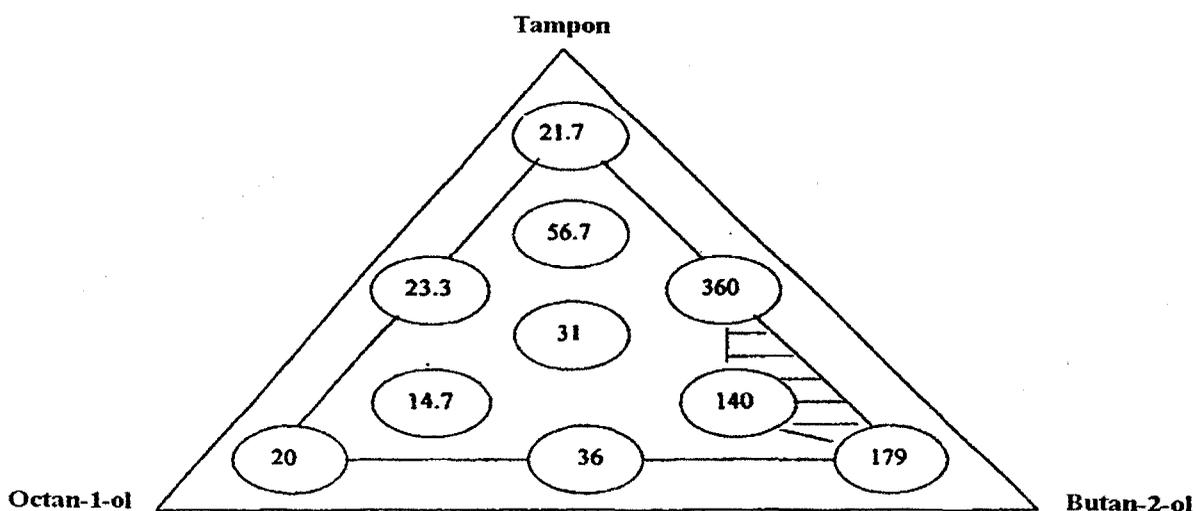


Figure 73. Représentation graphique du domaine expérimental réduit pour l'extraction de la LVV-hémorphine-7. Les valeurs expérimentales d'extraction ont été substituées aux dix expériences.

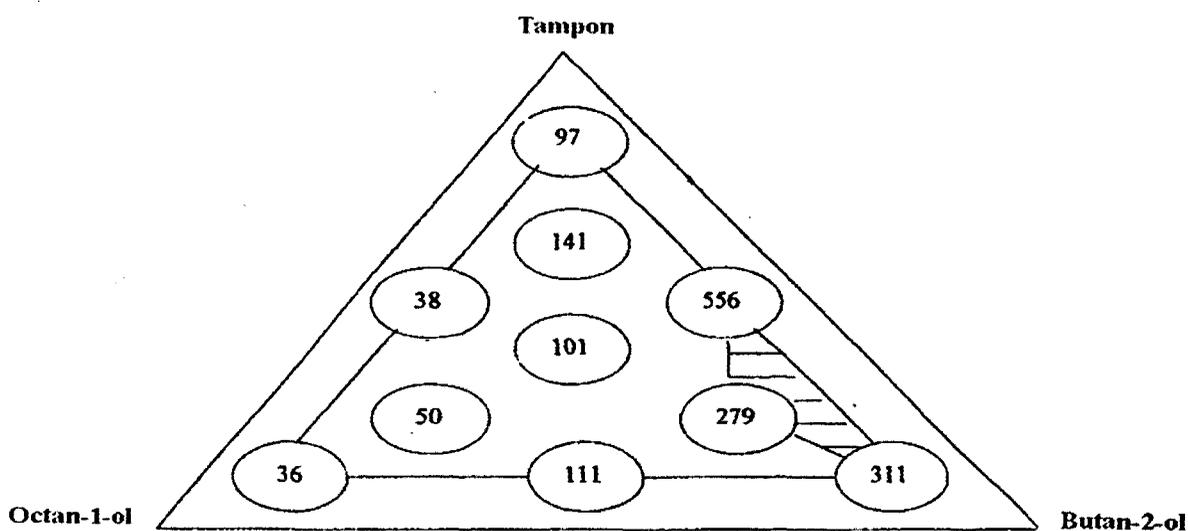


Figure 74. Représentation graphique du domaine expérimental réduit pour l'extraction de la VV-hémorphine-7. Les valeurs expérimentales d'extraction ont été substituées aux dix expériences.

La région hachurée de chaque figure 73 et 74 correspond aux expériences 3, 5 et 10, et délimite la zone d'extraction optimale de la LVVh-7 et de la VVh-7. Ces zones impliquent des proportions en butan-2-ol élevées, entre 45 et 80 % (v/v), des proportions moyennes en tampon, entre 10 et 45 % (v/v), et des proportions faibles en octan-1-ol, entre 10 et 22 % (v/v). Parmi les mélanges possibles situés dans cette zone, le mélange le plus favorable correspond à l'expérience 5, c'est-à-dire à 45 % (v/v) de tampon acétate de sodium pH 4,5, 45 % (v/v) de butan-2-ol et 10 % (v/v) d'octan-1-ol. Ce mélange, désigné en rouge dans les tableaux 14 et 15, montre une extraction quantitative des deux hémorphines supérieure aux quantités extraites par les autres mélanges testés, issus du domaine expérimental réduit de chaque hémorphine.

Les coefficients de partage de la LVVh-7 et de la VVh-7 ont été déterminés de part et d'autre des phases aqueuse (tampon acétate) et organique (butan-2-ol / octan-1-ol). Dans les conditions idéales d'extraction établies précédemment, le coefficient de partage de la LVVh-7 est de 2,5 et celui de la VVh-7 est de 2,2. Ces résultats montrent significativement que les deux hémorphines ont une meilleure affinité pour la phase alcoolique que pour la phase tampon. Ce coefficient est supérieur pour la LVVh-7 et pourrait provenir du résidu hydrophobe leucine présent en position N-terminale. Les valeurs d'hydrophobicité de la LVVh-7 (1675 cal/mol) et de la VVh-7 (1661 cal/mol) justifieraient également ce meilleur coefficient de partage pour la LVVh-7.

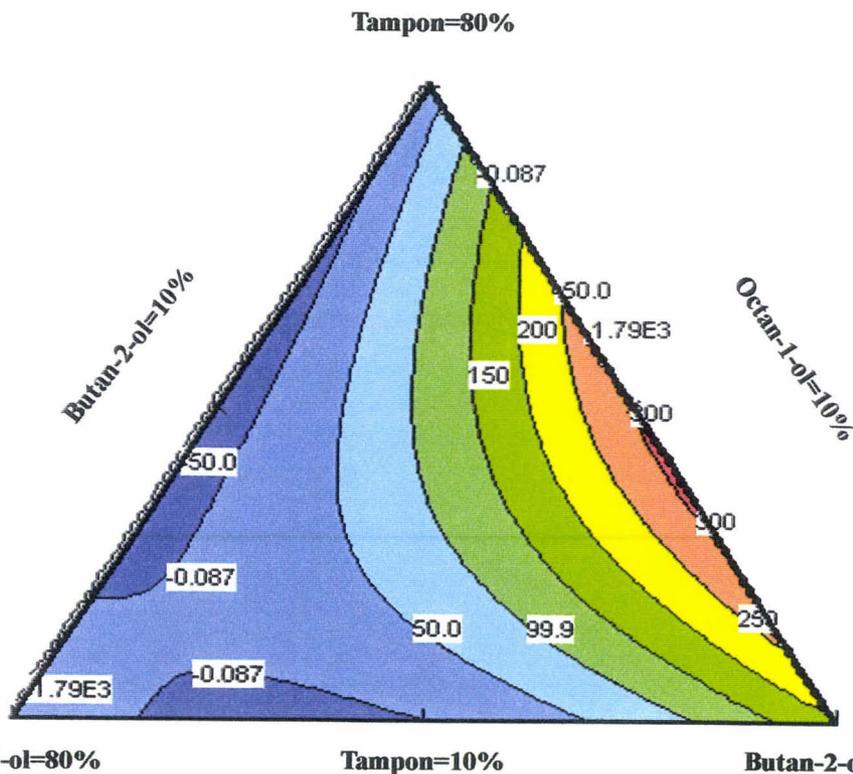
Les équations, encore appelées **lois de mélange**, établies à partir du modèle quadratique sont les suivantes :

$$Y_{LVVh-7} = 21,7 \times X_{tp} + 20 \times X_{oct} + 179 \times X_{but} + 9,8 \times X_{tp/oct} + 1039 \times X_{tp/but} - 256 \times X_{oct/but}$$

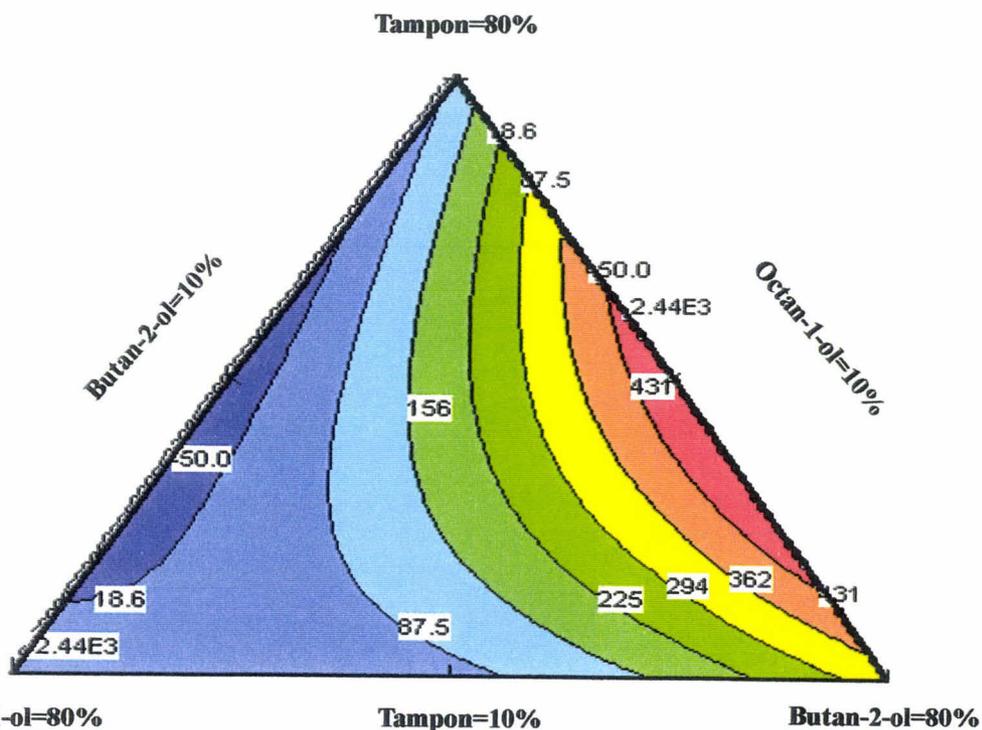
$$Y_{VVh-7} = 97 \times X_{tp} + 36 \times X_{oct} + 311 \times X_{but} - 114 \times X_{tp/oct} + 1408 \times X_{tp/but} - 250 \times X_{oct/but}$$

avec des valeurs de coefficient (21,7), (20) et (179) pour la loi de mélange de la LVVh-7 et (97), (36) et (311) pour la loi de mélange de la VVh-7, déterminées à partir du modèle linéaire. Les valeurs (9,8), (1039) et (-256) pour la LVVh-7 et (-114), (1408) et (-250) pour la VVh-7 représentent des coefficients d'interaction issus du modèle quadratique.

Nous avons vérifié l'exactitude de la zone optimale d'extraction des deux hémorphines, avec le logiciel de traitement des données MODDE 4.0 (Umetri). Connaissant la loi de mélange, le logiciel peut en n'importe quel point du domaine expérimental calculer une valeur de la réponse ( $Y_{LVVh-7}$  ou  $Y_{VVh-7}$ ) étudiée. On obtient alors une figure (75 pour la LVVh-7 et 76 pour la VVh-7) où sont représentées des **courbes d'isoréponse**.



**Figure 75.** Représentation graphique des courbes d'isoreponse, déterminées par le logiciel MODDE 4.0 et obtenues à partir du modèle cubique réduit appliqué sur l'extraction de la LVV-hémorphine-7 dans le système tampon/octan-1-ol/butan-2-ol.



**Figure 76.** Représentation graphique des courbes d'isoreponse, déterminées par le logiciel MODDE 4.0 et obtenues à partir du modèle cubique réduit appliqué sur l'extraction de la VV-hémorphine-7 dans le système tampon/octan-1-ol/butan-2-ol.

La zone optimale d'extraction de la LVVh-7 et de la VVh-7 correspond à 45 % (v/v) en tampon, 45 % (v/v) en butan-2-ol et 10 % (v/v) en octan-1-ol. Celui-ci est représenté en rouge et corrobore avec la région optimale que nous avons délimitée par des hachures sur les figures 73 (pour la LVVh-7) et 74 (pour la VVh-7).

## **V.2. Mise au point d'une méthode de récupération des hémorphines à partir du mélange butan-2-ol / octan-1-ol.**

Les propriétés biochimiques hydrophobes de la LVV-hémorphine-7 (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe) et de la VV-hémorphine-7 (Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe) ont permis leur solubilisation et leur extraction par le mélange butan-2-ol / octan-1-ol, qui constituait la phase organique du système biphasique tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 / butan-2-ol / octan-1-ol

L'optimisation de l'extraction de chaque hémorphine, grâce à l'application d'un plan de mélanges, a conduit à la détermination d'un mélange optimum, composé de 45 % (v/v) de tampon, 45 % (v/v) de butan-2-ol et 10 % (v/v) d'octan-1-ol.

Le recouvrement des deux hémorphines, présentes dans le mélange d'alcools aliphatiques, constituait l'étape finale dans la procédure de préparation de ces peptides opioïdes, après l'étape d'extraction biphasique.

Il apparaissait difficile de recouvrir les hémorphines par l'évaporation des deux solvants organiques. En effet, les températures d'ébullition du butan-2-ol (environs 110°C) et de l'octan-1-ol (environs 195°C) ne permettaient pas l'utilisation de l'évaporation, sous peine d'altérer les hémorphines dû à une température trop importante.

Nous avons donc cherché un moyen d'adsorber les deux hémorphines sur un support solide. Ce support devait permettre un recouvrement total et rapide des deux peptides actifs, de façon à concevoir un éventuel couplage de l'extraction des deux hémorphines avec leur recouvrement sur le support qui permettrait la conception d'un réacteur ouvert avec recyclage du solvant.

### **V.2.1. Etude de l'adsorption de la LVV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-7 par des résines hydrophobes.**

La propriété hydrophobe de la LVVh-7 et de la VVh-7 nous ont mené à tester des résines adsorbantes hydrophobes.

Les adsorbants Amberlite® XAD (Rohm et Haas) sont des résines polymériques hydrophobes à structures poreuses, dont les surfaces internes peuvent adsorber et désorber différentes espèces en fonction de l'environnement dans lequel elles se trouvent.

Les adsorbants présentant un squelette acrylique (**Amberlite XAD 7 HP**), phénolique (**Amberlite XAD 761**) ou aromatique type styrénique (**Amberlite XAD 4, XAD 16, XAD 1180**) ont été expérimentés.

Nous avons testé les cinq adsorbants Amberlite XAD 761, XAD 7 HP, XAD 4, XAD 16 et XAD 1180 sur notre mélange butan-2-ol / octan-1-ol contenant les deux hémorphines, issues du système d'extraction tampon / butan-2-ol / octan-1-ol optimal (45/45/10, v/v/v).

Nous avons mené l'adsorption des deux hémorphines en réacteur fermé, (10 ml de phase organique contenant 40 µg de LVVh-7 et 120 µg de VVh-7), à 23°C avec 1 gramme de chaque résine et sous agitation. Il est normal d'avoir plus de VVh-7 incubée que de LVVh-7, puisque nous avons choisi un temps de trois heures d'hydrolyse pepsique pour l'optimisation par les plans de mélanges. Or, ce temps d'hydrolyse correspond aux conditions optimales de production de la VVh-7, définies dans le chapitre II. Des prélèvements ont été effectués en fonction du temps et filtrés. Après fractionnement des échantillons par CLHP en phase inverse sur une colonne de type C4, nous avons quantifié les concentrations de la LVVh-7 et de la VVh-7 dans chaque prélèvement. Ainsi, nous en avons déduit le pourcentage d'adsorption de chaque peptide opioïde, en fonction du temps d'incubation et de la nature de la résine utilisée (figures 77 et 78).

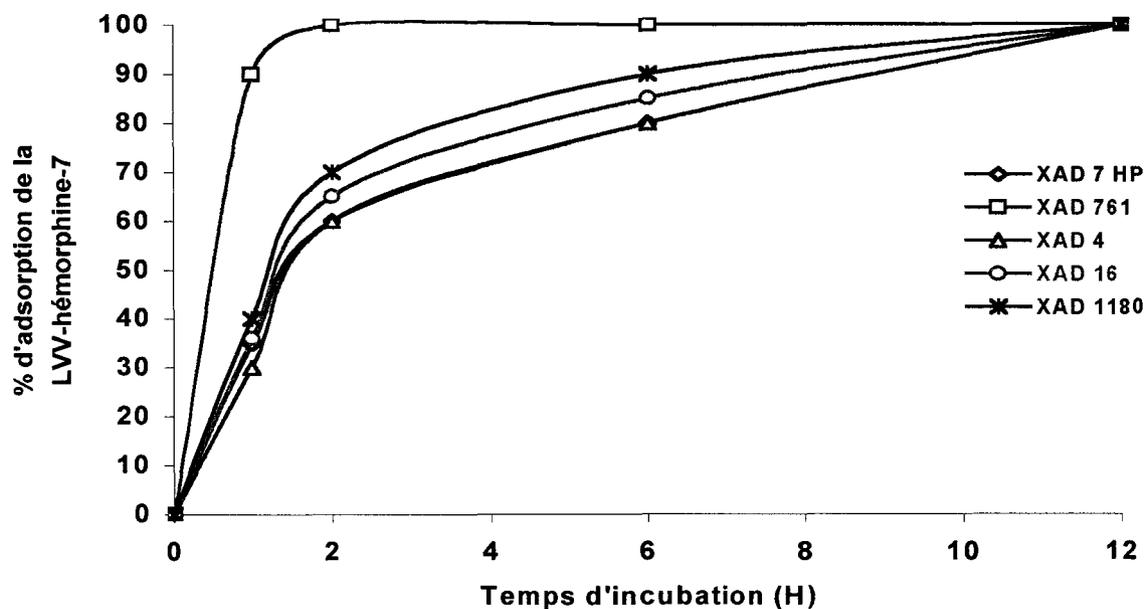


Figure 77. Comparaison des cinétiques d'adsorption de la LVV-hémorphine-7 à 23°C, en fonction du temps d'incubation pour différentes résines adsorbantes : Amberlite XAD7HP, XAD761, XAD4, XAD16 et XAD1180.

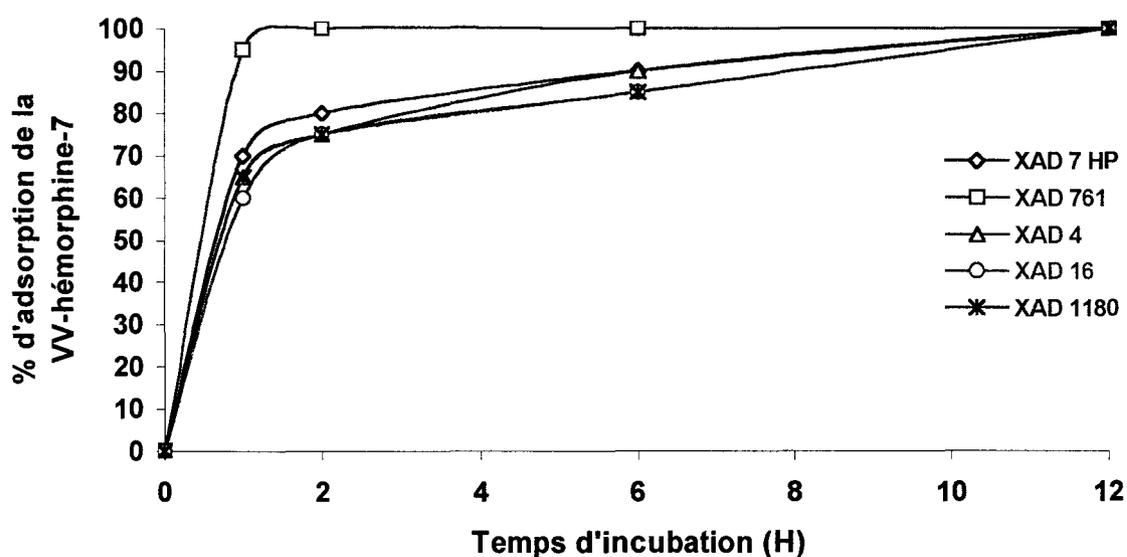


Figure 78. Comparaison des cinétiques d'adsorption de la VV-hémorphine-7 à 23°C, en fonction du temps d'incubation pour différentes résines adsorbantes : Amberlite XAD7HP, XAD761, XAD4, XAD16 et XAD1180.

Les cinétiques d'adsorption de la LVVh-7 et de la VVh-7, exceptées pour la résine XAD 761, ont toutes la même allure: les courbes présentent une première phase avec une forte augmentation du taux d'adsorption pendant les deux premières heures d'incubation, puis une seconde phase d'adsorption plus lente où la totalité des deux hémorphines est adsorbée seulement après six heures d'incubation. Cette seconde phase est probablement due à l'encombrement stérique des pores des résines par les premières molécules de LVVh-7 et de VVh-7 fixées, gênant ainsi la diffusion des autres molécules d'hémorphines (non fixées) vers les sites de fixation libres.

En ce qui concerne la résine XAD 761, l'allure de la cinétique d'adsorption se résume à la première phase, puisque les deux hémorphines sont totalement adsorbées au bout de deux heures d'incubation.

Les autres peptides présents dans la phase alcoolique ont également été totalement adsorbés sur chaque résine testée. De plus, la totalité de l'hème extrait par la phase organique butan-2-ol / octan-1-ol a été adsorbée sur toutes les résines.

Notre critère de sélection, parmi les cinq résines testées, étant l'efficacité d'extraction des deux hémorphines sur un temps le plus court possible, notre choix s'est porté sur la résine Amberlite XAD 761. La phase organique butan-2-ol / octan-1-ol récupérée ne présentait plus aucune trace de peptides, ni d'hème, et pouvait donc être recyclée dans un réacteur ouvert pour une nouvelle extraction des deux hémorphines.

Nous sommes parvenus à fixer la LVVh-7 et VVh-7 sur l'adsorbant XAD 761, qui est constitué d'un squelette phénolique. Il convenait à présent d'aboutir à l'élution des deux hémorphines. Ainsi nous avons cherché à éluer sélectivement les peptides et l'hème.

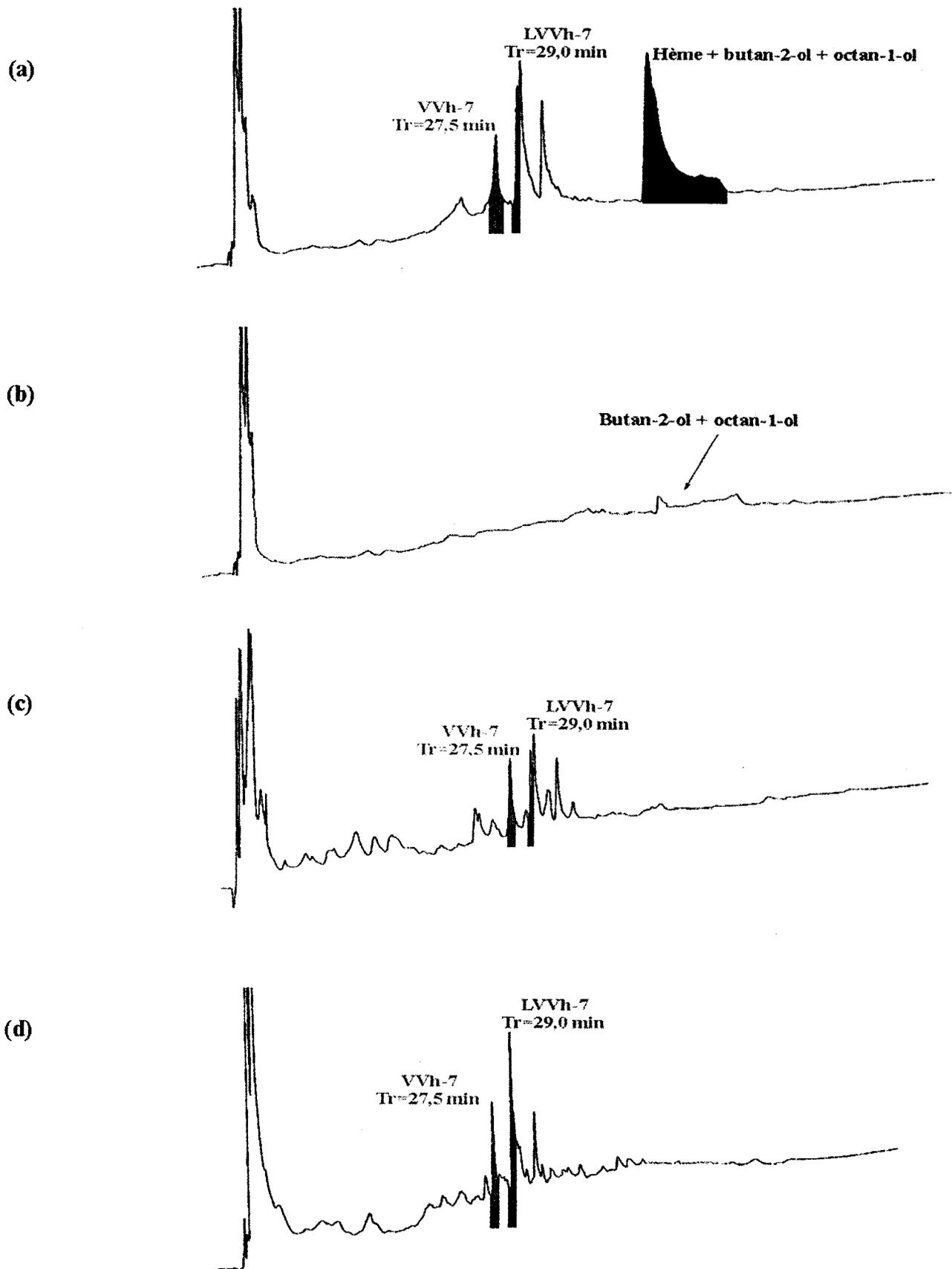
Nous avons récupéré la totalité de l'adsorbant (1 gramme), après centrifugation du milieu d'adsorption. Nous avons tenté de désorber les peptides avec un solvant plus polaire que le butan-2-ol et l'octan-1-ol. Nous avons expérimenté l'éthanol, l'acétone et l'acétonitrile, dans le but de favoriser le décrochage des peptides. Aucun résultat positif n'a été obtenu, les peptides, aussi bien que l'hème, restaient adsorbés sur la résine. Les interactions fortes, entre l'Amberlite XAD 761 et les peptides, empêchaient donc la désorption des peptides par des solvants polaires. Nous avons alors cherché un autre type d'adsorbant.

### V.2.2. Etude de l'adsorption de la LVV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-7 sur l'alumine.

Graf et coll. (1986) ont utilisé l'oxyde d'aluminium ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), support chargé négativement, pour séparer les produits d'hydrolyse d'un nonapeptide ( $^{\text{N}}\text{Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu}^{\text{C}}$ ). Le peptide dépourvu du résidu aromatique en position N-terminale, était adsorbé sur le support solide d'alumine. Nous avons remarqué que ce peptide adsorbé présente majoritairement des résidus hydrophiles. Nous avons alors utilisé ce support pour adsorber la LVVh-7 et la VVh-7, dont les structures primaires renferment le résidu arginine, chargé positivement, ainsi que l'amine en position N-terminale, également chargée positivement.

Nous avons mené l'adsorption des deux hémorphines en réacteur fermé (10 ml du mélange butan-2-ol/octan-1-ol contenant 40  $\mu\text{g}$  de LVVh-7 et 120  $\mu\text{g}$  de VVh-7) par incubation à 23°C avec 5 grammes d'oxyde d'aluminium et sous agitation. Après quatre heures d'incubation, la totalité des peptides et de l'hème était adsorbée sur le support d'alumine, résultat obtenu après fractionnement par CLHP en phase inverse sur une colonne de type C4 de l'échantillon. La figure 79 rend compte de l'efficacité de l'adsorption puisque tous les peptides et l'hème ne sont plus détectés dans la phase alcoolique.

Après centrifugation nous avons récupéré le support d'alumine (5 grammes). Afin de retirer les éventuelles traces de butan-2-ol et d'octan-1-ol encore présentes à la surface du support, celui-ci a été incubé avec de l'éthanol (20 ml) pendant deux heures. Puis nous avons testé l'éthanolamine, solvant aqueux basique, pour désorber sélectivement les peptides en atteignant leur point isoélectrique (environ de 9,5). Les prélèvements effectués au bout de quatre et huit heures d'incubation ont subi un fractionnement par CLHP en phase inverse. Les profils chromatographiques représentés sur la figure 79 montrent que les deux hémorphines sont désorbées quasi totalement par l'éthanolamine. De plus, cette désorption est sélective puisque l'hème n'est pas élué par l'éthanolamine. L'avantage de ce dernier solvant est qu'il est très volatile et permet donc la récupération des hémorphines à l'état pur.



**Figure 79. Profils peptidiques issus de :**  
 (a) La phase butan-2-ol/octan-1-ol avant adsorption sur l'alumine.  
 (b) La phase butan-2-ol/octan-1-ol après 4 heures d'adsorption.  
 (c) La phase éthanolamine (100 mM) après 4 heures de désorption.  
 (d) La phase éthanolamine (100 mM) après 8 heures de désorption.

## Conclusion

Nous avons déterminé les conditions optimales d'extraction de la LVVh-7 et de la VVh-7, au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine insolubilisée sur la Duolite, par la méthode des plans de mélanges. Le mélange constitué de 45 % (v/v) de tampon acétate, 45 % (v/v) de butan-2-ol et 10 % (v/v) d'octan-1-ol a permis d'extraire de façon optimale les deux hémorphines.

Cette étape d'extraction optimisée apparaît comme un moyen efficace de préparation de la LVVh-7 et de la VVh-7, au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine insolubilisée. Cette optimisation offre une possibilité technologique d'une production continue des deux hémorphines dans un réacteur ouvert.

Le recouvrement des deux hémorphines au sein du mélange butan-2-ol / octan-1-ol n'a pas été atteint dans le cas de résines adsorbantes hydrophobes. Les interactions peptides-support solide trop fortes empêchent la désorption des hémorphines.

La désorption s'est avérée plus efficace dans le cas de l'oxyde d'aluminium, adsorbant plutôt hydrophile. L'utilisation de l'éthanolamine a permis de décrocher sélectivement les deux hémorphines, tandis que l'hème reste adsorbé sur le support solide.

#### Article 4

**Titre :** *Utilisation d'un plan d'expérience pour l'optimisation de l'extraction de la LVV-hémorphine-7 et de la VV-hémorphine-7 par un mélange de solvants organiques au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine.*

**Résumé :** Un plan de mélanges fut utilisé pour perfectionner l'extraction de deux peptides opioïdes (Leu-Val-Val-hémorphine-7 et Val-Val-hémorphine-7) par des solvants non miscibles à l'eau au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine. A cause de l'inactivation de la pepsine, ces deux hémorphines n'apparaissaient pas dans la phase aqueuse lorsque la réaction était menée en présence de butan-2-ol seul. Nous avons montré qu'il est possible d'utiliser l'octan-1-ol, comme co solvant, pour recouvrir l'activité pepsique. Cependant, lorsque l'hydrolyse était menée avec l'octan-1-ol seul, les deux hémorphines apparaissaient dans la phase aqueuse mais n'étaient pas extraites par la phase organique. Nous avons donc entrepris l'extraction des hémorphines au cours de la réaction d'hydrolyse dans un mélange de butan-2-ol et d'octan-1-ol. Nous avons déterminé les conditions optimales relatives à l'extraction des peptides opioïdes et à la stabilité de la pepsine. Afin de construire un futur réacteur ouvert, nous proposons un système biphasique composé de 45 % d'eau, de 45 % de butan-2-ol et de 10 % d'octan-1-ol pour l'extraction des deux hémorphines au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine.

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

RENATO FROIDEVAUX<sup>a</sup>, NAÏMA NEDJAR-ARROUME<sup>a\*</sup>, LUC CHOISNARD<sup>a</sup>,  
MURIEL BIGAN<sup>b</sup> AND DIDIER GUILLOCHON<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Technologie des Substances Naturelles, IUT "A" Lille 1 - BP 179, 59653 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

<sup>b</sup>Laboratoire de Chimie Organique et Environnement, Bat. C4 - 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

\* To whom correspondence should be addressed

Current address: Laboratoire de Technologie des Substances Naturelles  
IUT « A » Lille 1 - BP 179  
59653 Villeneuve d'Ascq Cedex  
France  
e-mail : LTSN@univ-lille1.fr

## Summary

Mixture design was used to improve the extraction of two opioid peptides (Leu-Leu-Val-haemorphin-7 and Val-Val-haemorphin-7) by water immiscible solvents in the course of bovine haemoglobin peptic hydrolysis. Because of the loss of the peptic activity, these two haemorphins did not appear in the aqueous phase when the peptic reaction was achieved in the presence of butan-2-ol alone. We have shown that it is possible to use octan-1-ol, as cosolvent, to recover the peptic activity. However, when the hydrolysis was achieved with octan-1-ol alone, the two haemorphins appeared in the aqueous phase but was not extracted by the organic phase. So, we have investigated haemorphin extraction in the course of hydrolysis reaction by a mixture of butan-2-ol and octan-1-ol. We have determined the optimal conditions relatively to the extraction of opioid peptides and the stability of the pepsin. To design a future Continuous Stirred Tank Reactor, we propose a biphasic system composed of 45 % water, 45 % butan-2-ol and 10 % octan-1-ol for the extraction of the two haemorphins in the course of bovine haemoglobin peptic hydrolysis.

*Keywords:* Mixture design; Haemoglobin; Peptides; Haemorphins; Opioids; Solvents

## Introduction

Haemorphins are small biologically active peptides which can be generated by *in vitro* enzymatic treatment of bovine blood [1] or haemoglobin [2,3], or by incubation of bovine haemoglobin with mouse peritoneal macrophages [4]. These peptides owe their name to their origin (*i.e.* haemoglobin) and morphine-like activity (*i.e.* inhibition of electrically-evoked twitch contractions of the guinea pig ileum myenteric plexus-longitudinal muscle preparation) [1]. Haemorphins or haemorphin-containing peptides are also isolated and purified *in vivo* in a variety of mammalian tissues (hypothalamus, pituitary, spinal cord; [5-7] or fluids (plasma, cerebrospinal and gingival crevicular fluids ; [8-10], and *in vitro* from enzymatically treated haemoglobin [11-12].

The LVV-haemorphin-7 and the VV-haemorphin-7 were isolated and characterised the first time by our laboratory [3]. These peptides correspond respectively to the sequences 31-40 and 32-40 of the  $\beta$ -chain of the bovine haemoglobin. Their isolation was realised by SE-HPLC and RP-HPLC. Then, progress in HPLC technology have made possible to isolate and identify these two haemorphins in one step by a direct coupling of RP-HPLC and ESI-MS [13].

Organic solvents have shown their capacity to extract bitter peptides from various complex hydrolysates of proteins such as haemoglobin [14], soybean proteins [15], and other proteins [16,17]. These bitter peptides were all hydrophobic peptides. Zhao and Piot [18] have shown that the aliphatic

alcohol butanol-2-ol displayed the better selectivity towards the haemorphins LVV-haemorphin-7 and VV-haemorphin-7 on a final complex peptic hydrolysate of haemoglobin. The hydrophobic properties of these two peptides, via their sequences (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe for the LVVh-7 and Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe for the VVh-7) allow their solubilisation in this type of organic solvent. So, the continuous enzymatic production of LVVh-7 and VVh-7 would be an efficient and rapid step in the preparation process of these active peptides thanks to their extraction by butan-2-ol. Such a process would have many advantages from the point of view of industrial-scale production : suppression of chromatographic separations, and a reducing of the cost of downstream processing. Large-scale preparation of peptides with opioid activity has a great interest in food industries for applications in the areas of nutrition and functional foods (19).

However, previous studies have shown the inhibitory effect of several alcohols towards the activity of pepsin [20-23]. So, a butan-2-ol containing biphasic solvent system able to extract the haemorphins in the course of peptic hydrolysis, and to preserve the peptic activity, has been researched. A mixture of octan-1-ol and butan-2-ol was performed in this objective.

We have used a set of tools and techniques known under the name of experimental research methodology [24, 25]. We have adopted an experimental approach in defining the problem that is going to adapt our conditions, by determining the objective (the extraction of the LVV-haemorphin-7 and the VV-haemorphin-7 in the course of the hydrolysis reaction), the possible constraints on the components (octan-1-ol and butan-2-ol proportions), and the response variable under study (the quantitative extraction of the two haemorphins). In this way, we have defined the experimental conditions for optimal haemorphins extraction and insolubilised pepsin stability in the objective of designing a future Continuous Stirred Tank Reactor to prepare LVV-haemorphin-7 and VV-haemorphin-7 from bovine haemoglobin.

## Legends

Table 1: Matrix and experimental design used for extraction optimisation of the LVVh-7 and the VVh-7.

Table 2: Scores of the 10 extraction experiments (series I, II and III)

Y mean are the mean scores of the experiments series I, II and III

$\Delta_1$ ,  $\Delta_2$  and  $\Delta_3$  are the absolute differences between the series I, and II, the series I and III and the series II and III respectively (for the calculation of  $\Delta_{max}$ )

$\sigma$  are the standard deviation for each mixture.

(a) LVVh-7

(b) VVh-7

Table 3: Experimental and calculated scores from first degree, quadratic and reduced cubic model.

$\Delta$  is the difference  $Y_{exp} - Y_{calc}$ .

$\Delta_{max} = \Delta_{moy} + \mu \cdot \sigma / (n)^{0.5}$  with  $\Delta_{moy}$  of 10.4,  $\mu$  of 4.3,  $\sigma$  values indicated in the tables 2, and n of 3.

(a) LVVh-7

(b) VVh-7

Table 4: Interaction coefficients of the linear, quadratic and reduced cubic models for the LVVh-7 and the VVh-7. These coefficients are calculated thanks to the relations established in the Materials and Methods section.

Figure 1: Graphic representations :

(a) Experimental design for the extraction of the LVVh-7 and the VVh-7.

(b) Points (black dots) of the ternary diagram used to calculate the first degree model.

(c) Points (black dots) of the ternary diagram used to calculate the quadratic model.

(d) Points (black dots) of the ternary diagram used to calculate the reduced cubic model.

Figure 2: HPLC chromatogram of the haemoglobin hydrolysate.

Peptic hydrolysis was performed at 23°C in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.5. The hydrolysate was analysed by reversed-phase HPLC on a C4 column under the conditions described in the Materials and Methods section.

- (a) Aqueous phase after 3 hours of haemoglobin peptic hydrolysis in butan-2-ol alone.
- (b) Aqueous phase after 3 hours of haemoglobin peptic hydrolysis in octan-1-ol alone.
- (c) Aqueous phase after 5 hours of haemoglobin peptic hydrolysis in both butan-2-ol and octan-1-ol.
- (d) Organic phase after 5 hours of haemoglobin peptic hydrolysis both butan-2-ol and octan-1-ol.

Figure 3: Percentage of the remaining  $\alpha$  and  $\beta$  chains during the haemoglobin peptic hydrolysis at pH 4.5: in presence of (---) butan-2-ol, (— —) octan-1-ol, (....) buffer and (—) both butan-2-ol / octan-1-ol.

(1): Addition of octan-1-ol.

Figure 4: Graphic representations for the LVVh-7 and the VVh-7 :

- (a) Experimental scores. The hachures delimit the favourite region.
- (b) Average score  $Y$  isoresponse curves obtained from the reduced cubic model by the Modde 4.0 software. The black region delimit the favourite region.

## Materials and Methods

### Materials

All common chemicals and solvents were of analytical grade from commercial sources. Bovine haemoglobin and pig pepsin (E.C. 3.4.23.1) were purchased from Sigma. Acetonitrile (from Flandres Chimie) was of HPLC grade. All aqueous HPLC eluents were degassed by helium.

### HPLC system

The liquid chromatographic system consisted of a Waters 600<sup>E</sup> automated gradient controller pump module, a Waters Wisp 717 automatic sampling device and a Waters 996 photodiode array detector. Spectral and chromatographic data were stored on a NEC image 466 computer. Millennium software was used to plot, acquire and analyse chromatographic data. All the chromatographic process was performed with a Vydac C4 column (250 mm  $\times$  4.6 mm internal diameter). The mobile phase was water/trifluoroacetic acid (1000:1, v/v) as eluent A and acetonitrile/water/trifluoroacetic acid (600:400:1, by volume) as eluent B. The flow rate was 1 ml/min. The gradient applied was 0-67 % (v/v) B over 30 min then 67-87 % (v/v) B over 35 min. On-line instantaneous UV absorbance scans were performed between 200 and 395 nm at a rate of one spectrum every s. The resolution was 1.2 nm. Chromatographic analyses were completed with Millennium software.

### Pepsin immobilisation

Pepsin was immobilised on Duolite resin (A568, ROHM and HAAS) (formophenol polymeric resin). Duolite resin (10 g) was hydrated in water (100 ml) during 2 hours at room temperature. Then, the resin was neutralised by the addition of 1 N HCl to obtain a pH about 3.2. Duolite resin was washed with 0.2 M sodium acetate buffer (200 ml, pH 4.5) and with 0.05 M sodium acetate buffer (500 ml, pH 4.5). Immobilisation of pepsin (750 mg) was realised in 0.05 M sodium acetate buffer (100 ml, pH 4.5) during one night at 4°C. Then, Duolite resin was washed with 0.1 M sodium acetate buffer (300 ml, pH 4.5).

### Determination of peptic activity

One peptic unit (U) produced an increase of absorbance at 280 nm of 0.001 per min at pH 2.0 at 37°C, measured as TCA-soluble products. 5 ml of 2 % (w/v) haemoglobin was used as substrate, then 1 ml of pepsin solution was added. After 10 min, 10 ml of 5 % (w/v) TCA was added to the reactional medium. Supernatant was read at 280 nm upon a blank prepared in the same way but adding TCA solution before pepsin solution. In the case of immobilised pepsin, the support was suspended in 100 ml 1,67 % (w/v) haemoglobin then 5 ml aliquots were added to 10 ml 5 % (w/v) TCA, and supernatant was read at 280 nm. The activity of the insoluble pepsin was expressed as U per g of support.

### Determination of the partition coefficient ( $P_{o/w}$ ) of butan-2-ol towards octan-1-ol

Butan-2-ol was titrated by oxido-reduction reaction with the potassium dichromate ( $K_2Cr_2O_7$ ) in presence of sulfuric acid [26]. The oxidation of butan-2-ol was achieved by the incubation of 100  $\mu$ l alcohol with 2 ml solution of potassium dichromate in presence of sulfuric acid (26 g of  $K_2Cr_2O_7$  in 24 ml of concentrated  $H_2SO_4$  and completed to 200 ml with water). After 30 minutes of total oxidation of the alcohol at room temperature, the absorbance was measured at 590 nm. Butan-2-ol quantity was determined thanks to a titration curve.

Concentration (M) of butan-2-ol was determined in the aqueous phases of the defined mixture design and the mean alcohol partition coefficient ( $P_{o/w}$ ) between the aqueous (0.1 M sodium acetate pH 4.5) and octan-1-ol was calculated.

### Hydrolysis of haemoglobin by pepsin

The hydrolysis of bovine haemoglobin was performed in a 100 ml thermostated reactor (23°C) containing free pepsin ( $1.10^5$  Units) or immobilised pepsin on Duolite resin ( $6.10^5$  Units, corresponding about to 180 mg of pepsin / 7 g Duolite resin) in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, and different proportions of immiscible organic solvents (butan-2-ol and octan-1-ol). The reactor was stirred without creating an emulsion between the two phases to avoid denaturation and insolubilisation of haemoglobin.

### Mixtures design

#### *Matrix and experimental design (24, 25)*

1 g of bovine haemoglobin was used in the aqueous phase of each mixture of the experimental design. The hydrolysis was realised for 3 hours at 23°C in 0.1 M sodium acetate buffer pH 4.5 by immobilised pig pepsin.

The extraction has been optimised according to a mixture design, so that the sum of the proportions of the solvents is unity: % water + % octan-1-ol + % butan-2-ol = 100 %.

Each solvent must be present in the final formulation to get the extraction of the LVVh-7 and the VVh-7. Preliminary experiments with minimal proportions of water, octan-1-ol and butan-2-ol (5 % water / 5 % octan-1-ol / 90 % butan-2-ol; 5 % water / 90 % octan-1-ol / 5 % butan-2-ol; 90 % water / 5 % octan-1-ol / 5 % butan-2-ol) have shown no extraction of active peptides. For this reason, the minimal percentages of water, octan-1-ol and butan-2-ol were started at 10 %. Consequently, the maximal water, octan-1-ol and butan-2-ol fractions were 80 %. Finally, the constrained mixture space was defined by: 10 %  $\leq$  water  $\leq$  80 %, 10 %  $\leq$  octan-1-ol  $\leq$  80 % and 10 %  $\leq$  butan-2-ol  $\leq$  80 %.

These constraints reduce our mixture space to the equilateral triangle located inside the complete ternary diagram shown in figure 1a. Each vertex corresponds to a "pseudo-components" i.e. a mixture of the three pure components. To study this region, we have prepared the ten experiments 1 to 10 according to the proportions indicated in table 1.

If  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$  are respectively water, octan-1-ol and butan-2-ol volumic fractions, previous constraints on each proportion of component can be also written: 10 %  $\leq Z_1 \leq$  80 %

10 %  $\leq Z_2 \leq$  80 % and 10 %  $\leq Z_3 \leq$  80 % with  $Z_1 + Z_2 + Z_3 = 100$  %.

Normalised coordinates ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ) of each pseudo-components 1, 2 and 3 are constrained to lie in the range  $0 \leq X_i \leq 1$  and the sum of the  $X_i$  equals 1. They are related to the volume fractions  $Z_i$  according to the following system:  $Z_1 = 80 X_1 + 10 X_2 + 10 X_3$ ,  $Z_2 = 10 X_1 + 80 X_2 + 10 X_3$  and  $Z_3 = 10 X_1 + 10 X_2 + 80 X_3$ .

#### *Establishment of the mathematical relations (24, 25)*

Three models have been tested for each haemorphin on the mixture design defined before.

The notation  $Y_i$  was used to represent the mean score for the extraction experiment  $n^\circ i$ .

To validate or reject the tested model we have shown that the polynomial, established from the model, fits fall within a maximum difference ( $\Delta_{max}$ ) for the LVVh-7 and the VVh-7. This arbitrary value was obtained from the following formula:  $\Delta_{max} = \Delta_{moy} + \mu \cdot \sigma / (n)^{0.5}$ , in which  $\Delta_{moy}$ ,  $\mu$ ,  $\sigma$  and  $n$  represent respectively the mean of the differences for the 10 triplicated experiments (noted series I, II

and III), the Student factor for 95 % confidence interval, the difference standard deviations and the number of experiments for each extraction mixture respectively.

#### *First model: linear model.*

This model assumes that the response  $Y$  is strictly proportional to the ratio of each pseudocomponent 1, 2 and 3.

$$Y = b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2 + b_3 \cdot X_3.$$

The three experimental responses obtained for each vertex 1, 2 and 3 (Figure 1b) allow us to determine directly the coefficients  $b_i$  ( $b_i = Y_i$ ) for extraction of the LVVh-7 and the VVh-7.

The validity of these polynomials is controlled with the test points 4 to 10.

#### *Second model: quadratic model.*

This model assumes that the effect of each component (water, octan-1-ol and butan-2-ol) on the response  $Y$  is not only additive, but there are probably interactions between these components. Therefore, a quadratic polynomial must be examined for each haemorphin:

$$Y = b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2 + b_3 \cdot X_3 + b_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + b_{13} \cdot X_1 \cdot X_3 + b_{23} \cdot X_2 \cdot X_3.$$

It is easy to prove, using the vertex points, that  $b_1$ ,  $b_2$  and  $b_3$  remain unchanged for the extractions of the LVVh-7 and the VVh-7. Interaction coefficients determination  $b_{12}$ ,  $b_{13}$  and  $b_{23}$  is realised with the three midpoints of each edge (Figure 1c). Thus, applying this model to points 4 ( $X_1 = X_2 = 0.5$ ;  $X_3 = 0$ ), 5 ( $X_1 = X_3 = 0.5$ ;  $X_2 = 0$ ) and 6 ( $X_2 = X_3 = 0.5$ ;  $X_1 = 0$ ) give respectively:  $Y_4 = (b_1 + b_2) / 2 + b_{12} / 4$  i.e.  $b_{12} = 4 \cdot Y_4 - 2 \cdot (Y_1 + Y_2)$

$$Y_5 = (b_1 + b_3) / 2 + b_{13} / 4 \text{ i.e. } b_{13} = 4 \cdot Y_5 - 2 \cdot (Y_1 + Y_3) \text{ and}$$

$$Y_6 = (b_2 + b_3) / 2 + b_{23} / 4 \text{ i.e. } b_{23} = 4 \cdot Y_6 - 2 \cdot (Y_2 + Y_3).$$

The validity of each model is controlled with the test points 7, 8, 9 and 10.

#### *Third model: reduced cubic model.*

This model assumes that the three components water, octan-1-ol and butan-2-ol interact together to extract the haemorphins. The reduced cubic model is applied to points 1 to 7 (Figure 1d):  $Y = b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2 + b_3 \cdot X_3 + b_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + b_{13} \cdot X_1 \cdot X_3 + b_{23} \cdot X_2 \cdot X_3 + b_{123} \cdot X_1 \cdot X_2 \cdot X_3$ .

It is easy to prove, using the vertex points and the midpoints of each edge, that  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$ ,  $b_{12}$ ,  $b_{13}$  and  $b_{23}$  remain unchanged for the extractions of the LVVh-7 and the VVh-7. The determination of the interaction coefficient  $b_{123}$  is realised with the centre of gravity of the defined equilateral triangle (Figure 1d), i.e. the point 7. Thus, applying this model to points 7 ( $X_1 = X_2 = X_3 = 33.3$ ) give respectively:

$$Y_7 = 4(b_{12} + b_{13} + b_{23}) / 9 - (b_1 + b_2 + b_3) / 9 + b_{123} / 27$$

$$\text{i.e. } b_{123} = 27 \cdot Y_7 - 12 \cdot (Y_4 + Y_5 + Y_6) + 3 \cdot (Y_1 + Y_2 + Y_3)$$

The validity of each model is controlled with the test points 8, 9 and 10.

## **Results and Discussion**

### **Effects of solvents on haemorphin extraction and pepsin stability**

Kinetic of appearance of LVVh-7 and VVh-7 in the course of bovine haemoglobin peptic hydrolysis was previously studied. It has shown that the two haemorphins are both detected at 3 hours of hydrolysis reaction in 0.1 M acetate buffer at pH 4.5 by the pepsin in solution [13]. So, the peptic hydrolysis was performed for 3 hours in the same buffer at pH 4.5 but with 50 % (v/v) of butan-2-ol alone. Figure 2a shows the chromatogram of the aqueous phase after 3 hours of hydrolysis reaction. LVVh-7 and VVh-7 were not detected in the aqueous phase and haemoglobin  $\alpha$  and  $\beta$  chains were not practically cleaved. Figure 3 shows that  $\alpha$  and  $\beta$  chains percentage is still constant in the aqueous phase in the course of the haemoglobin hydrolysis in butan-2-ol presence. The hydrolysis without the organic solvent, i.e. in the buffer phase, was compared. After 5 hours of hydrolysis reaction about 85 % of  $\alpha$  and  $\beta$  chains remained in the aqueous phase, instead of 60 % in the buffer phase. This expressed a loss of pepsin activity in the course of the hydrolysis, probably due to a partial miscibility of the butan-2-ol in the aqueous phase.

Then, the study was continued with the butan-2-ol but with the addition of an apolar cosolvent. An organic solvent immiscible with water and able to extract the butan-2-ol from the aqueous phase was searched to hope a peptic activity recovery. The octan-1-ol seemed interesting : it is not soluble in water and it is a model [27] for the molecule partition coefficient ( $P_{o/w}$ ) calculation between an aqueous and a nonaqueous (octan-1-ol) environment. The  $P_{o/w}$  of the butan-2-ol was determined by titration in the aqueous phase by oxido-reduction with the potassium dichromate. This  $P_{o/w}$  (5.2, mean value calculated for each defined mixture design experiment) was upper to 1. Also, this result showed that the butan-2-ol presented a better affinity for the octan-1-ol than for water.

Similarly, the peptic hydrolysis of haemoglobin was performed in 0.1 M acetate buffer at pH 4.5 with 50 % (v/v) of octan-1-ol alone. Figure 2b shows the chromatogram of the corresponding aqueous phase after 3 hours of hydrolysis reaction. The LVVh-7 and the VVh-7 have been detected in the aqueous phase but not in the octan-1-ol phase (result not shown). Zhao et al. [18] have shown that the rate of the extraction of the LVVh-7 and the VVh-7 decreased when the alcohol polarity decreased. It was also supposed that haemorphin was not detected in the octan-1-ol phase. The aqueous phase remaining haemoglobin  $\alpha$  and  $\beta$  chain percentage, in the presence of octan-1-ol, was determined in the course of the peptic hydrolysis reaction (figure 3). Haemoglobin was cleaved more rapidly, contrary to the reaction in butan-2-ol presence, and the corresponding curve followed the same evolution that in the buffer phase. So, there was no peptic activity inhibition in presence of octan-1-ol. Our study was continued in combining butan-2-ol with octan-1-ol.

The haemoglobin peptic hydrolysis was performed in 0.1 M acetate buffer at pH 4.5, first in butan-2-ol presence and after octan-1-ol addition. Figure 2c shows the chromatogram of the aqueous phase after 5 hours of hydrolysis when octan-1-ol was added to the water / butan-2-ol biphasic system. The presence of the two haemorphins in the aqueous phase and in the organic phase (Figure 2c and 2d respectively) was detected. The haemoglobin  $\alpha$  and  $\beta$  chain percentage was determined in the course of the hydrolysis reaction and noted in figure 3. The chains were slowly hydrolysed in presence of butan-2-ol alone, for the first 4 hours (85 % of  $\alpha$  and  $\beta$  chains are still present). However, remaining chains rate decreased rapidly in presence of both butan-2-ol and octan-1-ol (only 20 %). This expressed a recovery of the peptic activity when the octan-1-ol was added to the water / butan-2-ol biphasic system. It was also necessary to combine the octan-1-ol with the butan-2-ol to allow the pepsin activity and the LVVh-7 and VVh-7 appearance in the aqueous phase via the octan-1-ol presence, and these two peptides extraction via the butan-2-ol presence.

### **Mixture design for the optimisation of the haemorphin extraction in the course of haemoglobin hydrolysis by immobilised pepsin.**

These haemorphins extraction was performed with the organic mixture octan-1-ol / butan-2-ol, in the course of haemoglobin peptic hydrolysis at 3 hours in 0.1 M acetate buffer at pH 4.5, to optimise the solvent mixture proportion. The experimental research methodology and more particularly the application of mixture design allowed us to determine an optimal mixture of water / octan-1-ol / butan-2-ol, by the quantitative measure of LVVh-7 and VVh-7 in the organic phase.

The Scheffé algorithm [28, 29] have been applied to points 1 to 10 of the experimental design presented in figure 1a, to obtain a representative mathematical model, able to predict the score for any point within the experimental region for the extraction of the LVVh-7 and the VVh-7. The process was used in a sequential way, by testing more and more complicated models, i.e. polynomials of higher and higher degrees. Some experimental points are selected to calculate the postulated model coefficients. Then, this model is validated or rejected by comparing the predicted scores for the non-selected points with the experimental values. The current model was considered to give an adequate prediction of the experimental response ( $Y_{exp}$ ) when the polynomial fits fall within a maximum difference ( $\Delta_{max}$ ), calculated for each haemorphin.

The first tested model (figure 1b) was a linear model which assumed that the response  $Y$  is strictly proportional to the ratio of each pseudocomponent 1 (water), 2 (octan-1-ol) and 3 (butan-2-ol). The polynomials validity is controlled with the test points 4 to 10. The second tested model (figure 1c) was a quadratic model which assumed that there were interactions between each pseudocomponent 1, 2 and 3. The points 1 to 6 were used to calculate the interaction coefficients  $b_{12}$ ,  $b_{23}$  and  $b_{13}$ . The model validity for each peptide was controlled with the test points 7 to 10. The third

tested model (figure 1d) was the reduced cubic model which considered an interaction between the three pseudocomponents 1, 2 and 3. The points 1 to 7 allowed to calculate the interaction coefficient  $b_{123}$ . The model validity, for each haemorphin, was controlled with the test points 8, 9 and 10 of the experimental design.

Tables 2a and 2b give the quantitative results of the 10 extraction experiments for the LVVh-7 and VVh-7 respectively. Each experiment carried out 3 times (noted series I, II and III) to determine mean scores. The differences  $\Delta_1$ ,  $\Delta_2$  and  $\Delta_3$  between the three series and the standard deviation  $\sigma$  were used to calculate the  $\Delta_{max}$  of each experiment. Tables 3a and 3b give the results of the three tested models for the LVVh-7 and the VVh-7 extraction respectively. The value  $\Delta$ , representing the difference between the experimental and the calculated response ( $Y_{exp}-Y_{calc}$ ) for each experiment, is compared to the  $\Delta_{max}$  to verify the validity of the tested model.

The first degree model was of poor quality for the two haemorphins because certain test points exhibit differences with the measured values much higher than  $\Delta_{max}$ . It points out that the effect of each component on the responses  $Y_{LVVh-7}$  and  $Y_{VVh-7}$  is not only additive but there were probably interactions between the water and the octan-1-ol, the water and the butan-2-ol and the octan-1-ol and the butan-2-ol. So, the quadratic model was tested. The interaction coefficients for the LVVh-7 and the VVh-7 have been calculated and presented in table 4.

This second degree model was better than the first degree polynomials for the two haemorphins. Differences  $\Delta$  were smaller than the maximal accepted discrepancies ( $\Delta \leq \Delta_{max}$ , tables 3a and 3b). So, the second degree models were validated for the two haemorphins. However, since the  $\Delta_{max}$  values were somewhat arbitrary, it was possible that a more complicated model would exhibit a better predicting ability. Therefore, the reduced cubic model was tested for each haemorphin. The interaction coefficient  $b_{123}$  for the LVVh-7 and the VVh-7 are presented in table 4. This last model did not give better results than the quadratic polynomials for each haemorphin. It was now important for us to locate the optimal water / octan-1-ol / butan-2-ol mixture. The substitution of each tested experiment by its extraction value has permitted to determine the best mixture. The ideal biphasic system which allowed to extract these peptides quantitatively was around the experiment 5, i.e. 45 % of water, 10 % of octan-1-ol and 45 % of butan-2-ol.

Predicted responses calculated from reduced cubic model equations:

$Y=21.7X_1+20X_2+179X_3+9.8X_1X_2+1039X_1X_3-256X_2X_3-2753X_1X_2X_3$  and  
 $Y=97X_1+36X_2+311X_3-114X_1X_2+1408X_1X_3-250X_2X_3-3888X_1X_2X_3$ , for the LVVh-7 and the VVh-7 respectively, can be represented through isoresponse curves obtained by MODDE 4.0 (Umetri) software, by maintaining  $Y_{calc}$  at a given value. Graphic representations in figure 4b show that the favourite regions are delimited by the black regions for the two haemorphins. These results corroborated those obtained in the table 3, i.e. the experiments 3, 5 and 10.

## Conclusion

In this study, the optimal conditions for the extraction of two opioid peptides, LVVh-7 and VVh-7, by the use of a mixture design, in the course of bovine haemoglobin hydrolysis by immobilised pepsin on Duolite were determined. A mixture composed of 45 % water, 45 % butan-2-ol and 10 % octan-1-ol to permit an optimal extraction of these two opioids and a preservation of peptic activity was proposed.

This optimised extractive step also appears as an efficient mean of LVVh-7 and VVh-7 preparation in the course of the bovine haemoglobin peptic hydrolysis and a feasible technology for enhancing the product yield in a Continuous Stirred Tank Reactor. It will be necessary to determine the kinetics of extraction of the two haemorphins by the butan-2-ol / octan-1-ol organic phase in the course of the peptic hydrolysis reaction. It will be advisable to determine the space time for each haemorphin because the fact that these two peptides are intermediate peptides in the course of the haemoglobin peptic hydrolysis was previously shown [13].

Active peptides as opioid peptides derived from proteins are generally isolated from very complex peptidic hydrolysate, where their concentrations are very low. The preparation of such peptides has required laborious chromatographic steps. So, water/organic solvent biphasic extraction

system could be applied for the production of other peptides which have hydrophobic or amphiphilic properties, in the course of peptic hydrolysis reaction. This industrial-scale process offers advantages into the suppression of chromatographic separations and the reduction of the cost of downstream processing. However, large preparation of active peptides as opioid has a great interest in food industries for application in the areas of nutrition and functional foods.

## References

1. Brantl, V., Gramsch, C., Lottspeich, F., Mertz, R., Jaeger, K. H. and Herz, A. (1986). *European J. Pharmacol.* **125**, 309-310.
2. Barkhudaryan, N., Kellerman, J., Goloyan, A. and Lottspeich, F. (1993) *FEBS Lett.* **329**, 215-218.
3. Piot, J.M., Zhao, Q., Guillochon, D., Ricart, G. and Thomas, D. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **189**, 101-110.
4. Dagouassat, N., Garreau, I., Sannier, F., Zhao, Q. and Piot, J.M. (1996) *FEBS Lett.* **382**, 37-42.
5. Barkhudaryan, N., Oberthuer, W., Lottspeich, F. and Goloyan, A. (1992) *Neurochem. Res.* **17**, 1217-1221.
6. Glämsta, E.L., Marklund, A., Hellman, U., Wernstedt, Ch., Terenius, L. and Nyberg, F. (1991) *Regul. Pept.* **34**, 169-179.
7. Nishimura, K. and Hazato, T. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **194**, 713-719.
8. Glämsta, E.L., Meyerson, B., Silberring, J., Terenius, L. and Nyberg, F. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **194**, 1060-1066.
9. Glämsta, E.L., Markrid, L., Lantz, I. and Nyberg, F. (1993) *Regul. Pept.* **49**, 9-18.
10. Mäkinen, K.K., Sewon, L. and Mäkinen, P.L. (1996) *J. Periodont. Res.* **31**, 43-46.
11. Zhao, Q., Sannier, F. and Piot, J.M. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1295**, 73-81.
12. Ivanov, V.T., Karelin, A.A., Philippova, M.M., Nazimov, I.V. and Pletnev, V.Z. (1997) *Biopolymers* **43**, 171-188.
13. Froidevaux, R., Lignot, B., Nedjar-Arroume, N., Coddeville, B., Ricart, G. and Guillochon, D. (2000) *J. Chromatogr. A.* **873**, 185-194.
14. Aubes-Dufau, I., Capdevielle, J., Seris, J.L. and Combes, D. (1995) *FEBS Lett.* **364**, 115-119.
15. Lovsin-Kukman, I., Zelenik-Blatnik, M. and Abram, V. (1995) *J. Chromatogr. A.* **704**, 113-120.
16. Lalassidin, G. and Sjaberg, L.B. (1978) *J. Agric. Food Chem.* **26**, 742-749.
17. Lemieux, L. and Simard, R.E. (1991) *Lait* **71**, 599-636.
18. Zhao, Q. and Piot, J.M. (1998) *Prep. Biochem and Biotechnol.* **28**, 61-78.
19. Marshall, W.E. (1994) in *Functional Foods. Designer Foods, Pharma. Foods Nutraceuticals* (Goldberg, Ed.), pp. 242-260, Chapman and Hall, New York.
20. Tang, J. (1965) *J. Biol. Chem.* **240**, 3810-3815.
21. Shin, H.D. (1970) *Bull. Chem. Soc. Japan* **43**, 3472-3474.
22. Antonov, V.K. (1977) *Adv. Exp. Med. Biol.* **95**, 179-198.
23. Sielecki, A.R., Fedorov, A.A., Boodhoo, A., Andreeva, N.S. and James, M.N.G. (1990) *J. Mol. Biol.* **214**, 143-170.
24. Cornell, J.A. (1981) *Experiments with mixtures*, Wiley, New York.
25. Pierlot, C., Leprêtre, A. and Aubry, J.M. (1998) *Chemometrics* 71-78.
26. Hart, H. and Conia, J.M. (1987) *Introduction à la Chimie Organique*. InterEditions, Paris, pp 229-231.
27. Leo, A., Hansch, C. and Elkins, D. (1971) *Chem. Rev.* **71**, 525-554.
28. Scheffe, H.J. (1958) *Royal Statist. Soc.* **B20**, 344-360.
29. Scheffe, H.J. (1963) *Royal Statist. Soc.* **B25**, 235-241.

N° exp	Matrix			Experimental Design		
	X1	X2	X3	% Water	% Octan-1-ol	% Butan-2-ol
1	1	0	0	80	10	10
2	0	1	0	10	80	10
3	0	0	1	10	10	80
4	1/2	1/2	0	45	45	10
5	1/2	0	1/2	45	10	45
6	0	1/2	1/2	10	45	45
7	1/3	1/3	1/3	33.3	33.3	33.3
8	2/3	1/6	1/6	56.6	21.7	21.7
9	1/6	2/3	1/6	21.7	56.6	21.7
10	1/6	1/6	2/3	21.7	21.7	56.6

Table 1

LVVh-7 experiment number (a)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Experiment serie ( $\mu\text{g}$ )	I	22	25	170	28	360	39	29	65	16	152
	II	15	15	188	12	375	28	30	55	8	128
	III	28	20	180	30	346	42	35	50	20	140
Mean (Y) ( $\mu\text{g}$ )		21.7	20	179	23.3	360	36.3	31	56.7	14.7	140
Difference	$\Delta_1$ (I-II)	7	2	18	16	15	11	1	10	8	24
	$\Delta_2$ (I-III)	13	5	8	18	29	14	5	5	12	12
	$\Delta_3$ (II-III)	6	7	10	2	14	3	6	15	4	12
Standard Deviation ( $\sigma$ )		6.5	3.6	9.02	9.9	15.5	7.4	3.2	7.6	6.1	12

VVh-7 experiment number (b)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Experiment serie ( $\mu\text{g}$ )	I	95	33	307	34	550	100	93	130	47	268
	II	96	36	327	42	575	120	100	150	67	290
	III	100	23	300	38	542	112	110	142	49	278
Mean (Y) ( $\mu\text{g}$ )		97	36	311	38	556	111	101	141	50	279
Difference	$\Delta_1$ (I-II)	1	3	20	8	25	20	7	20	20	22
	$\Delta_2$ (I-III)	4	13	27	4	33	8	10	8	18	12
	$\Delta_3$ (II-III)	5	10	7	4	8	12	17	12	2	10
Standard Deviation ( $\sigma$ )		2.6	6.8	14	4	17	10	8.5	10	11	11

Table 2

LVVh-7 scores (a)

N° exp	Yexp	First degree model		Quadratic model		Reduced cubic model		Δmax
		Ycalc	Δ	Ycalc	Δ	Ycalc	Δ	
1	21.7	21.7	0	21.7	0	21.7	0	26.55
2	20	20	0	20	0	20	0	19.35
3	179	179	0	179	0	179	0	32.79
4	23.3	20.9	2.45	23.3	0	23.3	0	34.89
5	360	100	259.7	360	0	360	0	46.4
6	36.3	99.5	-63.2	36.3	0	36.3	0	28.7
7	31	73.6	-42.6	162	-131	31	0	18.38
8	56.7	47.6	9.07	157	-100	106	-49.3	29.36
9	14.7	46.8	-32.1	48.6	-34	2.35	12.3	25.57
10	140	126	14	214	-74	163	-23	40.19

VVh-7 scores (b)

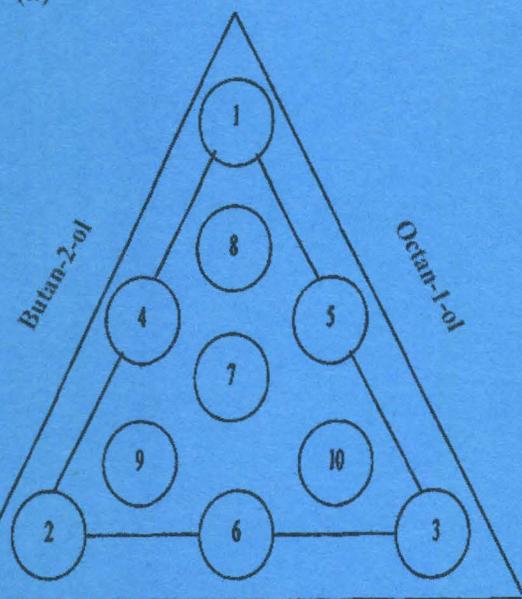
N° exp	Yexp	First degree model		Quadratic model		Reduced cubic model		Δmax
		Ycalc	Δ	Ycalc	Δ	Ycalc	Δ	
1	97	97	0	97	0	97	0	18.7
2	36	36	0	36	0	36	0	29
3	311	311	0	311	0	311	0	46.9
4	38	66.5	-28.5	66.5	0	66.5	0	22.1
5	556	194	362	556	0	556	0	54.9
6	111	173	-62.5	111	0	111	0	37.1
7	101	129	-28	363	-144	101	0	33.3
8	141	122.5	18.5	259	-118	187.3	-46.3	37.1
9	50	92	-42	90.7	-40.7	81.3	31.3	39.5
10	279	229.5	49.5	355	-76	283	-4	39.5

Table 3

	LVVh-7	VVh-7
b1	21.7	97
b2	20	36
b3	179	311
b12	9.8	-114
b13	1039	1408
b23	-256	-250
b123	-2753	-3888

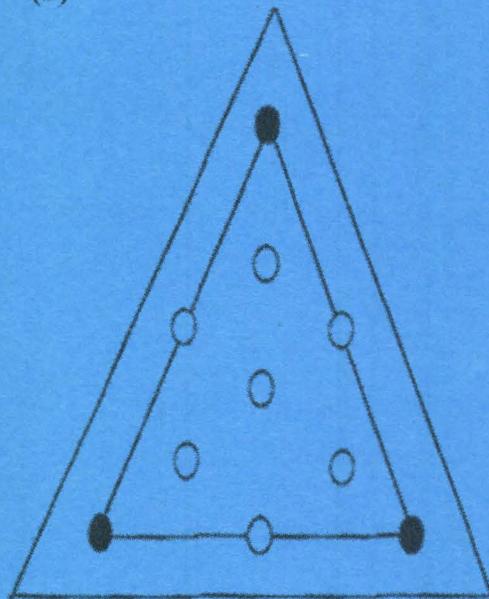
Table 4

(a)



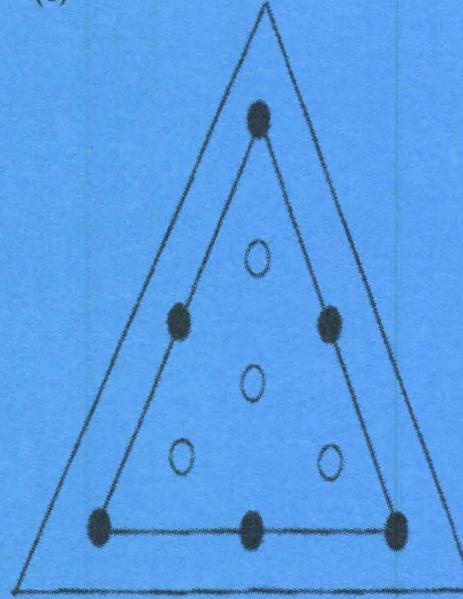
Water

(b)



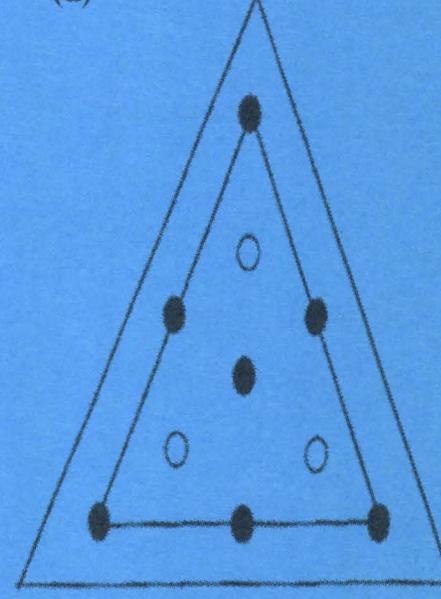
First degree model

(c)



Quadratic model

(d)



Reduced cubic model

Figure 1

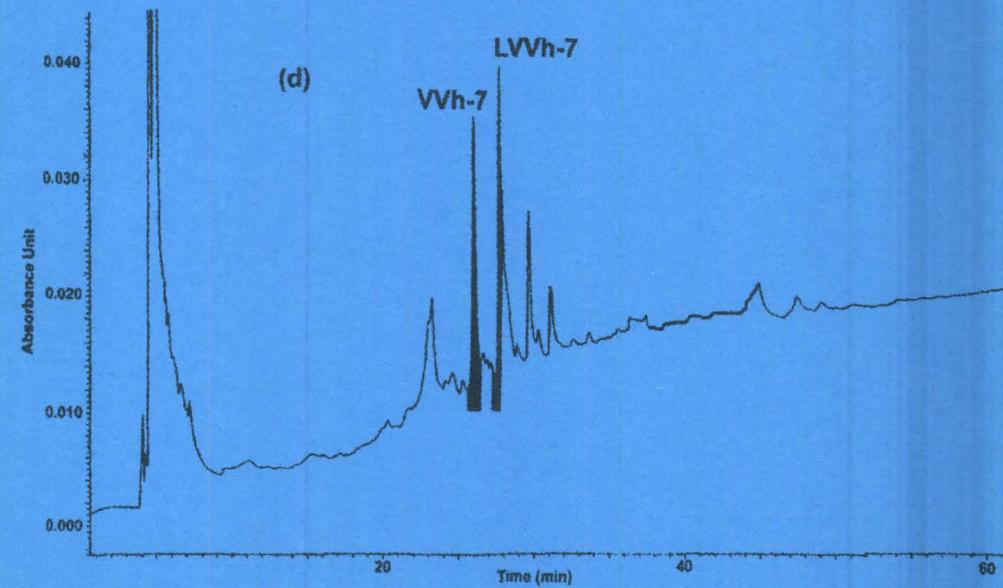
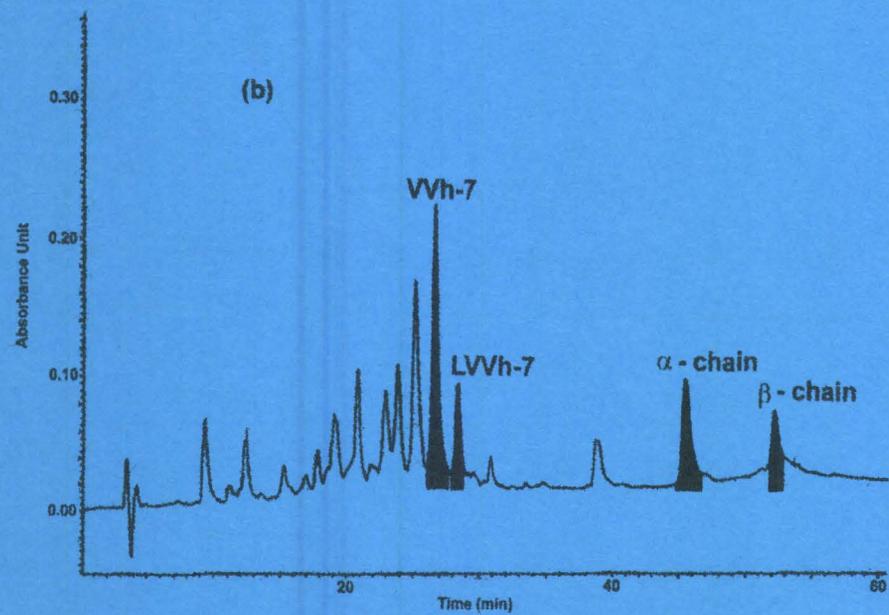
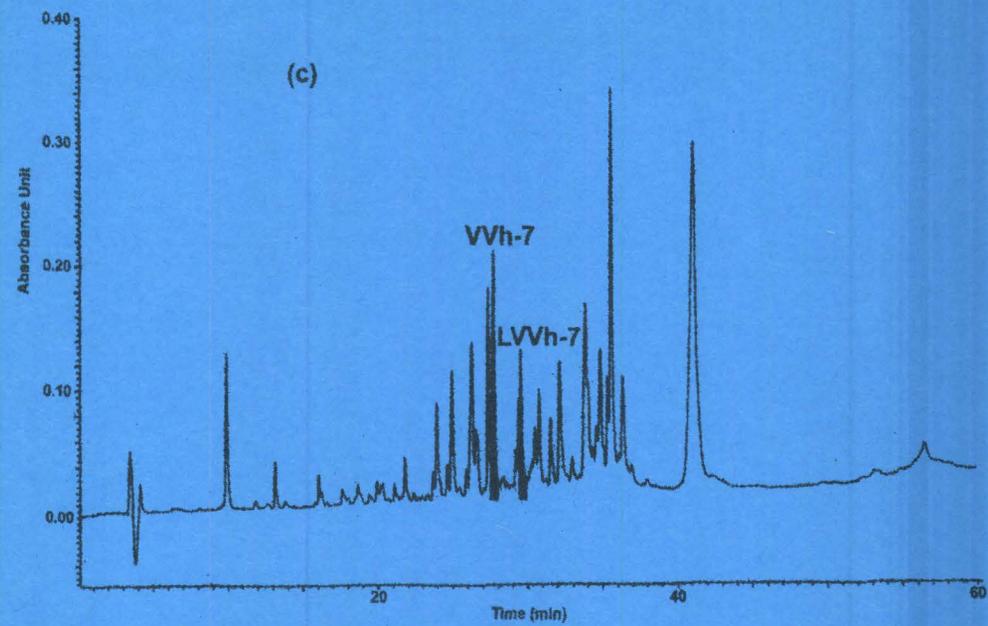
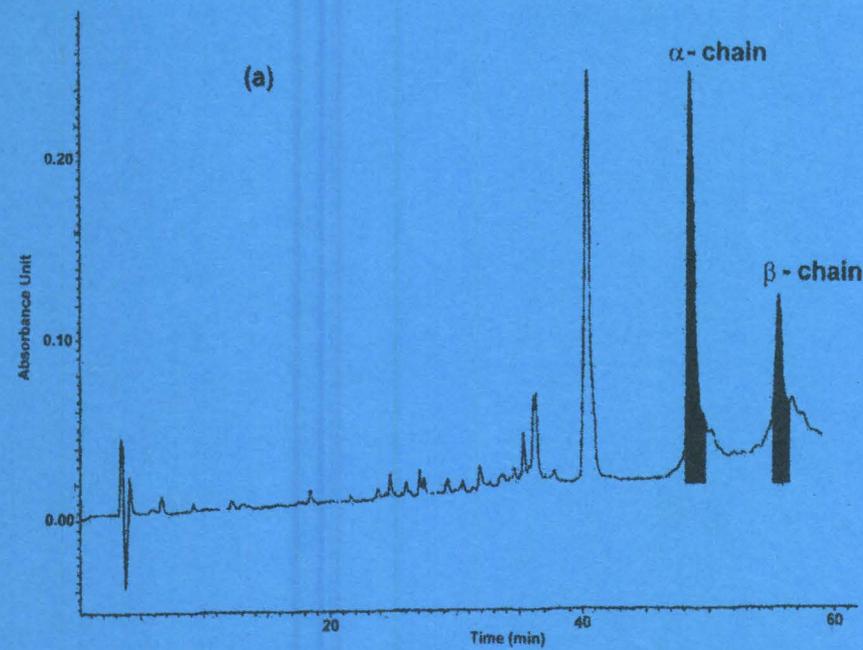


Figure 2

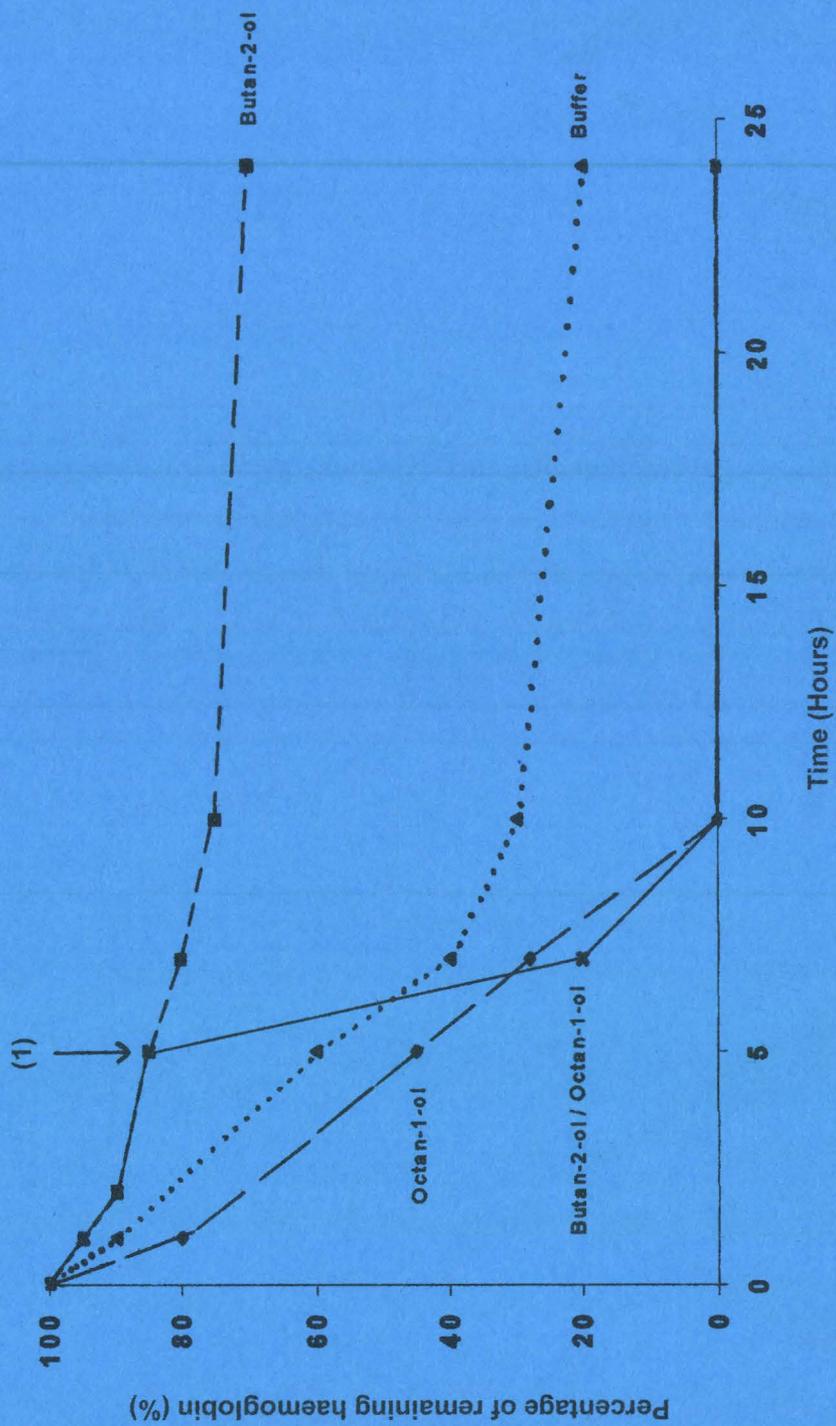


Figure 3

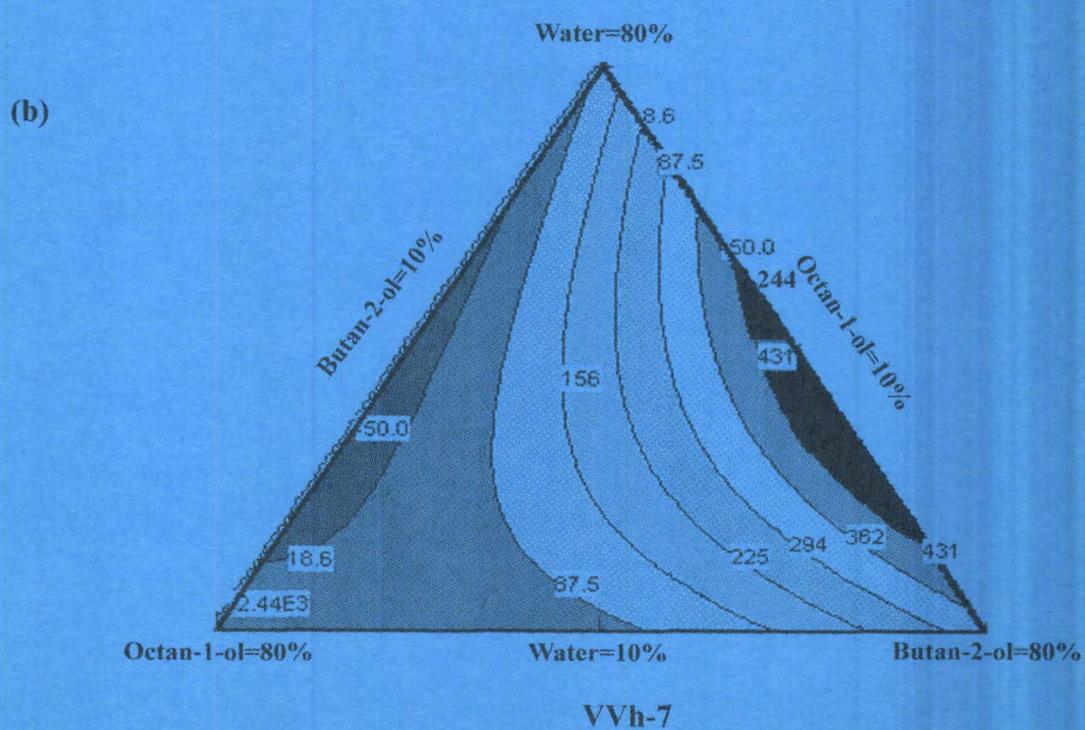
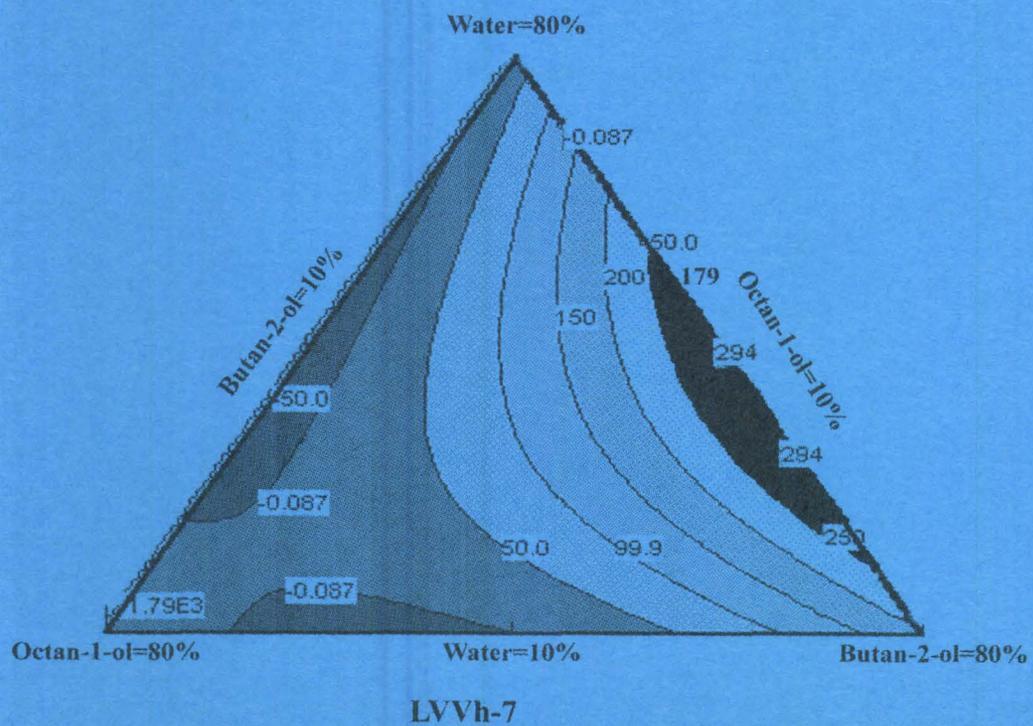
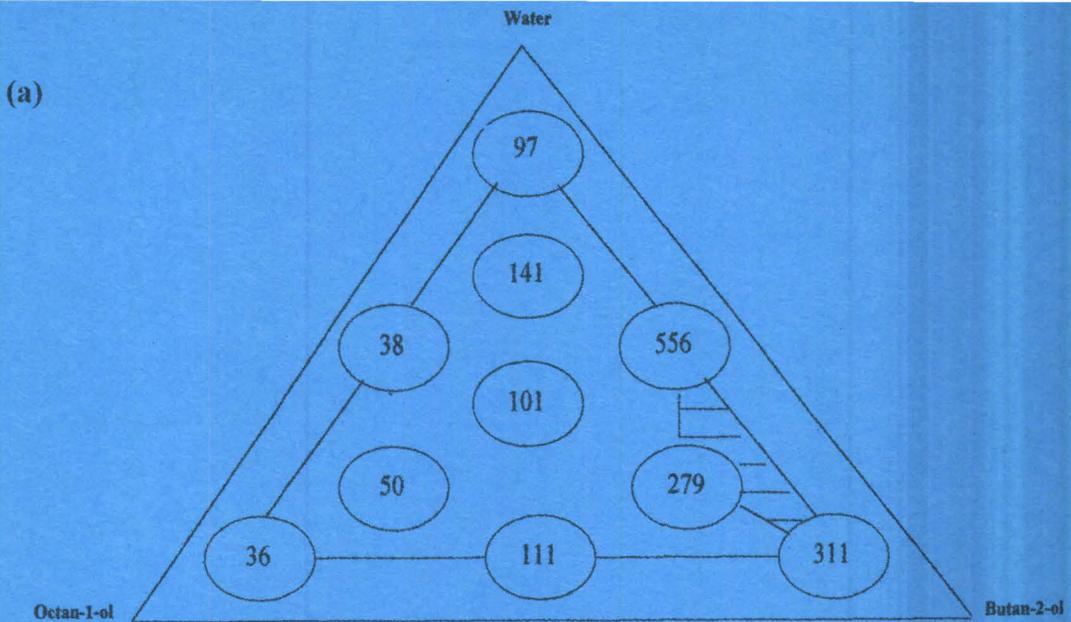
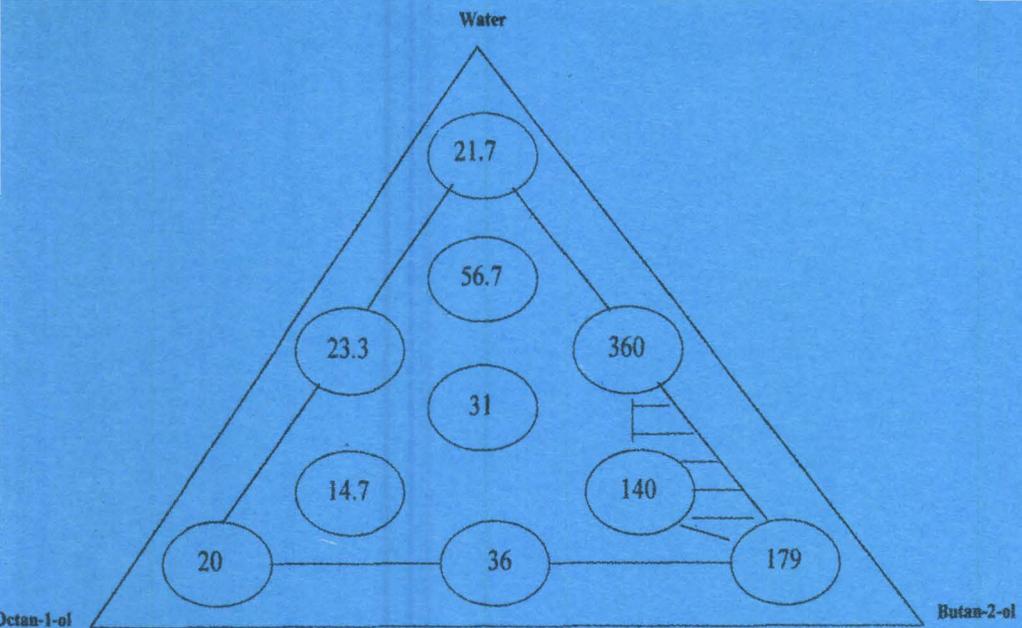


Figure 4

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Cinq peptides actifs : la néokyotorphine qui est un peptide analgésique, un peptide potentialisateur de la Bradykinine et trois peptides à activité opioïde la LVV-hémorphine-7, la VV-hémorphine-7 et la VV-hémorphine-4 ont été mis en évidence dans les hydrolysats pepsiques d'hémoglobine bovine obtenus à pH 4,5. La VVh-4 a été isolée pour la première fois à partir de l'hémoglobine bovine. La mise au point de l'isolement de ces peptides en une seule étape chromatographique a permis de gagner un temps considérable sur les techniques classiques qui combinent généralement la filtration sur gel et la CLHP en phase inverse.

L'étude systématique des cinétiques d'apparition de chaque peptide actif, au cours de la digestion pepsique de l'hémoglobine, a permis de montrer que la LVVh-7, la VVh-7 ainsi que le peptide potentialisateur de la Bradykinine sont des peptides intermédiaires. Cette étude a de plus montré que la néokyotorphine et la VV-hémorphine-4 sont des peptides finaux s'accumulant en fin d'hydrolyse.

L'étude de l'hydrolyse de l'hémoglobine dénaturée par l'urée, qui se fait selon un mécanisme de type « zipper », a permis de montrer que la LVVh-7, la VVh-7 et la VVh-4 sont produites successivement au cours de l'hydrolyse de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine : la LVVh-7 est le précurseur de la VVh-7 qui elle-même est le précurseur de la VVh-4. De plus, dans ces conditions d'hydrolyse, la production de la LVVh-7 et de la VVh-7 est respectivement 7 fois et 2,5 fois plus importante que lors de l'hydrolyse de l'hémoglobine native qui procède selon un mécanisme de type « one by one ».

Une technique rapide utilisant un couplage direct de la CLHP en phase inverse avec la spectrométrie de masse à ionisation par électrospray a été développée pour l'isolement et la caractérisation simultanés par leur spectre de masse de ces trois hémorphines. Cette méthode permet d'identifier ces peptides actifs, sans fractionnement préliminaire, dans les hydrolysats complexes d'hémoglobine et de réduire leur temps de purification. L'utilisation de ce couplage CLHP-SM pourrait être appliquée à la recherche et à la préparation d'autres peptides à activités biologiques dont les séquences ont été repérées dans les chaînes d'hémoglobine.

Une procédure d'identification et de quantification des hémorphines par couplage de la CLHP avec un détecteur spectral UV a été mise au point. Celle-ci a permis de construire une librairie spectrale pour la LVVh-7, la VVh-7 et la VVh-4 qui donne accès également à la recherche de ces hémorphines dans un hydrolysat peptidique complexe. A partir de ces études cinétiques et analytiques, les conditions optimales d'obtention de ces trois hémorphines ont pu être précisées. Des degrés d'hydrolyse de 3 %, de 11 % et de 21 % permettent respectivement de produire la LVVh-7, la VVh-7 et la VVh-4. Ces conditions de production des hémorphines

sont d'autant plus remarquables qu'elles sont indépendantes de la concentration initiale en hémoglobine dénaturée (entre 0,2 et 5 %).

Un système d'extraction liquide/liquide de la LVVh-7 et de la VVh-7, à partir des hydrolysats d'hémoglobine a été recherché. Le mélange octan-1-ol – butan-2-ol a été retenu : il permet à la fois d'être opérant au cours de la réaction enzymatique, car il préserve la stabilité et l'activité de la pepsine, d'avoir une forte sélectivité pour ces hémorphines, puisque seulement deux autres peptides sont extraits pour une centaine dans les hydrolysats peptidiques, et d'extraire la LVVh-7 et la VVh-7 avec des coefficients de partage respectivement de 2,6 et de 2,3. L'utilisation d'un plan de mélanges a permis d'optimiser quantitativement l'extraction de la LVVh-7 et de la VVh-7 par ce système de solvants au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine insolubilisée. Le mélange tampon / butan-2-ol / octan-1-ol en proportion 45/45/10 (v/v/v) constitue le milieu réactionnel optimal pour l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine insolubilisée, la production des hémorphines et leur extraction. Cependant, l'hème est extrait en même temps que les deux hémorphines.

Le recouvrement de la LVVh-7 et de la VVh-7, à partir du mélange butan-2-ol - octan-1-ol, a été obtenu par la mise au point d'une méthode d'adsorption/désorption sur de l'alumine. Ce système permet de récupérer sélectivement les hémorphines pures dans l'éthanolamine, un tampon volatil, et de recycler le solvant tout en retenant l'hème sur l'alumine.

En résumé, les études menées tout au long de ce travail permettent d'envisager la conception d'un réacteur ouvert à pepsine insolubilisée pour la préparation en continu de la LVVh-7 et de la VVh-7 avec un système d'extraction liquide/liquide et recyclage des solvants.

## Perspectives

Nous sommes parvenus à définir les éléments qui pourront permettre la conception d'un réacteur enzymatique ouvert capable de produire en continu deux peptides opioïdes grâce à un système biphasique tampon / butan-2-ol – octan-1-ol, au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine insolubilisée. Nos perspectives se situent dans la réalisation de ce réacteur et son perfectionnement.

La réalisation d'un réacteur enzymatique ouvert pour la production de la LVVh-7 et de la VVh-7 avec le système biphasique tampon / butan-2-ol – octan-1-ol optimal sans émulsion, est la perspective imminente. Les résultats accumulés permettront de choisir les temps de séjour et d'orienter la mise en œuvre du réacteur vers la production soit de la LVVh-7 soit de la VVh-7. Le taux de récupération des hémorphines et la stabilité de la pepsine insolubilisée permettront d'évaluer la productivité de ce réacteur et le rendement de production des hémorphines (bilan matière).

La récupération des hémorphines à partir du mélange de solvants a été réalisée en « batch ». La conception d'une colonne à lit fixe d'alumine permettrait plus aisément la récupération continue des hémorphines et le recyclage des solvants organiques dans le réacteur ouvert.

La conception d'un réacteur avec une surface d'échange plus grande pourrait être envisagée. La création de micelles inverses, par l'ajout d'un surfactant, permettrait la création d'émulsions et favoriserait ainsi la diffusion des hémorphines vers la phase organique. Une approche méthodologique par les plans d'expériences permettrait de mesurer l'influence de la surface d'échange sur l'extraction des deux hémorphines et d'optimiser celle-ci.

L'utilisation d'une membrane contacteur située entre la phase tampon, où a lieu l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine, et la phase butan-2-ol – octan-1-ol, pourrait être envisagée. La surface d'échange membranaire se substituerait aux émulsions du système précédent et la sélectivité de l'extraction des hémorphines se ferait au niveau de cette membrane. Cette approche pourrait également être utilisée pour séparer la phase émulsion de la phase solvant afin d'éviter une étape de centrifugation.

D'autres peptides actifs ont été identifiés au sein de l'hydrolysate pepsique de l'hémoglobine à pH 4,5, tels que la néokyotorphine, le peptide potentialisateur de la

Bradykinine et la VVh-4. Ces peptides pourraient faire l'objet de recherches analogues pour leur extraction dans un système biphasique eau / solvant(s) organique(s) dans l'objectif de leur production.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**Abad-Zapatero, C., Rydel, T.J. et Erickson, J.** (1990). Revised 2.3 Å structure of porcine pepsin : evidence for a flexible subdomain.

Proteins: structure, function and genetics 8: 62-81.

**Adler-Nissen, J.** (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid.

J. Agric. Food Chem. 27 : 1256-1262.

**Anik, S.T. et Sukumar, L.** (1981). Extreme vertexes design in formulation development : solubility of butoconazole nitrate in a multicomponent system.

J. Pharm. Sci. 8 (70): 897-900.

**Antonov, V.K.** (1977). New data on pepsin mechanism and specificity.

Adv. Exp. Med. Biol. 95 : 179-198.

**Aubes-Dufau, I. et Combes, D.** (1997) Effect of different proteases on bitterness of hemoglobin hydrolysates.

Appl. Biochem. and Biotechnol. 67 : 127-138.

**Aubes-Dufau, I., Capdevielle, J., Series, J.L. et Combes, D.** (1995). Bitter peptide from hemoglobin hydrolysate : isolation and characterization.

FEBS Lett. 364 : 115-119.

**Barkhudaryan, N.A., Kellermann, J., Galoyan, A.A. et Lottspeich, F.** (1993) High molecular weight aspartic endopeptidase generates a coronaro-constrictory peptide from the  $\beta$ -chain of hemoglobin.

FEBS Lett. 329 : 215-218.

**Barkhudaryan, N.A., Oberthuer, W., Lottspeich, F. et Galoyan, A.** (1992). Structure of hypothalamic coronaro-constrictory peptide factors.

Neurochem. Res. 17 : 1217-1221.

**Bellamy, W., Wakabayashi, H., Takase, M., Kawase, K., Shimamura, S. et Tomita, M.** (1988). Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of lactoferrin B.

Med. Microbiol. Immunol. 182 : 97-105.

**Bennett, J.C.** (1967). Paper chromatography and electrophoresis ; special procedure for peptide maps.

Methods Enzymol. 11 : 330-338.

**Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A., Tarvin, T.L., Napier, J.R. et Hancock, W.S.** (1984). Rapid analysis of amino acids using pre-column derivation.

J. Chromatogr. 336 : 93-104.

**Bigelow, C.C.** (1967). On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure.

J. Theoret. Biol. 16 : 187-211.

**Black, J.A. et Hodges, R.S.** (1991) dans Mant, C.T. et Hodges, R.S. (Editors) High performance liquid chromatography of peptides and proteins : peak identification in HPLC of peptides using spectral analysis and second order spectroscopy of aromatic amino acid residues.

CRC Press, Boca Raton, FL: p563-570.

**Blishchenko, E. Yu, Mernenko, O.A., Mirkina, I.I., Satpaev, D.K., Ivanov, V.S., Tchikin, L.D., Ostrovsky, A.G., Karelin, A.A. et Ivanov, V.T.** (1996). Tumor cell cytolysis mediated by valorphin, an opioid-like fragment of hemoglobin  $\beta$ -chain.

Peptides 18 : 79-85.

**Böhlen, P., et Kleeman, G.** (1981). Analytical and preparative mapping of complex peptide mixture by reversed-phase high performance liquid chromatography.

J. Chromatogr. 205 : 65-75.

**Bouhallab, S., Molle, D. et Leonil, J.** (1992). Tryptic hydrolysis of caseino macropeptide in membrane reactor : preparation of bioactive peptides.

Biotechnol. Lett. 14 : 805-810.

**Bouhallab, S. et Touzé, C.** (1995). Continuous hydrolysis of caseinomacropeptide in a membrane reactor : kinetic study and gram-scale production of antithrombic peptides.

Lait 75 : 251-258.

**Brantl, V., Gramsch, Ch., Lottspeich, F., Henschen, F., Jaeger, K.H. et Herz, A.** (1985). Novel opioid peptides derived from mitochondrial cytochrome b : cytochromins.

Eur. J. Pharmacol. 111 : 293-294.

**Brantl, V., Gramsch, Ch., Lottspeich, F., Mertz, R., Jaeger, K.H. et Herz, A.** (1986). Novel opioid peptides derived from hemoglobin : hemorphins.

Eur. J. Pharmacol. 106 : 213-214

**Cempel, N., Aubry, J.M., Piot, J.M. et Guillochon, D.** (1995). Isolation from bovine haemoglobin of a peptide that might be used as a potential hydrophobic photosensitizer carrier.

Biotechnol. Appl. Biochem. 21 : 287-294.

**Chang, J.P., Kiehl, D.E. et Kennington, A.** (1997). Separation and characterization of the tryptic peptide mapping of recombinant bovine growth hormone by reversed-phase high-performance liquid chromatography electrospray mass spectrometry.

Rapid Commun. Mass Spectrom. 11 : 1266-1270.

**Chang, R.C.C., Huang, W.Y., Redding, T.W., Arimura, A., Coy, D.H. et Schally, A.V.** (1980). Isolation and structure of several peptides from porcine hypothalami.

Biochim. Biophys. Acta. 625 : 266-273.

**Cordano, A. et Cook, D.A.** (1985). Preclinical and clinical evaluation with casein hydrolysate products.

Dans "Nutrition for Special Needs in Infancy", chap. 9 : 119-130.

F. Lifshitz ed., Marcel Dekker, Inc., New-York.

**Cordle, C.T., Mahmoud, M.I. et Moore, V.** (1991). Immunogenicity evaluation of protein hydrolysates for hypoallergenic infant formulas.

J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 13 : 270-276.

**Cornell, J.A.** (1990) Experiments with mixtures : Designs, Models, and the Analysis of Mixture Data.

John Wiley & Sons, New York. p

**Cottrell, T.J., Harris, L.J., Tanaka, T. et Yada, R.Y.** (1995). The sole lysine residue in porcine pepsin works as a key residue for catalysis and conformational flexibility.

J. Biol. Chem. 270 : 19974-19978.

**Crosby, W.H., Munn, J.I. et Furth, F.W.** (1954). Standardizing a method for clinical hemoglobinometry.

U.S. Armed Forces Med. J. 5 : 693-703.

**D'Agostino, P.A., Hancock, J.R. et Provost, L.R.** (1995). High resolution electrospray mass spectrometry with a magnetic sector instrument: accurate mass measurement and peptide sequencing.

Rapid Commun. Mass Spectrom. 9 : 597-603.

**Dagouassat, N., Garreau, I., Zhao, Q., Sannier, F. et Piot, J.M.** (1996). Kinetic of in vitro generation of some hemorphins : early release of LVV-hemorphin-7, precursor of VV-hemorphin-7.

Neuropept. 30 : 1-5.

**Dalgalarondo, M., Dufour, E., Chobert, J.M., Bertrand-Harb, C. et Haertle, T.** (1995). Proteolysis of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\beta$ -casein by pepsin in ethanolic media.

Int. Dairy Journal 5 : 1-14.

**Davies, DR.** (1990). The structure and function of the aspartic proteinases.

Ann. Rev. Bioph. Chem. 19 : 189-215.

**Davis, T.P., Gillepsie, T.J. et Porreca, F.** (1989). Peptide fragments derived from the  $\beta$ -chain of hemoglobin (hemorphins) are centrally active in vivo.

Peptides 10 : 747-751.

**Erchegy, J., Kastin, A.J., Zadina, J.E. et Qiu, X.D.** (1992). Isolation of a heptapeptide Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln (valorphin) with some opiate activity.

Int. J. Peptide Protein Res. 39 : 477-484.

**Fiat, A.M. et Jolles, P.** (1989). Caseins of various origins and biologically active peptides and oligosaccharides : structure and physiological aspects.

Mol. Cell. Biochem. 87 : 5-30.

**Fogaça, A.C., da Silva, P.I., Teresa, Jr.M., Miranda, M., Bianchi, A.G., Miranda, A., Ribolla, P.E.M. et Daffre, S.** (1999). Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*.

The Journal of Biological Chemistry 274 : 25330-25334.

**Fonina, L.A., Gur'yanov, S.A. et Nazimov, I.V.** (1991). The structure of two myelopeptides influencing the pain sensitivity.

Dokl. AN SSSR 319 : 755-757.

**Fukui, K., Shiomi, H., Takagi, H., Hagashi, H., Kiso, Y. et Kitagawa, K.** (1983). Isolation from bovine brain of a novel analgesic pentapeptide, neo-kyotorphin, containing the Tyr-Arg (kyotorphin) unit.

Neuropharmacology 22 : 191-196.

**Fullmer, C.S. et Wasserman, R.H.** (1979). Analytical peptide mapping by high performance liquid chromatography.

J. Biol. Chem. 254 : 7208-7212.

**Galoyan, A.A.** (1997). Primary structure and biological activity of hemoglobin-related hypothalamic peptides.

Biopolymers 43 : 135-137.

**Garreau, I., Zhao, Q., Pejoan, C., Cupo, A., et Piot, J.M.** (1995). VV-hemorphin-7 and LVV-hemorphin-7 released during in vitro peptic hemoglobin hydrolysis are morphinomimetic peptides.

Neuropeptides 28 : 243-250.

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

Regul. Pept. 34 : 169-179.

**Glämsta, E.L., Meyerson, B., Silberring, J., Terenius, L. et Nyberg, F.** (1991). Isolation of a hemoglobin-derived opioid peptide from cerebrospinal fluid of patients with cerebrovascular bleedings.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 184 : 1060-1066.

**Glämsta, E.L., Mörkrid, L., Lantz, I. et Nyberg, F.** (1993a). Concomitant increase in blood plasma levels of immunoreactive hemorphin-7 and  $\beta$ -endorphin following long distance running.

Regul. Pept. 49 : 9-18.

**Graf, M.V., Saegesser, B. et Schoenenberger, G.A.** (1986). Separation of tryptophane from DSIP, a Trp-nonapeptide, by adsorption to aluminium oxide.

Anal. Biochem. 157 : 295-299.

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

J Am. Oil Chemists Soc. 56 : 345-349.

**Hancock, W.S., Bishop, C.A., Prestidge, R.L. et Hearn, M.T.W.** (1978). The use of high pressure liquid chromatography (HPLC) for peptide mapping of protein.

Anal. Biochem. 89 : 203-212.

**Hart, H. et Conia, J.M.** (1987). Introduction à la Chimie Organique.

InterEditions, Paris : pp 229-231.

**Hertmanni, P., Picque, E., Thomas, D. et Larreta-Garde, V.** (1991). Modification of protease specificity by a change in the enzyme microenvironment. Selectivity modification on a model substrate, purified soluble proteins and gluten.

FEBS Lett. 279 : 123-131.

**Hill, R.L. et Delaney, R.** (1967). Peptide mapping with automatic analysers : use of analysers and other automatic equipment to monitor peptide separations by column methods.

Methods Enzymol. 11 : 339-350.

**Houen, G. et Sando, T.** (1991). Peptide mapping in sodium dodecyl sulfate-containing buffers : control of proteolytic cleavage by organic solvent.

Anal. Biochem. 193 : 186-190.

**Huang, E.C. et Henion, J.D.** (1990). LC/MS/MS determination of protein tryptic digests.

J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1 : 158-165.

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

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

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

**Ivanov, V.T., Karelin, A.A., Philippova, M.M., Nazimov, I.V., Pletnev, V.Z.** (1997). Hemoglobin as a source of endogenous bio-active peptides: the concept of tissue-specific peptide pool. pp 171-188.

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

Human Nutrition and Metabolism. pp56-60.

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

Life Sci. 58 : 1745-1755.

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

Peptides 16 : 693-697.

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

Biochem. Biophys. Res. Commun. 202 : 410-415.

**Karelin, A.A., Philippova, M.M., Karelina, E.V., Strizhkov, B.N., Grishina, G.A., Nazimov, I.V. et Ivanov, V.T.** (1998). Peptides from bovine brain: structure and biological role.

J. Pept. Sci. 4 : 211-225.

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

Pediatr. Allergy Immunol. 4 : 146-155.

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

J. Chem. Technol. Biotechnol. 71 : 35-42.

**Kosciarz, E., Vercaigne-Marko, D., Scellier, N., Nedjar-Arroume, N. et Guillochon, D.** (1999). Selectivity modification of chymotryptic hydrolysis of haemoglobin bi its adsorption on a solid phase.

Biotechnol. Appl. Biochem. 30 : 147-153.

**Lantz, I., Glämsta, E.L., Talbäck, L. et Nyberg, F.** (1991). Hemorphins derived from hemoglobin have an inhibitory action on angiotensin converting enzyme activity.  
FEBS Lett. 287 : 39-41.

**Lebrun, F., Bazus, A., Dhulster, P. et Guillochon, D.** (1998). Solubility of heme in heme-iron enriched bovine hemoglobin hydrolysates.  
J. Agric. Food Chem. 46 : 5017-5025.

**Léké Lokombe, A.** (1994). Valorisation d'un hydrolysate de protéine obtenu à partir de l'hémoglobine bovine. Etudes expérimentales, immuno-chimiques et essais cliniques.  
Thèse de Doctorat de l'Université de Technologie de Compiègne.

**Levillain, P. et Fompeydie, D.** (1986). Spectrophotométrie dérivée : intérêts, limites et applications.  
Analisis 14 : 1-20.

**Leo, A., Hansch, C. et Elkins, D.** (1971). Partition coefficients and their uses.  
Chem. Rev. 71 : 525-554.

**Liebmann, C., Schrader, V. et Brantl, V.** (1989). Opioid receptor affinities of the blood-derived tetrapeptides hemorphin and cytochromin.  
Eur. J. Pharmacol. 166 : 523-526.

**Lignot, B.** (1998). 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 de l'Université de Technologie de Compiègne.

**Miclo, L., Perrin, E., Driou, A., Mellet, M. et Linden, G.** (1995). 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 : 186-192.

**Nedjar-Arroume, N., Castellano, A., Piot, J.M. et Guillochon, D.** (1993). Stabilizing effect of water/alcohol solvents towards autoxidation of human haemoglobin.  
Biotechnol. Appl. Biochem. 18 : 25-35.

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

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

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

**Palladino, D.E.H. et Cohen, K.A.** (1991). Application of second order derivative spectroscopy in determining aromatic amino acid content of polypeptides in size exclusion HPLC with on-line photodiode array detection.  
J. Chromatogr. Sci. 29 : 91-97.

**Pierlot, C., Leprêtre, A. and Aubry, J.M.** (1998). Experimental design, sensorial and principal components analysis : three complementary tools for cocktail optimization.  
Chemometrics 26 : 71-78.

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

**Piot, J.M., Guillochon, D. et Thomas, D.** (1988b). Size-exclusion and high-performance liquid chromatography separation of peptides from peptic hemoglobin hydrolysate obtained by ultrafiltration.  
Chromatographia 25 : 307-312.

**Piot, J.M., Guillochon, D., Zhao, Q., Leroy, Y., Ricart, G., Fournet, B. et Thomas, D.** (1989a). LC-MS of enzymatic peptic haemoglobin hydrolysate produced at the pilot-plant level.

Chromatographia 27: 128-134.

**Piot, J.M., Guillochon, D., Zhao, Q., Ricart, G., Fournet, B. et Thomas, D.** (1989b). Identification of peptides, from a peptic haemoglobin hydrolysate produced at pilot-plant scale, by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry.

J. Chromatogr. 481 : 221-231.

**Piot, J.M., Zhao, Q., Guillochon, D., Ricart, G. et Thomas, D.** (1992a). Isolation et characterization of two opioid peptides from a bovine hemoglobin peptic hydrolysate.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 189 : 101-110.

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

FEBS Lett. 299 : 75-79.

**Raida, M., Schulz-Knappe, P., Heine, G. et Forssmann, W.G.** (1999). Liquid chromatography and electrospray mass spectrometric mapping of peptides from human plasma filtrate.

J. Am. Soc. Mass Spectrom. 10 : 45-54.

**Rao, P.S., Weinstein, G.S., Wilson, D.W., Rujikarn, N. et Tyras, D.H.** (1991). Isocratic high-performance liquid chromatography-photodiode-array detection method for determination of lysine- and arginine-vasopressins and oxytocin in biological samples.

J. Chromatogr. 536 : 137-142.

**Sado, G. et Sado, M.C.** (1991). Les plans d'expériences : de l'expérimentation à l'assurance qualité.

Paris La Dédense : Afnor. 266p.

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

Biochem. Biophys. Res. Commun. 82 : 582-588.

**Scheffe, H. (1958).** Experiments with mixtures.

J. Roy. Statist. Soc. B-20 : 344-360.

**Scheffe, H. (1962).** The simplex-centroid design for experiments with mixtures.

J. Roy. Statist. Soc. B-20 : 235-263.

**Schlimme, E. et Meisel, H. (1995).** Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects.

Die Nahrung 39 : 1-20.

**Schroeder, W.A. (1967a).** Separation of peptides by chromatography on columns of Dowex 50 with volatile developers.

Methods Enzymol. 11 : 351-360.

**Schroeder, W.A. (1967b).** Separation of peptides by chromatography on columns of Dowex 1 with volatile developers.

Methods Enzymol. 11 : 361-368.

**Schroeder, W.A., Covey, T. et Hucho, F. (1990).** Identification of phosphopeptides by mass spectrometry.

FEBS Lett. 273 : 31-35.

**Schroeder, W.A., Shelton, J.B., Shelton, J.R., Huynh, V. et Telpow, D.B. (1985).** High Performance Liquid Chromatography separations of the globin chains of non-human hemoglobins.

Hemoglobin 9 : 461-482.

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

J. Neurosci. 14 : 2225-2235.

**Silberring, J. et Nyberg, F.** (1997). Rapid analysis of endogenous LVV-hemorphin-7 in cerebrospinal fluid by size exclusion chromatography and electrospray ionization mass spectrometry.

J. Chromatogr. A 777 : 41-45.

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

Life Sci. 31 : 1733-1736.

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

Nature 5737 : 410-412.

**Tang, J.** (1965). Competitive inhibition of pepsin by aliphatic alcohols.

J. Biol. Chem. 240 : 3810-3815.

**Tang, J.** (1977). Competitive inhibition of pepsin by aliphatic alcohols.

J. Biol. Chem. 240 : 3810-3815.

**Tchorbanov, B. et Iliev, I.** (1993). Limited enzymic hydrolysis of casein in the presence of ethanol.

Enzyme Microb. Technol. 15 : 974-978.

**Vaskosky, B.V., Ivanov, V.T., Mikhaleva, I.I., Kolaeva, S.G., Koboz, S.G., Yu, M., Svieryaev, V.I., Ziganshin, R.H., Sukhova, G.S. et Ignatiev, D.A.** (1990). Neokyotorphin from the brain of hibernating ground squirrels can participate in heart activation and arousal from hibernation.

Peptides, Chemistry, Structure et Biology, J.E. Rivier et G.R. Marshall, Eds Leiden ESCOM. pp 302-304.

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

*Biotechnol. Appl. Biochem.* 31 : 127-134.

**Vojnovic, D. et Chicco, D. (1997).** Mixture experiment design applied to solubility predictions.

*Drug Dev. Ind. Pharm.* 7 : 639-645.

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

*Experientia* 42 : 521-531.

**Yukhananov, R., Glämsta, E.L. et Nyberg, F. (1994).** Interaction of hemorphins with opioid receptors in the rat vas deferens and guinea-pig ileum.

*Regul. Pept. Suppl.* 1 : S239-S242.

**Zavitsanos, P. et Goetz, H.** dans Mant, C.T. et Hodges, R.S. (Editors). (1991), High performance liquid chromatography of peptides and proteins : the practical application of diode array UV-visible detectors to high-performance liquid chromatography analysis of peptides and proteins.

CRC Press, Boca Raton, FL: pp553-562.

**Zhao, Q., Garreau, I., Sannier, F. et Piot, J.M. (1997a).** Opioid peptides derived from hemoglobin : hemorphins.

*Biopolymers* 43 : 75-98.

**Zhao, Q., Lecoœur, C., Sannier, F., Garreau, I. et Piot, J.M. (1996d).** Quantitative determination of aromatic amino acids at protein surface by size exclusion HPLC coupled with second order derivative spectroscopy.

*J. Liq. Chrom. And Rel. Technol.* 19 : 1551-1566.

**Zhao, Q., Molina, P. et Piot, J.M.** (1997c). Peptic peptide mapping by HPLC, on line with photodiode array detection, of a hemoglobin hydrolysate produced at a pilot-plant scale from an ultrafiltration process.

J. Liq. Chrom. And Rel. Technol. 20 : 1717-1739.

**Zhao, Q. et Piot, J.M.** (1998a). Neokyotorphin formation and quantitative evolution following human hemoglobin hydrolysis with Cathepsin D.

Peptides 19 : 759-766.

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

**Zhao, Q. et Piot, J.M.** (1998b). Organic solvent extraction associated with HPLC in the preparation of hemorphins from bovine hemoglobin peptic hydrolysate.

Prep. Biochem. Biotechnol. 28 : 61-78.

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

Biochem. Biophys. Res. Commun. 204 : 216-223.

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

Appl. Microbiol. Biotechnol. 45 : 778-784.

**Zhao, Q., Sannier, F., Garreau, I., Lecoecur, C. et Piot, J.M.** (1996a). Reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with second-order derivative spectroscopy for the quantification of aromatic amino acids in peptides : application to hemorphins.

J. Chromatogr. A 723 : 35-41.

**Zhao, Q., Sannier, F. et Piot, J.M.** (1996b). Kinetics of appearance of four hemorphins from bovine hemoglobin peptic hydrolydates by HPLC coupled with photodiode array detection. *Biochim. Biophys. Acta* 1295 : 73-80.

**Zioudrou, C., Streaty, R.A. and Klee, W.A.** (1979). Opioid peptides derived from food proteins. The exorphins.

*J. Biol. Chem.* 10 : 2446-2449.

