UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Laboratoire ProBioGEM

Thèse présentée pour l'obtention du diplôme de

DOCTEUR EN SCIENCES

Spécialisation en Biochimie

Par

DUBOIS-DELVAL Véronique

Préparation de Peptides Antimicrobiens à partir de l'Hydrolyse Enzymatique de deux protéines : l'Hémoglobine Bovine et l'α-Lactalbumine Bovine

Directeur de Thèse
Mme Naïma NEDJAR-ARROUME

Soutenue le 07 Septembre 2006 devant le jury composé de :

Mme N. NEDJAR-ARROUME ***(Directeur de thèse)*** *Maître de Conférences - HDR à Lille I*
Mr S. BOUHALLAB ***(Rapporteur)*** *Directeur de Recherches à l'INRA de Rennes*
Mr T. HAERTLE ***(Rapporteur)*** *Professeur à l'INRA de Nantes*
Mr G. BRIAND ***(Examinateur)*** *Maître de Conférences - Praticien Hospitalier à Lille II*
Mr D. GUILLOCHON ***(Président du jury)*** *Professeur à Lille I*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Je tiens à adresser mes remerciements :

Au Professeur D. Guillochon, Directeur du Laboratoire ProBioGEM, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire et pour sa confiance depuis cinq ans.

A Mme Naïma Nedjar-Arroume, mon Directeur de Thèse, pour m'avoir encadrée et encouragée pendant ces cinq années passées ensemble. Un grand merci pour ta disponibilité et pour la confiance que tu m'as accordée au cours de ces années, et de m'avoir donnée la possibilité d'acquérir une première expérience en enseignement dans le cadre du monitorat.

Au Docteur Saïd Bouhallab (INRA de Rennes) et au Professeur Thomas Haertlé (INRA de Nantes), pour avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Au Docteur G. Briand, Directeur du Laboratoire d'Application de Spectrométrie de Masse du Service Commun de Physicochimie de Lille II, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire, et pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.

A Mostafa, pour m'avoir fait découvrir le monde des massistes. Merci pour ta disponibilité, ta gentillesse, et ta bonne humeur à chaque fois que je bouchais le capillaire !!!

Pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble, avec Choumissa, Amjad, Denise, Monique et Gilbert aussi bien au labo qu'aux congrès. Amjad n'oublie pas que nous devons aller au restaurant pakistanais ensemble !!!!

A François, pour ton aide sur la partie microbiologie, tes conseils, et nos discussions.

A Pascal, pour tous les bons moments que nous avons passé ensemble lors des « petits pots » au laboratoire, et pour tes encouragements.

A Cathy, pour ton soutien, tu t'es toujours mise en quatre pour que l'on obtienne nos commandes. Merci pour ta gentillesse.

A Fouzia, pour tes encouragements et tes précieux conseils au cours de ces années, et pour tous les bons moments passés ensemble.

A Rozenn et Didier pour votre gentillesse et votre aide, vous avez toujours été présents et de bons conseils. Merci pour tous les bons moments que nous avons passé ensemble.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

A Céline, Loredana, et Romain, pour toutes ces années passées ensemble, pour tous les fous rires que nous avons eu, surtout les vendredis après midi, et l'entraide que nous nous sommes apportes.

A ma « roumaine préférée », à qui je souhaite une très belle soutenance. Et j'espère que l'on se reverra très bientôt en France ou en Roumanie car n'oublies pas que tu dois m'emmener visiter le château de Dracula.

A Vanessa, Khalil et Sébastien, avec qui j'ai passé de très bons moments, autant au laboratoire qu'en dehors. Vanessa et Khalil, bonne chance pour vos thèses à La Rochelle et au Canada, vivement les vacances pour que je m'incruste chez vous !!!!!!!

A tous les étudiants et collègues du laboratoire, pour les bons moments passés ensemble.

A ma mère et mon frère, qui m'ont toujours soutenue dans les bons comme dans les mauvais moments. Encore merci pour vos encouragements.

A ma famille, pour votre soutien et vos encouragements.

A tous mes amis, pour vos encouragements, et votre compréhension. Je suis de retour pour les « fiestas».

A mon petit Coco, merci pour ton soutien et ton amour. Tu as toujours été aux petits soins avec moi. La vaisselle, c'est terminé pour toi, maintenant c'est moi qui la fais!!!!!!

Sans toi je n'en serais pas là aujourd'hui.

A mon père,

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

SOMMAIRE

ABREVIATIONS **p 9**

INTRODUCTION **p 10**

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS **p 15**

I. Généralités sur les peptides antimicrobiens **p 16**

I.1. Les peptides antimicrobiens issus de la synthèse non ribosomale **p 16**

I.2. Les peptides antimicrobiens issus de la synthèse ribosomale **p 16**

II. Structure des peptides antimicrobiens **p 17**

II.1. Les peptides linéaires **p 17**

II.1.1. Les peptides structurés en hélice α **p 17**

II.1.2. Les peptides non structurés **p 18**

II.2. Les peptides non linéaires **p 19**

III. Mécanisme d'action des peptides antimicrobiens **p 19**

III.1. Mécanisme entraînant la déstabilisation de la membrane cytoplasmique **p 20**

III.1.1. Modèle « Barrel stave ou Douve de Tonneau » **p 20**

III.1.2. Modèle « Wormhole ou Pores Torroïdaux » **p 21**

III.1.3. Modèle « Carpet ou Tapis » **p 21**

III.2. Mécanisme sans interaction avec la membrane cytoplasmique **p 21**

IV. Obtention des peptides antimicrobiens par hydrolyse enzymatique de protéines **p 22**

IV.1. Généralités **p 22**

IV.2. Obtention des peptides antimicrobiens par hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine **p 25**

IV.2.1. L'hémoglobine bovine **p 25**

IV.2.1.1. Structure de la globine **p 25**

IV.2.1.2. Structure de l'hème **p 27**

IV.2.2. La pepsine de porc **p 28**

IV.2.2.1. Structure **p 28**

IV.2.2.2. Mécanisme d'action **p 29**

IV.2.3. Obtention de peptides antimicrobiens **p 30**

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

IV.3. Obtention des peptides antimicrobiens par hydrolyse chymotrypsique de l'α-Lactalbumine **p 31**
IV.3.1. L'α-Lactalbumine bovine **p 31**
IV.3.1.1. Structure primaire et secondaire **p 31**
IV.3.1.2. Fixation de cations **p 32**
IV.3.1.3. Interactions avec d'autres molécules **p 33**
IV.3.1.4. Conformation de l'α-Lactalbumine **p 33**
IV.3.2. L'α chymotrypsine bovine **p 34**
IV.3.2.1. Structure **p 35**
IV.3.2.2. Mécanisme d'action **p 36**
IV.3.3. Obtention de peptides antimicrobiens **p 36**

V. Isolement et caractérisation des peptides antimicrobiens par CLHP et Spectrométrie de masse **p 37**

V.1. Isolement et purification des peptides antimicrobiens par CLHP **p 37**
V.2. Caractérisation des peptides antimicrobiens par spectrométrie de masse **p 38**

MATERIELS ET METHODES **p 42**

I. L'hémoglobine bovine **p 43**

I.1. Dosage de l'hémoglobine **p 43**
I.2. Dénaturation de l'hémoglobine par l'urée **p 43**
I.2.1. Solution d'hémoglobine à 2% dénaturée par l'urée à pH 2 **p 43**
I.2.2. Solution d'hémoglobine à 1% dénaturée par l'urée à pH 3,5 ou 4,5 ou 5,5 **p 43**
I.2.3. Solution d'hémoglobine à 1% à pH 3,5 ou 4,5 ou 5,5 **p 44**
I.3. Dosage de l'activité de la pepsine en solution **p 44**
I.4. Hydrolyse pepsique de l'hémoglobine en solution **p 45**
I.4.1. Hydrolyse pepsique de l'hémoglobine en fonction du pH **p 45**
I.4.2. Hydrolyse pepsique de l'hémoglobine en fonction de la température **p 45**
I.5. Extraction des peptides antimicrobiens par des systèmes biphasiques (eau/alcools) **p 45**

II. L'α–Lactalbumine bovine **p 46**

II.1. Préparation de la solution d'α-Lactalbumine **p 46**
II.2. Dosage de l'activité de l'α chymotrypsine en solution **p 47**

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

II.3. Hydrolyse chymotrypsique de l'α-Lactalbumine en solution **p 48**
II.3.1. Inhibition de l'activité enzymatique de la chymotrypsine **p 48**
II.3.2. Détermination du rapport enzyme sur substrat **p 48**
II.3.3. Hydrolyse chymotrypsique de l'α-Lactalbumine dans le tampon phosphate de sodium 100mM pH 7,4 **p 48**
II.3.4. Hydrolyse chymotrypsique de l' α-Lactalbumine dans le tampon TRA 200mM + $CaCl_2$ 20mM pH 7,8 **p 48**
II.4. Réduction des ponts disulfures des peptides issus de l'hydrolyse chymotrypsique de l' α-Lactalbumine **p 49**

III. Détermination du degré d'hydrolyse par la méthode de l'acide trinitribenzène sulfonique (T.N.B.S.) **p 49**

IV. Méthode d'analyses des peptides **p 51**

IV.1. Analyse des peptides par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse **p 51**
IV.2. Analyse des peptides par spectrométrie de masse **p 52**
IV.2.1. Technique de la désorption laser assistée par matrice : MALDI – TOF **p 53**
IV.2.1.1. Principe **p 54**
IV.2.1.2. Protocole d'analyse **p 55**
IV.2.2. Technique de l'ionisation Electrospray – Ionspray **p 56**
IV.2.2.1. Principe **p 56**
IV.2.2.2. Protocole d'analyse **p 60**
IV.2.2.2.1. Etude des peptides par couplage LC / MS **p 60**
IV.2.2.2.2. Etude des peptides par ESI / MS **p 60**

V. L'activité antimicrobienne **p 64**

V.1. La méthode en double couche (Parish *et al.*, 2001) **p 64**
V.2. Détermination de la CMI **p 66**

VI. L'activité hémolytique **p 69**

VII. Détermination du coefficient d'absorption molaire des peptides **p 70**

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

RESULTATS ET DISCUSSIONS **p 72**

CHAPITRE I **p 73**

OBTENTION ET CARACTERISATION DE PEPTIDES ANTIMICROBIENS A PARTIR DE L'HYDROLYSE PEPSIQUE DE L'HEMOGLOBINE BOVINE

I.1. Hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine **p 74**

I.2. Obtention de peptides antimicrobiens **p 81**

I.2.1. Mise en évidence des peptides à activité antimicrobienne à partir de l'hydrolysat d'hémoglobine bovine **p 81**

I.2.2. Identification et caractérisation des peptides antimicrobiens par spectrométrie de masse **p 84**

I.2.3.Détermination de la CMI et du mode d'action des peptides antimicrobiens purs **p 88**

I.2.4. Détermination de l'effet hémolytique **p 89**

I.2.5. Propriétés structurales des peptides antimicrobiens purs **p 90**

I.3. Purification des fractions antimicrobiennes par CLHP **p 91**

I.4. Amélioration des méthodes de préparation des peptides antimicrobiens **p 98**

I.4.1. Etude de l'extraction des peptides antimicrobiens par des systèmes biphasiques (eau/alcools) **p 98**

I.4.2. Etude de l'effet de la température sur la cinétique d'apparition des peptides antimicrobiens **p 110**

I.4.3. Etude de l'effet du pH sur la cinétique d'apparition des peptides antimicrobiens **p 113**

CHAPITRE II **p 120**

MISE EN EVIDENCE DE PEPTIDES ANTIMICROBIENS A PARTIR DE L'HYDROLYSE CHYMOTRYPSIQUE DE L'α-LACTALBUMINE

II.1. Mise au point des conditions d'hydrolyse de l'α-Lactalbumine par l' α chymotrypsine **p 122**

II.1.1. Détermination du rapport enzyme sur substrat **p 123**

II.1.2. L'arrêt de la réaction **p 124**

II.2. Etude de cinétiques d'hydrolyse de l' α-Lactalbumine par l' α chymotrypsine **p 129**

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

II.3. Etude et identification de la population peptidique au cours de la cinétique d'hydrolyse de l' α-Lactalbumine par spectrométrie de masse **p 148**

II.3.1. Analyse du T_0 **p 151**

II.3.2. Analyse de l'hydrolysat de 0,5 minutes **p 152**

II.3.3. Analyse de l'hydrolysat de 1 minute **p 156**

II.3.4. Analyse de l'hydrolysat de 2,5 minutes **p 159**

II.3.5. Analyse de l'hydrolysat de 5 minutes **p 162**

II.3.6. Analyse de l'hydrolysat de 10 minutes **p 165**

II.3.7. Analyse de l'hydrolysat de 15 minutes **p 167**

II.3.8. Analyse de l'hydrolysat de 30 minutes **p 170**

II.3.9. Analyse de l'hydrolysat de 1 H **p 173**

II.3.10. Analyse de l'hydrolysat de 2 H **p 177**

II.3.11. Analyse de l'hydrolysat de 3 H **p 180**

II.3.12. Analyse de l'hydrolysat de 12 H **p 186**

II.3.13. Analyse de l'hydrolysat de 24 H **p 192**

II.3.14. Répartition et évolution des peptides **p 197**

II.4. Mise en évidence d'activité antimicrobienne au cours de la cinétique d'hydrolyse de l' α-Lactalbumine **p 209**

CONCLUSION ET PERSPECTIVES **p 215**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **p 218**

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Principales abréviations utilisées

α -Lac	Alpha-lactalbumine
AA	Acides aminés
CID	Collision Induced Dissociation
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
DH	Degré d'Hydrolyse
D.O.	Densité Optique (en nm)
DTT	Dithiotreitol
E/S	Rapport Enzyme/Substrat
ESI	Ionisation Electrospray
HB	Hémoglobine Bovine
LC/MS	Couplage chromatographie liquide et spectrométrie de masse
LPS	Lipopolysacharride
LVVH7	LVV-hémorphine-7
MALDI	Désorption/ionisation laser assistée par matrice
MG	Molten Globule
MS	Spectrométrie de Masse
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
nanoESI	nanoélectrospray
NKT	Néokyotorphine
pHi	Point isoélectrique
Suc-AAPF-Pna	N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide
TCA	Acide trichloroacétique
TFA	Acide trifluoroacétique
Tm	Température de demi dénaturation
TOF	Temps de vol (*Time of Light*)
TRA	Triethanolaminehydrochloride
UFC	Unité Formant Colonie
VVH 7	VV-hémorphine-7

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

INTRODUCTION

© 2006 Tous droits réservés.

http://www.univ-lille1.fr/bustl

Face à l'émergence de bactéries pathogènes résistantes, la découverte de nouvelles molécules antimicrobiennes possédant un mécanisme d'action différent de celui des antibiotiques classiques, présente un intérêt non négligeable.

Dans les années soixante dix, des peptides présentant une activité antimicrobienne furent découverts chez les amphibiens, les insectes et les plantes (Csordas et Michl 1970, Habermann 1972, et Fernandez de Caleya *et al.,* 1972). Ces découvertes ont déclenché un intérêt croissant pour isoler et identifier d'autres peptides antimicrobiens. Depuis, de nombreux peptides antimicrobiens issus de différentes espèces ont été découverts (Hancock et Chapple 1999, Izadpanah et Gallo 2005).

Les peptides antimicrobiens se repartissent en deux catégories : ceux synthétisés par voie non ribosomale, et ceux obtenus par synthèse ribosomale. Ces derniers constituent une part importante de l'immunité innée : après leur synthèse, ils sont stockés dans des granules au sein de leucocytes ou de cellules épithéliales, puis lorsque l'organisme est attaqué par un agent pathogène, ces peptides antimicrobiens sont libérés sur le lieu de l'infection et constituent la première ligne de défense de l'organisme (Devine 2003, Marshall et Arenas 2003, et Levy 2004).

Certains de ces peptides antimicrobiens ne sont pas obtenus par synthèse mais par la dégradation protéolytique de certaines protéines présentes au sein de l'organisme. Au cours des années 1990, plusieurs peptides possédant des activités antimicrobiennes ont été mis en évidence in vitro dans des hydrolysats de protéines. Tomita *et al.,* (1991), ont été les premiers à mettre en évidence les effets inhibiteurs d'un hydrolysat pepsique de lactoferrine, vis à vis de bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif, de levures et de champignons filamenteux. L'activité antimicrobienne de cet hydrolysat pepsique de lactoferrine est due à la présence d'un peptide la lactoferricine isolée par Bellamy *et al.,* (1992). L'hydrolyse des caséines a permis également de générer des peptides antimicrobiens. A partir de l'α_{s2}-caséine, Zucht *et al.,* en 1995, ont isolé la casocidine I (165-203), puis en 1999, Recio et Visser, ont identifié deux autres peptides antimicrobiens correspondant aux fragments 183-207 et 164-179, après hydrolyse pepsique. En 1996, Lahov et Regelson ont isolé un peptide l'isracidine, correspondant au fragment 1-23 de l'α_{s1}caséine. Deux peptides antimicrobiens ont été obtenus à partir de la κ-caséine. Le premier a été isolé et identifié par Malkoski *et al.,* (2001) au sein d'un hydrolysat obtenu par action de la chymosine et de l'endoprotéinase Glu-C. Ce peptide nommé kappacine correspondant au fragment 138-158, possède une activité vis à vis de germes pathogènes de la bouche. Le second peptide dont la séquence correspond au fragment 6-117, a été isolé par Liepke *et al.,* (2001) à partir d'une hydrolyse pepsique.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Deux protéines du lactosérum l'α-Lactalbumine et la β-Lactoglobuline, ont aussi générés par hydrolyse protéolytique plusieurs peptides présentant une activité antimicrobienne. Pellegrini *et al.,* en 1999, ont isolé par hydrolyse trypsique et chymotrypsique de l'α-Lactalbumine trois peptides, LTD1 (α 1-5), LTD2 (α 17-31 / 109-114), et LDC (α 61-68/75-80) principalement actifs vis à vis des bactéries à Gram-positif, puis en 2001, après digestion trypsique de la β-lactoglobuline, quatre peptides (15-20, 25-40, 78-83, et 92-100) ayant une activité antimicrobienne vis à vis des bactéries à Gram-positif.

Si la majorité de ces peptides antimicrobiens a été isolée à partir de l'hydrolyse enzymatique de protéines du lait, plusieurs auteurs ont rapporté l'obtention de peptides antimicrobiens par hydrolyse enzymatique d'autres protéines. Ibrahim *et al.,* ont en 1998, isolé par hydrolyse acide ménagée de l'ovotransferrine de poule, un peptide (109-200) possédant une activité antimicrobienne vis à vis de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* K12. Puis en 2001, ils ont également isolé après hydrolyse par la clostripaïne du lysozyme de blanc d'œuf de poule un peptide (98-112) ayant des propriétés antibactériennes vis à vis des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif.

En 1999, Fogaça *et al.,* ont isolé de l'hémolymphe d'un tique parasitant les bovins (*Boophilus microplus*), un peptide actif contre des bactéries à Gram-positif et des champignons. Ces auteurs ont montré que la séquence de ce peptide correspondait au fragment 33-61 de la chaîne α de l'hémoglobine bovine mais, n'ont pu obtenir celui-ci par hydrolyse enzymatique. L'hémoglobine bovine, est connue pour être une source de peptides présentant des activités biologiques (Ivanov *et al.,* 1997). Au sein du laboratoire, plusieurs peptides actifs ont pu être obtenus lors de son hydrolyse pepsique : un peptide solubilisateur de l'héme : β 1-30 (Lebrun *et al.,* 1998), un peptide transporteur d'agents photosensibilisants : α 110-125 (Cempel *et al.,* 1995), des peptides opioïdes : la LVV hémorphine-7 (β 31-40), la VV hémorphine-7 (β 32-40) (Piot *et al.,* 1992), et la VV hémorphine-4 (β 32-37) (Lignot *et al.,* 1999). A partir de 2001, deux équipes ont réussi à identifier d'autres peptides antimicrobiens. Parish *et al.,* ont obtenu après coupure des chaînes de l'hémoglobine humaine par le bromure de cyanogène quatre fragments issus de la chaîne β présentant des activités antimicrobiennes contre des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif. Et au sein du laboratoire, Froidevaux *et al.,*(2001a) ont pour la première fois, mis en évidence et préparé par hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine bovine, un peptide antimicrobien, le peptide α 1-23, actif vis à vis de *Micrococcus luteus*.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Le premier objectif de cette étude est de générer de nouveaux peptides antimicrobiens à partir de l'hydrolyse enzymatique de deux protéines, de structures différentes. La première protéine choisie, est une protéine possédant une structure en hélice α : l'hémoglobine bovine, qui a fait l'objet de nombreuses études (Lignot, 1998). Avec l'établissement de la cartographie peptidique au cours de sa cinétique d'hydrolyse par la pepsine, l'hémoglobine bovine est devenue un modèle d'étude au sein du laboratoire. Le but de son hydrolyse est de générer des peptides de grande taille gardant cette structure en hélice α, caractéristique de nombreux peptides antimicrobiens. Le choix de la deuxième protéine s'est porté sur une petite protéine du lactosérum contenant quatre ponts disulfures : l'α-Lactalbumine bovine, dont la structure secondaire est formée d'un domaine en hélice α et d'un domaine en feuillets β. Le but de cette hydrolyse consiste d'une part à mettre en place un nouveau modèle d'étude par l'établissement de la population peptidique au cours de la cinétique d'hydrolyse, et d'autre part de générer des peptides antimicrobiens avec des ponts disulfures.

Cependant l'obtention des peptides antimicrobiens est encore mal maîtrisée. En effet, ce sont souvent des peptides intermédiaires, et leurs concentrations dans les hydrolysats protéiques sont faibles. Ainsi, leur isolement doit être réalisé par des techniques de fractionnement et de purification lourdes mettant en œuvre plusieurs étapes chromatographiques coûteuses. Certaines équipes ont cherché à simplifier ces étapes de purification, par la mise en place de système d'extraction liquide-liquide de ces peptides. A partir d'hydrolysats d'hémoglobine bovine, Aubes-Dufau *et al.,* (1995, 1997) ont permis l'extraction de peptides amers, et Zhao et Piot (1998), celle des peptides opioïdes par le butan-1-ol et le butan-2-ol. Froidevaux *et al.,* (2001b) ont 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 un mélange biphasique eau / butan-2-ol-octan-1-ol. Le second objectif de cette étude est d'améliorer les méthodes de préparation des peptides antimicrobiens à partir de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine, selon deux orientations : la première consiste à mettre en place un système biphasique eau/alcool permettant d'extraire sélectivement ces peptides antimicrobiens. La seconde orientation consiste à étudier l'influence de la température d'incubation ou du pH du milieu réactionnel sur les cinétiques d'apparition des peptides antimicrobiens.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Après des rappels bibliographiques sur les peptides antimicrobiens concernant leur structure, leur mécanisme d'action, leur obtention ainsi que leur isolement et caractérisation, les résultats de cette étude seront exposés en deux chapitres.

Dans le premier chapitre, le premier point abordé concernera l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine, permettant de générer des peptides antimicrobiens. Le second point abordera la localisation, l'identification et la caractérisation de ces peptides antimicrobiens. Puis l'amélioration des méthodes de préparation de ces peptides antimicrobiens intermédiaires sera abordée en dernier point.

L'établissement d'un nouveau modèle d'étude à partir de l'α-Lactalbumine sera abordé dans le second chapitre. Dans un premier temps, l'hydrolyse de l'α-Lactalbumine par l'α-chymotrypsine et la cartographie peptidique au cours du temps seront établies. Puis dans un second temps, la mise en évidence d'une activité antimicrobienne au sein de la cinétique d'hydrolyse de l'α-Lactalbumine par la chymotrypsine sera abordée.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES SUR

LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS

© 2006 Tous droits réservés.

http://www.univ-lille1.fr/bustl

I. Généralités sur les peptides antimicrobiens

Le premier peptide antimicrobien fut découvert chez la grenouille en 1970 par Csordas et Michl. Ce peptide appelé « bombinine », avait été isolé à partir des secrétions épidermiques. Puis en 1972, la « melittine » fut découverte, dans le venin d'abeille (Habermann). Depuis, de nombreux peptides antimicrobiens de diverses origines ont été découverts.

Les bactéries ont depuis quelques années, développé des mécanismes de défense contre l'action des antibiotiques utilisés dans la pharmacopée. Il s'est alors avéré essentiel de trouver et d'identifier de nouvelles molécules « antibiotiques ».

A ce jour, plus de 700 peptides antimicrobiens ont été découverts. Ceux-ci présentent des structures très diverses, et possèdent un mécanisme d'action assez complexe.

Les peptides antimicrobiens sont souvent des molécules amphiphiles contenant un nombre important de résidus arginine et/ou lysine dans leur séquence, leur permettant d'acquérir une charge globale positive et donc d'interagir avec les membranes des bactéries. Ils possèdent également un nombre de résidus acides aminés inférieur à 50, et un pourcentage élevé en résidus hydrophobes (≈ 50%).

D'après Hancock et Chapple (1999), les peptides antimicrobiens se répartissent en deux catégories : ceux issus d'une synthèse non ribosomale, et ceux dit « naturels » issus d'une synthèse ribosomale.

I.1. Les peptides antimicrobiens issus de la synthèse non ribosomale

Ces peptides sont généralement issus de bactéries, de levures, ou de champignons. Leur synthèse a lieu au sein des complexes multienzymatiques formés de diverses synthétases, capables de former des peptides de structure très différente. Ils peuvent être constitués d'acides aminés L ou D, d'acides aminés hydroxylés ou non usuels. Des modifications peuvent avoir lieu comme des glycosilations, des méthylations en $N_{terminal}$, et des cyclisations.

I.2. Les peptides antimicrobiens issus de la synthèse ribosomale

Ces peptides antimicrobiens dits « naturels », sont issus de différents organismes allant des mammifères aux plantes en passant par les insectes, les amphibiens et les bactéries.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Chez les organismes multicellulaires, ils font partie intégrante du système immunitaire inné et assurent la première ligne de défense de l'organisme lors d'une infection par un agent pathogène.

Leur obtention peut se faire par deux voies différentes. La première passe par la voie métabolique : les peptides sont synthétisés, stockés et libérés lors d'une agression de l'organisme par un pathogène. La deuxième passe par l'utilisation de certaines protéines présentes dans l'organisme. Ces protéines, peu ou pas actives vis-à-vis des microorganismes pathogènes, sont dégradées par des enzymes protéolytiques permettant de générer des peptides antimicrobiens (Marshall et Arenas, 2003, et Bulet *et al.*, 2004).

II. Structure des peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens se repartissent dans deux familles. La première famille regroupe l'ensemble des peptides linéaires, et la deuxième famille, regroupe les peptides non linéaires comportant un ou plusieurs ponts disulfures (Toke, 2005). Chaque famille comporte des peptides antimicrobiens caractérisés par des structures diverses.

Un peptide antimicrobien, pour interagir avec la membrane des bactéries, doit posséder au sein de sa structure plusieurs caractéristiques essentielles : une charge positive globale permettant l'interaction avec la membrane, un caractère amphiphile permettant l'insertion du peptide dans la membrane, et un caractère hydrophobe pour les interactions et la perméabilisation de la membrane (Yeaman et Yount, 2003).

II.1. Les peptides linéaires

La famille des peptides linéaires est la plus représentée au sein des peptides amphiphiles cationiques. Cette famille se divise en deux groupes : d'un coté les peptides linéaires pouvant adopter une structure en hélice α, et de l'autre les peptides non structurés (extended peptide).

II.1.1. Les peptides structurés en Hélice α

La plupart des peptides linéaires ont tendance à adopter une structure en hélice α (Figure 1). Les peptides les plus représentatifs, appartiennent à la famille des magainines, peptides isolés chez les amphibiens (Powers et Hancock, 2003).

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Ces peptides induisent une perméabilisation membranaire. Après interaction avec les phospholipides de la membrane, ils forment des pores, ce qui permet leur insertion à travers la membrane des bactéries.

Figure 1. *Structure secondaire d'un peptide en Hélice α.*

La conformation en hélice α est caractérisée en son centre par une légère courbe qui semble être nécessaire à la suppression de l'effet hémolytique (Powers et Hancock, 2003). En général, ces peptides ne sont pas structurés en solution, ils ne se structurent qu'au contact de la membrane des bactéries.

La charge globale du peptide a une grande importance. En effet, une augmentation de celle-ci entraîne une augmentation de l'activité antimicrobienne mais également de l'effet hémolytique (Dathe *et al.,* 2001).

II.1.2. Les peptides non structurés

Ces peptides n'adoptant pas de structure secondaire en hélice α ou en feuillet β, sont appelés « extended peptide » (Powers et Hancock, 2003). Ils possèdent une séquence en acides aminés particulière. Celle-ci contient un pourcentage élevé en certains acides aminés (Figure 2).

Figure 2. *Structure secondaire d'un peptide non structuré.*

Les peptides les plus répandus sont ceux riches en : Histidine (Histatine), Proline et Arginine (Pr 39), Proline et Phénylalanine (Prophenine), et Tryptophane (Tritrplicine et Indolicine (Epand et Vogel, 1999, et Powers et Hancock, 2003).

Au contact de la membrane, ils s'organisent en « coude » avec une répartition des résidus hydrophile/hydrophobe sur leur surface, et induisent la perméabilisation de la membrane sans lyse de celle-ci.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

II.2. Les peptides non linéaires

La famille des peptides non linéaires est formée de peptides contenant un ou plusieurs ponts disulfures (Figure 3). Les peptides sont repartis dans trois classes en fonction du nombre de pont(s) disulfure(s) qu'ils contiennent (Toke, 2005).

La première classe correspond aux peptides contenant un ou deux ponts disulfures comme la Protegrine (Toke, 2005). La deuxième contient des peptides avec trois ou quatre ponts disulfures formant un cycle ouvert comme les défensines (Izadpanah et Gallo, 2005). Et la troisième classe est constituée de peptides cycliques.

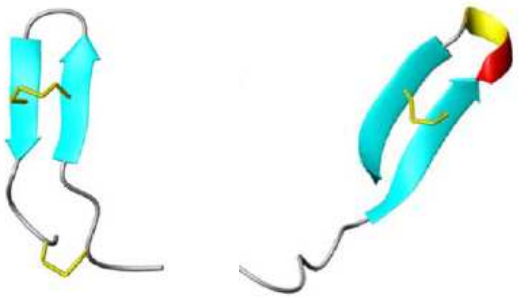


Figure 3. *Structure secondaire des peptides non linéaires.*

La structure des peptides non linéaires, est souvent caractérisée par une série de feuillets β anti-parallèles. Elle garde un caractère amphiphile par la présence de petites portions en hélices α nécessaire aux interactions et à la perméabilisation membranaire.

La présence de ponts disulfures donne à la structure une certaine rigidité et stabilité. La perte d'un ou plusieurs ponts disulfures entraîne une perte de l'activité qui peut être totale (Pellegrini *et al.*, 1999) ou partielle (Fazio *et al.,* 2006).

III. Mécanisme d'action des peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens possèdent un mécanisme d'action assez complexe. Celui-ci dépend de la structure du peptide, et du type de la bactérie cible (Gram-positif ou Gram-négatif).

Le caractère amphiphile des peptides permet leur intégration dans la membrane bactérienne. Les peptides cationiques ont tendance à interagir avec le lipopolysacharide (LPS) des bactéries à Gram-négatif entraînant des perturbations au sein de la membrane.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Le mécanisme d'action des peptides antimicrobiens se fait en plusieurs étapes (Powers et Hancock, 2003 et Yeaman et Yount, 2003). La première étape consiste à la structuration du peptide au contact de la membrane. En général, les peptides en solution ne sont pas structurés. Ils ne se structurent qu'en présence de la membrane lipidique.

La deuxième étape consiste à l'interaction des charges positives des peptides avec les charges négatives des phospholipides des membranes bactériennes. Ils interagissent avec le lipopolysacharide (LPS) des bactéries à Gram-négatif ou le peptidoglycane des bactéries à gram-positif (Epand et Vogel, 1999). Le peptidoglycane constitué d'acides teichoiques et d'acides teichuroniques, permet l'apport de charges négatives sur la membrane nécessaire pour interagir avec les peptides antimicrobiens.

Pour les bactéries à Gram-négatif, le peptide antimicrobien interagit avec le LPS, provoquant le déplacement des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} situés à la surface de la membrane. Ce qui crée une perturbation de la membrane et permet l'intégration du peptide à travers la membrane. Après passage de la membrane externe, les peptides vont interagir avec la membrane cytoplasmique.

L'interaction avec la membrane cytoplasmique peut se faire selon deux types de mécanismes. Le premier provoque une déstabilisation de la membrane tandis que le deuxième ne provoque pas de perturbations au sein de la membrane (Powers et Hancock, 2003).

III.1. Mécanisme entraînant la déstabilisation de la membrane cytoplasmique

Ce mécanisme correspond généralement à celui des peptides structurés. La déstabilisation de la membrane peut se faire selon trois modèles distincts, appelés « Barrel Stave », « Pores toroïdaux », et « Carpet » (Yeaman et Yount, 2003 et Sanderson, 2005).

III.1.1. Modèle « Barrel Stave ou Douve de Tonneau »

Dans ce mécanisme, les peptides amphiphiles s'orientent perpendiculairement à la membrane afin de mettre leurs résidus hydrophobes en contact avec les lipides, et les résidus polaires au centre de la molécule (Figure 4). Lorsqu'un certain seuil est atteint, les peptides s'internalisent et se regroupent dans la membrane. Le peptide pénètre dans la membrane et forme un canal sous forme de tonneau à travers celle-ci, entraînant une fuite du contenu cytoplasmique. La formation de ces tonneaux est dépendante de la concentration en peptides. A faible concentration, les peptides ne produisent qu'une perturbation locale de la membrane, puis quand la concentration augmente, ils s'organisent en formant un pore.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

III.1.2. Modèle « Wormhole ou Pores Toroïdaux »

Ce modèle est très proche du modèle précédent. La différence se situe dans la formation du pore. Dans ce mécanisme, le pore est formé par une alternance de peptides et de lipides (Figure 4). Les peptides s'insèrent dans la membrane après leur fixation, en déplaçant les têtes des phospholipides, et provoquant une courbure de la membrane. Cette tension au sein de la membrane permet l'orientation perpendiculaire des peptides et la formation du pore.

III.1.3. Modèle « Carpet ou Tapis »

Le modèle « Carpet », souvent décrit comme un mécanisme du type détergent, correspond à un mécanisme sans insertion des peptides et sans formation de pores dans la membrane (Figure 4). Les peptides s'alignent et s'accumulent à la surface de la membrane, induisant une perturbation locale, puis des perforations entraînant la fuite de composés cytoplasmiques.

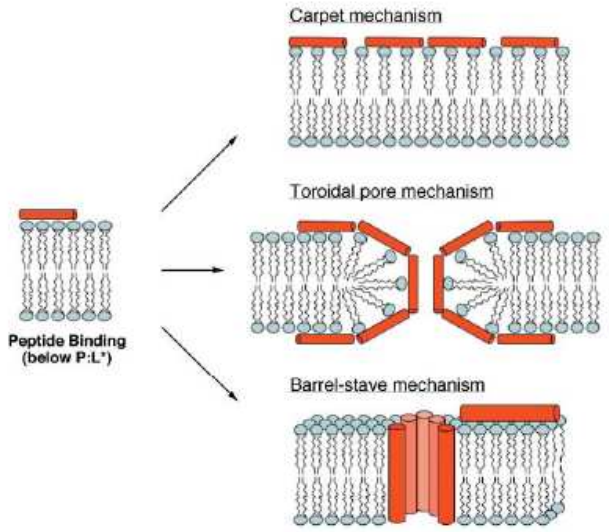


Figure 4. *Mécanismes d'interaction des peptides antimicrobiens avec la membrane bactérienne.*

III.2. Mécanisme sans interactions avec la membrane cytoplasmique

Ce sont des peptides qui semblent agir au niveau du cytoplasme. Ce mécanisme est employé par les peptides riches en un acide aminé. Le passage du peptide à travers la membrane, se ferait par translocation comme celle présentée pour les agrégats micellaires (Powers et Hancock, 2003). Dans le cytoplasme, ils peuvent interagir avec plusieurs cibles : l'ADN, l'ARN, et les protéines cytoplasmiques afin d'inhiber leur synthèse.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

IV. Obtention des peptides antimicrobiens par hydrolyse enzymatique de protéines

IV.1. Généralités

A partir des années 1990, plusieurs peptides possédant des activités antimicrobiennes vis-à-vis de bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif, ont été mis en évidence et isolés au sein d'hydrolysats de protéines. La nature de ces protéines est très diverse telle que les caséines (Zucht *et al.*, 1995, et, Lahov et Regelson, 1996), le lysozyme (Ibrahim *et al.*, 2001), l'ovotransferrine (Ibrahim *et al.*, 1998), la lactoferrine (Bellamy *et al.*, 1992), la β-Lactoglobuline (Pellegrini *et al.*, 2001)….

Les protéines du lait représentent une source potentielle et attractive de peptides antimicrobiens (Pellegrini, 2003). Plusieurs protéines du lactosérum (lactoferrine, α-Lactalbumine et β-Lactoglobuline) ainsi que les caséines (caséine α_{S1}, caséine α_{S2}, caséine κ) ont permis l'obtention de peptides antimicrobiens lors de leur hydrolyse par des enzymes digestives (Clare *et al.*, 2003, et Floris *et al.*, 2003). L'ensemble des peptides antimicrobiens issus de ces protéines est présenté dans le tableau I.

Si la majorité des peptides antimicrobiens préparés par hydrolyse enzymatique de protéines, a été isolée à partir de protéines du lait, plusieurs auteurs (Froidevaux *et al.*, 2001a, Mak *et al.*, 2004, Daoud *et al.*, 2005 et Nedjar-Arroume *et al.*, 2006) ont rapporté l'obtention de peptides antimicrobiens par hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine, protéine connue pour être une source de peptides à activités biologiques (Ivanov *et al.*, 1997). Ces peptides antimicrobiens sont nommés Hèmocidines pour « peptides antimicrobiens dérivés de protéines contenant une molécule d'hème » (Dubin *et al.*, 2005). Le tableau II présente l'ensemble des peptides antimicrobiens obtenus à partir de l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine.

Dans cette étude, l'obtention de peptides antimicrobiens a été recherchée à partir de l'hydrolyse enzymatique de deux protéines, l'hémoglobine bovine et l'α-Lactalbumine bovine.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

© 2006 Tous droits réservés.

Protéine	Peptide	Activité vis-à-vis de bactéries	Enzyme	Référence
α –Lactalbumine Bovine	LDT1 (1-5) LDT2 (17-31/109-114) LDC (61-68/75-80)	Gram-positif	Trypsine α -Chymotrypsine	Pellegrini et al., 1999
β -Lactoglobuline Bovine	15-20 25-40 78-83 92-100	Gram-positif	Trypsine	Pellegrini et al., 2001
Caséine α_{S1} Bovine	Isracidin (1-23)	Gram-positif et Gram-négatif	Chymosine	Lahov et al., 1996
Caséine α_{S2} Bovine	Casocidin I (150-188) 164-179 183-207	Gram-positif et Gram-négatif	Inconnue Pepsine	Zucht et al., 1995 Recio et al., 1999
Caséine κ Bovine	Kappacin (106-169)	Gram-positif et Gram-négatif	Chymosine	Malkoski et al., 2001
Caséine κ Humaine	43-97	Gram-positif et Gram-négatif	Pepsine	Liepke et al., 2001
Lactoferrine Bovine	Lactoferricine B (17-41)	Gram-positif et Gram-négatif	Pepsine Chymosine	Wakabayashi et al., 2003
Lactoferrine Humaine	Lactoferricine H (1-11/12-47) 1-16/43-48	Gram-positif et Gram-négatif	Pepsine	Wakabayashi et al., 2003
	1-42/43-48 1-16/17-48	Gram-négatif	Pepsine Chymosine	
	1-16/45-48 1-11/17-47	Gram-positif	Pepsine	
Lactoferrine Caprine	Lactoferricine C (14-42)	Gram-positif et Gram-négatif	Pepsine	Recio et al., 2000

Tableau I. *Peptides antimicrobiens issus de l'hydrolyse des protéines du lait.*

http://www.univ-lille1.fr/bustl

Thèse de Véronique Dubois-Delval, Lille 1, 2006

© 2006 Tous droits réservés.

Protéine	Peptide	Activité vis-à-vis de bactéries	Enzyme	Référence
Hémoglobine bovine	α 1-23	Gram-positif	Pepsine	Froidevaux et al., 2001a
	α 33-61	Gram-positif	Inconnue	Fogaça et al., 1999
	α 107-136	Gram-positif et Gram-négatif	Pepsine	Daoud et al., 2005
	α 107-141 α 133-141 α 137-141 β 126-145	Gram-positif et Gram-négatif	Pepsine	Nedjar-Arroume et al., 2006
Hémoglobine Humaine	α 1-40 α 1-33 α 1-32 α 1-31 α 1-29 α 1-20 α 18-44 α 35-80 α 35-77 α 110-131 β 1-30 β 43-83 β 111-146	Gram-négatif	Protéinases	Mak et al., 2004
	β 115-146 α 35-56	Gram-positif et Gram-négatif		

Tableau II. *Peptides antimicrobiens issus de l'hydrolyse de l'hémoglobine.*

http://www.univ-lille1.fr/bustl

Thèse de Véronique Dubois-Delval, Lille 1, 2006

IV.2.Obtention des peptides antimicrobiens par hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine

La mise en évidence et la caractérisation de nouveaux peptides antimicrobiens ont été effectuées à partir de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine.

IV.2.1. L'hémoglobine bovine

L'hémoglobine bovine est une protéine de 64500 Da, constituée d'une partie protéique, la globine, et d'un hème. Quelque soit l'espèce, l'hème représente la partie constante de l'hémoglobine, et les différences se situent au niveau de la globine.

IV.2.1.1. Structure de la globine

Chez tous les vertébrés, la globine est un tétramère formé par l'association de quatre chaînes polypeptidiques identiques deux à deux : deux chaînes alpha (ou globines α) et deux chaînes bêta (ou globines β) (Figure 5). Chacune des chaînes adopte une conformation spatiale lui donnant une forme globulaire et ménageant une « poche » superficielle dans laquelle se loge l'hème (une molécule d'hémoglobine peut ainsi fixer 4 molécules d'oxygène).

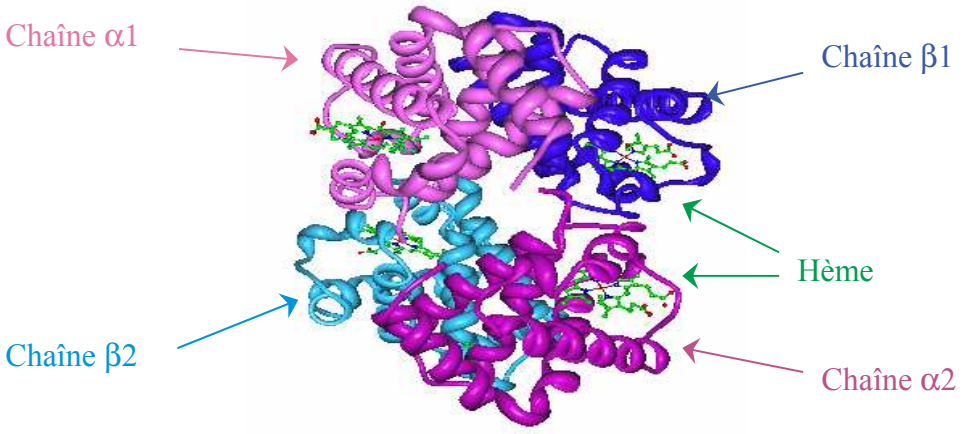


Figure 5. *Structure spatiale de l'hémoglobine.*

Le tétramère résulte de l'association de deux dimères fonctionnels : α1 β1 et α2 β2, disposés de façon à ce que la sous unité α1 soit au contact de la sous unité β2 et α2 de β1. La cohérence du tétramère (α2-β2) résulte de liaisons dues aux chaînes latérales hydrophobes des acides aminés situés à la périphérie de chaque globine (Perutz, 1960, et Safo et Abraham, 2001).

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

La structure spatiale de la globine a été remarquablement conservée depuis l'apparition de la molécule ancestrale qui remonte sans doute à quelques 600 à 700 millions d'années.

♦ La chaîne α

La chaîne α de 15 053 Da est formée de 141 acides aminés (Sasakawa, 1961). La figure 6 montre la séquence linéaire en acides aminés de la chaîne α (Satake et Sasakawa, 1962).

V[1]LSAADKGNV[10]KAAWGKVGGH[20]AAEYGAEALE[30]RMFLSFPTTK[40]TYFPHFDLS H[50]GSAQVKGHGA[60]KVAAALTKAV[70]EHLDDLPGAL[80]SELSDLHAHK[90]LRVDPVN FKL[100]LSHSLLVTLA[110]SHLPSDFTPA[120]VHASLDKFLA[130]NVSTVLTSKY[140]R

Figure 6. *Séquence en acides aminés de la chaîne α de l'hémoglobine bovine.*

La structure secondaire de la chaîne α est formée de 8 hélices α : H1 à H8, reliées par des coudes (Figure 7).

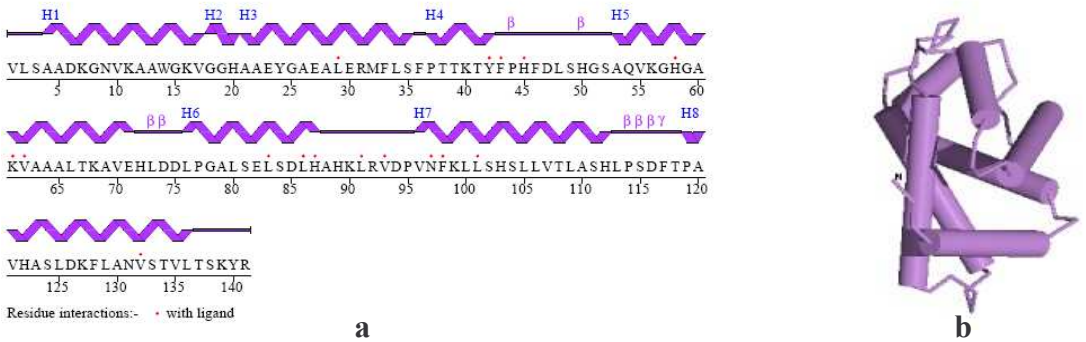


Figure 7. *Structure spatiale de la chaîne α : **a** Représentation schématique des hélices et **b** Représentation spatiale des différentes hélices.*

♦ La chaîne β

La chaîne β de 15 954 Da possède 146 acides aminés (Schroeder *et al.*, 1967). Sa séquence linéaire est représentée dans la figure 8 :

M[1]LTAEEKAAV[10]TAFWGKVKVD[20]EVGGEALGRL[30]LVVYPWTQRF[40]FESFGDLST A[50]DAVMNNPKVK[60]AHGKKVLDSP[70]SNGMKGLDDL[80]KGTFAALSEL[90]HCDKLHV DPE[100]NFKLLGNVLV[110]VVLARNFGKF[120]FTPVLQADFQ[130]KVVAGVANAL[140]AHRY H

Figure 8. *Séquence en acides aminés de la chaîne β de l'hémoglobine bovine.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

La chaîne β est également formée de plusieurs hélices α : 11 hélices réparties de H1 à H11, reliées par des coudes (Figure 9).

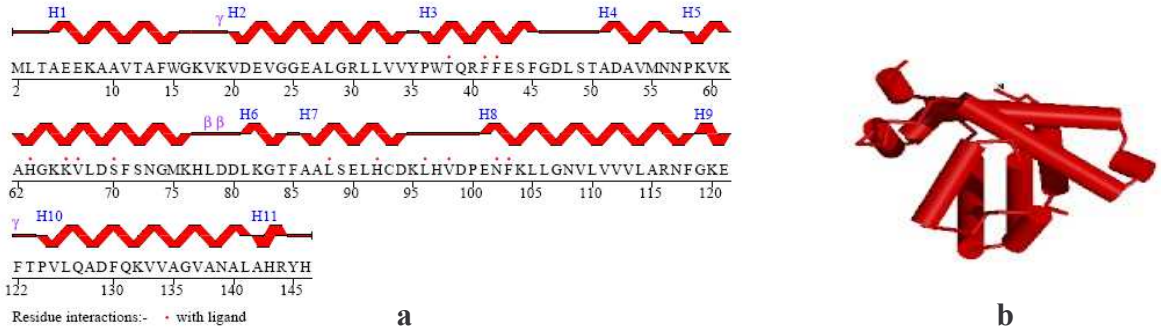


Figure 9. *Structure spatiale de la chaîne β : **a** Représentation schématique des hélices et **b** Représentation spatiale des différentes hélices.*

IV.2.1.2. Structure de l'hème

L'hème est constitué d'une protoporphyrine ayant en son centre un atome de fer (Fe2+). La protoporphyrine est formée de quatre cycles pyrroliques unis par l'intermédiaire de ponts méthénylés (-CH=) et substitués par des groupes méthyl, propionate et vinyl dont la disposition est caractéristique du type IX (Figure 10).

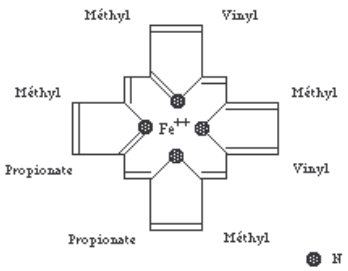


Figure 10. *Structure de l'hème.*

Que la molécule d'hémoglobine soit oxygénée (oxyhémoglobine) ou désoxygénée (désoxyhémoglobine), le fer reste sous la forme Fe^{2+}.

Dans l'oxyhémoglobine, l'atome de fer présente six liaisons de coordinance : quatre interviennent dans la structure de l'hème, la cinquième permet de fixer l'hème à la globine au niveau des Histidines α 87 et β 91 et la sixième fixe une petite molécule tel que l'oxygène, appelée "ligand". Ce ligand est en rapport avec les Histidines α 58 et β 62.

Dans la désoxyhémoglobine, où aucun ligand n'occupe la face distale de l'hème, le fer est pentacoordonné. Par suite d'une distribution différente des électrons dans les couches

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

périphériques, le volume de cet atome augmente. Ces changements de taille sont à la base même des mécanismes de modification de la configuration de la structure protéique accompagnant la fixation d'oxygène.

IV.2.2. La pepsine de porc

La pepsine A de porc (EC 3.4.23.1) est une endoprotéase appartenant 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.

La pepsine secrétée dans l'estomac des mammifères, est produite par les cellules de la muqueuse gastrique sous la forme d'un précurseur inactif, le pepsinogène. Le pepsinogène est converti à pH acide (pH < 5) de façon autocatalytique en pepsine par le clivage de la liaison peptidique entre la Leucine[59] et l'Isoleucine[60] (Herriott, 1962).

IV.2.2.1. Structure

La pepsine avec une masse moléculaire de 34 600 Da, est constituée de 326 acides aminés (Moravek et Kostka, 1974, Sepulveda *et al.*, 1975) répartis en deux domaines principaux : le domaine Nt (AA^{1}-AA^{176}) et le domaine Ct (AA^{177}-AA^{326}), formant une chaîne peptidique. La pepsine possède également trois ponts disulfures répartis selon Cys^{45}–Cys^{50}, Cys^{206}-Cys^{210}, Cys^{282}-Cys^{249} (Figure 11).

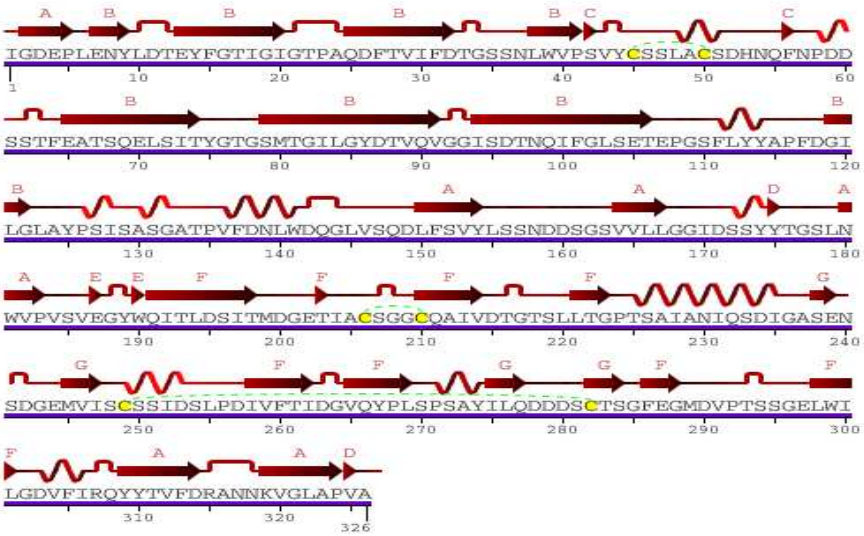


Figure 11. *Séquence en acides aminés et Représentation schématique de la structure secondaire de la pepsine :* = *Feuillet* β = *Coude* = *Hélice* α = *Hélice* 3^{10} = *Hélice* π TCKNGQTNCY = *Pont Disulfure.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

La chaîne peptidique de la pepsine possède une structure secondaire essentiellement formée de feuillet β (Figure 12), ce qui la classe dans la famille des protéines «β» conformément aux protéases à acide aspartique, (Abad-Zapatero *et al.*, 1990, Sielecki *et al.*, 1990). La pepsine possède une faible proportion d'hélices : 4 hélices 3^{10} : Pro^{58}-Asp^{60}, Tyr^{125}-Ile^{128}, Ala^{130}-Gly^{132}, Ser^{172}-Tyr^{174}, Cys^{249}-Leu^{255}, et 3 hélices α : Ser^{110}-Tyr^{114}, Val^{136}-Asp^{142}, Thr^{225}-Ile^{235}, Leu^{48}-Asp^{52}, Pro^{271}-Tyr^{274}, Asp^{303}-Ile^{306}.

Figure 12. *Structure spatiale de la pepsine porcine.*

IV.2.2.2. Mécanisme d'action

La pepsine appartient à la famille des protéases, enzymes spécialisées dans la coupure de la liaison peptidique. Elle appartient à la classe 3.4 selon la classification de la Commission sur les enzymes (EC). Son mécanisme d'action est basé sur la reconnaissance d'un motif structural du substrat à hydrolyser au niveau du site actif de l'enzyme. Schechter et Berger (1967, 1968) ont établi une nomenclature concernant la spécificité des protéases. L'enzyme va cliver la liaison peptidique située entre les résidus (acides aminés) P1 et P1' localisés au niveau des sites d'interaction de l'enzyme nommés S1 et S1'(Figure 13).

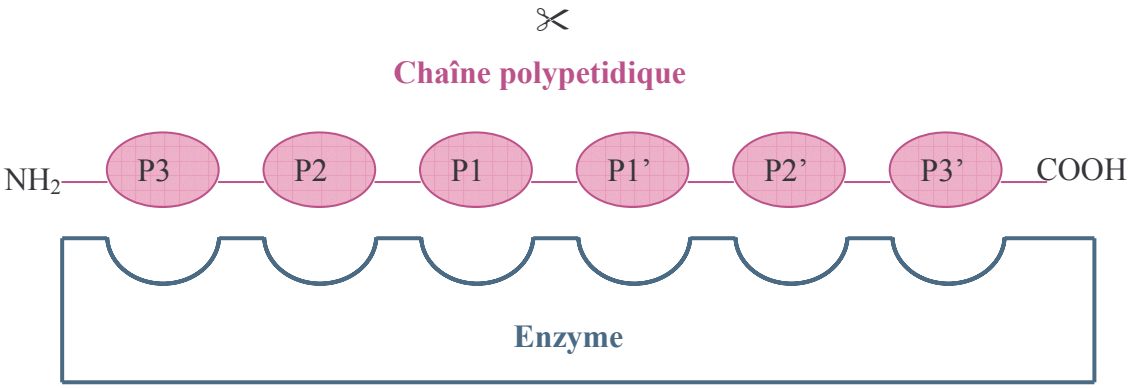


Figure 13. *Nomenclature de Schechter et Berger (1967, 1968).*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

La pepsine est une des protéases fonctionnant avec l'acide aspartique (Asp) dans son site actif. Celui-ci comprend deux résidus acide aspartique proches géométriquement Asp^{32} et Asp^{215}, ainsi que d'autres acides aminés : Ile^{30}, Ser^{39}, Ile^{120}, Ala^{124}, Ile^{213}, Thr^{218}, Ala^{301}, Thr^{305}, formant une crevasse où vient se loger le substrat (Davies, 1990). Lors de la coupure de la liaison peptidique, les deux acides aspartiques jouent simultanément le rôle de donneur et de receveur de protons (Dunn, 2002).

La pepsine coupe préférentiellement en $C_{terminal}$ des acides aminés aromatiques (Phe et Tyr) et hydrophobes (Leu, Ala, Glu, et Gln), en position P1 (Keil, 1992). Certains acides aminés peuvent avoir un effet négatif sur le clivage de la liaison peptidique par la pepsine selon leur position au sein de son site actif : l'Arginine en position P1 et P3, la Lysine et l'Histidine en position P3. La Proline a un effet positif lorsqu'elle se situe en position P3 ou P4, et un effet négatif quand elle est en position P2 ou P'3. La Pepsine ne coupe pas en présence de Pro et Gly en position P1.

IV.2.3. Obtention de peptides antimicrobiens

L'hémoglobine par son hydrolyse, génère des peptides présentant une activité antimicrobienne vis-à-vis de souches bactériennes à Gram-positif et à Gram-négatif. Fogaça *et al.* (1999), ont identifié pour la première fois un peptide antimicrobien actif vis-à-vis des bactéries à Gram-positif à partir de l'intestin du tique *Boophilus microplus*. Ce peptide correspond au fragment 33-61 de la chaîne α de l'hémoglobine bovine.

A partir de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine, plusieurs peptides antimicrobiens ont pu être isolés et identifiés. Le premier peptide antimicrobien identifié (Froidevaux *et al.*, 2001), correspond au fragment α 1-23. Ce peptide est actif vis-à-vis d'une bactérie à Gram-positif, *Micrococcus luteus* A 270. Puis, Daoud *et al.,* (2004) ont isolé et identifié un deuxième peptide antimicrobien correspondant au peptide α 107-136, actif vis-à-vis de souches bactériennes à Gram-positif (*Micrococcus luteus* A270 et *Listeria innocua*) et à Gram-négatif (*Escherichia coli* et *Salmonella enteritidis*). Récemment, quatre nouveaux peptides antimicrobiens ont pu être isolés et caractérisés (Nedjar-Arroume *et al.*, 2006). Il s'agit des peptides α 107-141, α 133-141, α 137-141, et β 126-145. Ils sont également actifs vis-à-vis de ces quatre souches bactériennes.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

IV.3.Obtention des peptides antimicrobiens par hydrolyse chymotrypsique de l'α-Lactalbumine bovine

IV.3.1. L'α-Lactalbumine bovine

L'α-Lactalbumine (α-Lac) est une des protéines majeures du lactosérum (1,2 g/L de lait). C'est une petite protéine de 14,2 kDa pouvant fixer le calcium, et qui est impliquée dans le cycle de biosynthèse du lactose. (Hill *et al.*, 1968, et Yadav et Brew, 1991). Elle protége également la muqueuse gastrique contre l'action d'agents provoquant des ulcères (stress et alcool) lors de son ingestion (Matsumoto *et al.,* 2001). L' α-Lactalbumine est souvent comparée au Lysozyme (EC. 3.2.1.17), par leur homologie de séquence (Brew *et al.*, 1967 et Hill *et al.*, 1968) et par leur structure secondaire similaire (Poverino de Laureto *et al.*, 2002a).

IV.3.1.1. Structure primaire et secondaire

La structure primaire de l'α-Lactalbumine a été établie pour la première fois par Brew *et al.* (1970a et 1970b) : elle est constituée de 123 AA formant une seule chaîne polypeptidique. Puis Shewale *et al.* en 1984, ont apporté quelques corrections à cette séquence. Elle possède 8 cystéines formant 4 ponts disulfures (Vanaman *et al.*, 1970) : Cys^{6}–Cys^{120}, Cys^{28}-Cys^{111}, Cys^{61}-Cys^{77}, et Cys^{73}-Cys^{91} permettant de stabiliser sa structure (Figure 14).

E^{1}QLTKCEVFR^{10}ELKDLKGYGG^{20}VSLPEWVCTT^{30}FHTSGYDTQA^{40}IVQNNDSTE
Y^{50}GLFQINNKIW^{60}CKDDQNPHSS^{70}NICNISCDKF^{80}LDDDLTDDIM^{90}CVKKILDKV
G^{100}INYWLAHKAL^{110}CSEKLDQWLC^{120}EKL^{123}

Figure 14. *Séquence en acides aminés de l'α Lactalbumine bovine*

L'α-Lactalbumine est formée de deux domaines (Figure 15) : un grand domaine en hélice α (Glu^{1}-Ser^{34} et Thr^{86}-Leu^{123}) et un petit domaine en feuillet β (Gly^{35}-Leu^{85}) (Permyakov et Berliner, 2000).

Le domaine α est constitué de 4 hélices α : Lys^{5}-Glu^{11}, Leu^{23}-Ser^{34}, Thr^{86}-Lys^{98}, et Leu^{105}-Leu^{110} et de 4 petites hélices 3^{10} : Lys^{13}-Leu^{15}, Tyr^{18}-Gly^{20}, Ile^{101}-Tyr^{103}, et Leu^{115}-Trp^{118}.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

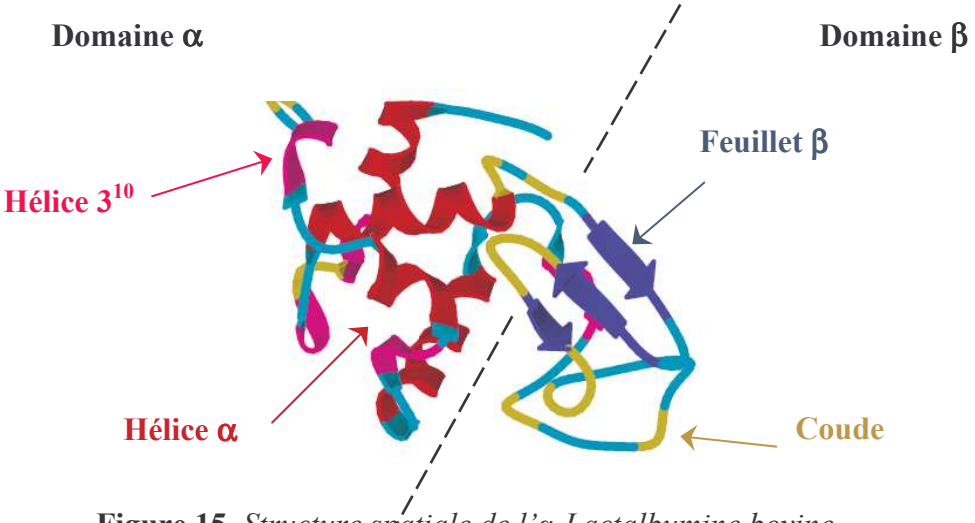


Figure 15. *Structure spatiale de l'α-Lactalbumine bovine.*

Le domaine β est composé quant à lui de 3 feuillets β antiparallèles : Ile^{41}-Asn^{44}, Thr^{47}-Tyr^{50}, et Ile^{55}-Asn^{56}, d'une hélice 3^{10} : Cys^{77}-Phe^{80} et d'une série de boucles et de coudes (Figure 16). La séquence 105-110 correspond à une région flexible de la protéine, elle adopte une structure en hélice α uniquement quand le pH du milieu est compris entre 6,5 et 8.

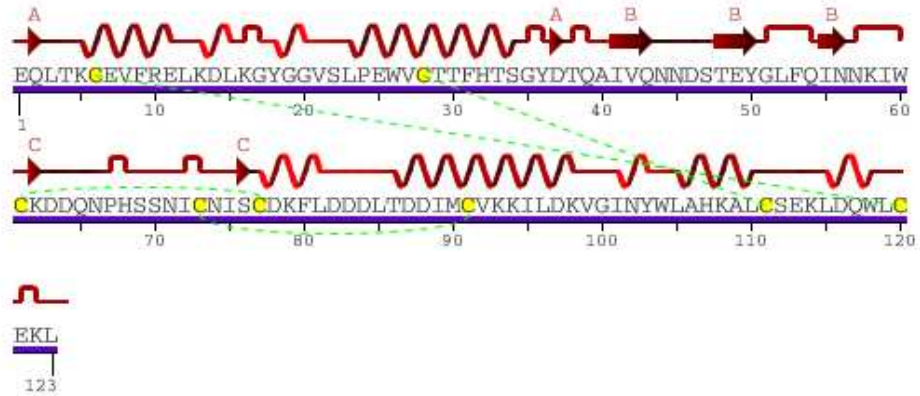


Figure 16. *Représentation schématique de la structure secondaire de l'α-Lactalbumine :* = *Feuillet β* = *Coude* = *Hélice α* = *Hélice 3¹⁰* = *Hélice π* TCKNGQTNCY = *Pont Disulfure.*

IV.3.1.2. Fixation de cations

L' α-Lactalbumine possède la capacité de fixer certains cations. Elle a en autre une grande affinité pour l'ion Ca^{2+}. Le site de fixation se situe à la jonction des deux domaines, d'un côté il est relié à une hélice 3^{10} (Cys^{77}-Phe^{80}) du domaine β et de l'autre à une hélice α (Thr^{86}-Lys^{98}) du domaine α (Chrysina *et al.*, 2000). Il est localisé au sein de la séquence Lys^{79}-Asp^{88}, région riche en acide aspartique. Le calcium interagit dans cette région avec certains AA : Lys^{79}, Asp^{82}, Asp^{84}, Asp^{87} et Asp^{88}, et deux molécules d'eau stabilisant

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

l'ensemble de la structure (Figure 17). Le calcium aide à stabiliser la conformation de l' α-Lac et améliore sa résistance aux traitements thermiques.

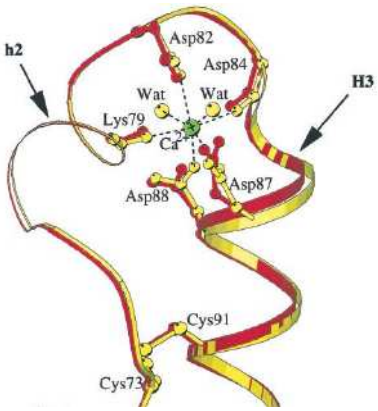


Figure 17. *Site de fixation du calcium sur l'α-Lactalbumine bovine.*

Un deuxième site de fixation du Ca^{2+} existe, situé juste à coté du premier, mais celui-ci est également commun à d'autres cations : Mn^{2+}, Cd^{2+}, Cu^{2+}, Al^{3+}, Na^{+}, et K^{+}.

Elle possède également un site de fixation pour l'ion Zn^{2+} situé du coté $N_{terminal}$ de la protéine comprenant les AA : Glu^{1}, Glu^{7}, Glu^{11}, et Asp^{37}. Les ions Co^{2+} et Mg^{2+} peuvent s'y fixer également. La fixation du Mg^{2+} permet de stabiliser la structure de l'α-Lac à l'inverse du Zn^{2+} qui la déstabilise (Noyelle et Van Dael, 2002).

IV.3.1.3. Interactions avec d'autres molécules

L'α-Lactalbumine est capable d'interagir avec des composés autres que des cations. En effet, elle peut fixer la Melittine (peptide antimicrobien issu du venin d'abeille), mais uniquement quand le calcium ne lui est pas lié (Permyakov *et al.*, 1991). Elle peut interagir également avec certains acides gras : l'acide 5-doxylstéarique, l'acide stéarique, l'acide palmitique (Cawthern *et al.*, 1997) ainsi que l'acide oléique (Svensson *et al.*, 2003).

IV.3.1.4. Conformation de l'α-Lactalbumine

La conformation de l'α-Lactalbumine peut être modifiée selon les caractéristiques du milieu réactionnel.

En conditions natives, elle peut se présenter sous deux formes. La première appelée holoforme, correspond à la protéine liée à l'ion calcium. La deuxième, correspond à la protéine sans calcium, nommée apoforme. L'absence de calcium a tendance à déstabiliser la structure de la protéine (Chrysina *et al.*, 2000).

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Le passage de la forme native à la forme dénaturée dépend d'une part des conditions du milieu réactionnel et d'autre part de la conformation de la protéine. Owusu Apenten (1995) a étudié la dénaturation par la chaleur des deux conformations. A basse température, l'holoforme et l'apoforme ont des structures similaires. Par contre dès que la température augmente, l'apoforme se dénature plus rapidement que l'holoforme. Le Tm (ou température à laquelle 50% de la protéine se trouve sous une forme dénaturée) de l'apoforme se situe autour de 34,5°C tandis que celui de l'holoforme est situé aux alentours de 67,5°C.

Pendant le mécanisme de dénaturation, l'α-Lactalbumine ne passe pas directement d'un état natif à un état dénaturé. Il existe une étape supplémentaire, où la protéine passe par une conformation semi dénaturée appelée « Molten Globule » (MG).

A pH acide (pH < 2), l'α-Lactalbumine se trouve dans une conformation acide appelée « A-State ». Il s'agit d'un état dénaturé de la protéine, qui serait assez proche au niveau structural du « Molten Globule » (Kuwajima, 1996). Ce changement de conformation à pH acide, est dû à une compétition entre le calcium et les protons du milieu (Permyakov *et al.*, 1985).

Le passage de la conformation native de l'α-Lactalbumine à la conformation « molten globule », peut se faire de quatre façons en utilisant : une température élevée, un pH acide (pH < 2), des agents dénaturants « forts » (urée ou guanidine-HCl) à une concentration modérée, ou en enlevant le calcium, à pH neutre, avec une faible force ionique (Kuwajima, 1996).

De nombreuses études ont été réalisées, afin d'établir précisément la structure de ce « molten globule » (Polverino de Laureto *et al.*, 2002b), et de comprendre le mécanisme de dénaturation de l'α-Lactalbumine (Chang et Li, 2001). Le « molten globule » garde la structure secondaire de la forme native, mais il perd une partie de la structure tertiaire de la protéine (Kuwajima, 1996). Le domaine α (fragments 1-39 et 81-123) reste natif, par contre le domaine β (40-80) est déstructuré (Polverino de Laureto *et al.*, 2002b).

IV.3.2. L'α Chymotrypsine bovine

L'α chymotrypsine (EC 3.4.21.1) est une endoprotéase synthétisée dans le pancréas sous la forme d'un précurseur inactif le chymotrypsinogène, qui sous l'action d'enzymes protéolytiques du petit intestin est converti en α chymotrypsine (Figure 18).

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

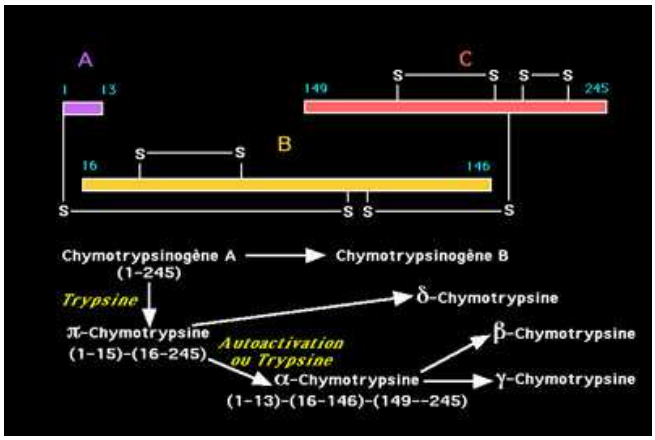


Figure 18. *Formation de l'α Chymotrypsine.*

IV.3.2.1. Structure

L'α chymotrypsine avec 25 230 Da de masse moléculaire, est composée de 241 AA (Figure 19) répartis en trois chaînes polypeptidiques : la chaîne A (Cys^{1}-Leu^{13}), la chaîne B (Ile^{16}-Tyr^{146}) et la chaîne C (Ala^{149}-Asn^{245}). Elle possède deux ponts disulfures inter chaînes, permettant de relier les chaînes entre elles : Cys^{1}–Cys^{122}, Cys^{136}-Cys^{201}, ainsi que trois ponts disulfures intra chaîne : Cys^{42}-Cys^{58}, Cys^{168}-Cys^{182}, Cys^{191}-Cys^{220} (Hartley, 1964, et Brown et Hartley, 1966).

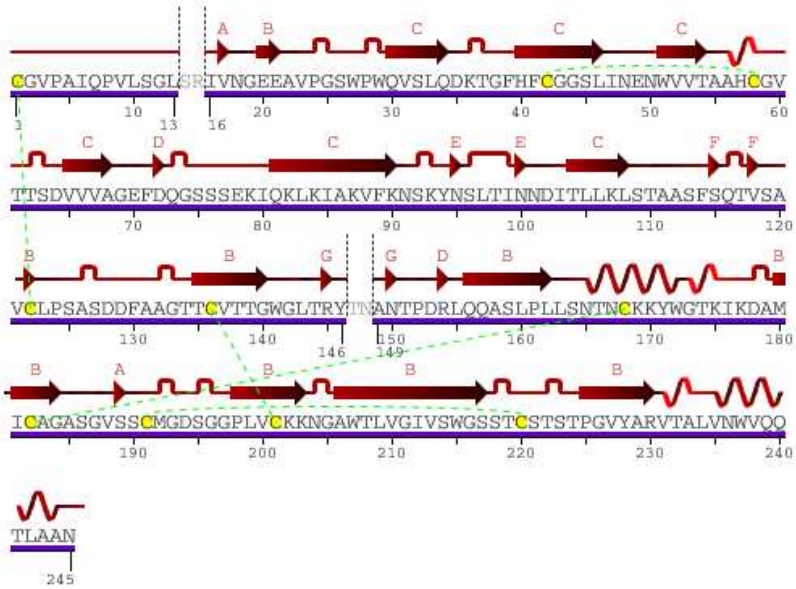


Figure 19. *Séquence en acides aminés et Représentation schématique de la structure secondaire de la pepsine :* = *Feuillet β* = *Coude* = *Hélice α* = *Hélice 3^{10}* = *Hélice π* TCKNGQTNCY = *Pont Disulfure*. *Les résidus en gris correspondent aux acides aminés présents dans la séquence du chymotrypsinogène.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

La chymotrypsine est formée de deux domaines, chacun étant constitué essentiellement d'un tonneau β, formé de 6 brins β anti-parallèles (Blow, 1969). Un très faible pourcentage d'hélices subsiste, deux hélices α : Asn^{165}-Trp^{172} et Val^{235}-Asn^{245}, ainsi que trois hélices 3^{10} : Ala^{56}-Gly^{59}, Val^{231}-Leu^{234}, Gly^{173}-Ile^{176} (Figure 20).

Figure 20. *Structure spatiale de l'alpha chymotrypsine bovine.*

IV.3.2.2. Mécanisme d'action

L'α chymotrypsine appartenant à la famille de protéases à Serine, possède au niveau de son site actif trois acides aminés particuliers : une histidine[57], un acide aspartique[102] ainsi qu'une serine[195] formant la « Triade catalytique ». La coupure de la liaison peptidique se traduit par une attaque nucléophile de la Serine sur la fonction carbonyle, suivie de la formation d'un intermédiaire tétraédrique, puis de la libération de deux peptides.

D'après une étude de Keil en 1987, la chymotrypsine ne clive aucun acides aminés quelque soit sa nature quand une Proline se trouve en position P'1. Elle coupe en priorité en $C_{terminal}$ des acides aminés aromatiques : Phe, Tyr, et Trp, puis Leu, Met et His. Ensuite, elle peut s'attaquer mais plus rarement à Asn > Gln > Arg > Thr > Lys > Cys > Ala > Ile > Ser. La chymotrypsine n'agit pas lorsqu'elle trouve en position P1 : Asp, Glu, Gly, et Pro.

IV.3.3. Obtention de peptides antimicrobiens

Certains peptides issus de l'hydrolyse de l'α-Lactalbumine par la trypsine ou la chymotrypsine présentent une activité antimicrobienne. Pellegrini *et al.,* (1999) ont isolé et identifié 3 peptides antimicrobiens actifs vis-à-vis de souches bactériennes à Gram-positif et à Gram-négatif. L'hydrolyse trypsique a généré deux peptides antimicrobiens nommés LDT1 et LDT2 correspondant respectivement aux fragments α 1–5 et α 17-31/109-114. Le troisième

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

peptide antimicrobien est issu de l'hydrolyse chymotrypsique de l'α-Lactalbumine. Ce peptide nommé LDC correspond à la séquence α 61-68/75-80. Les peptides α 17-31/109-114 et α 61-68/75-80 sont constitués de deux fragments peptidiques reliés par un pont disulfure.

Biziulevičius *et al.,* (2006) ont également montré que l'hydrolyse de l'α-Lactalbumine par voie enzymatique génère des fractions antimicrobiennes. Plusieurs enzymes ont été utilisées : la trypsine, la pepsine, l'α-chymotrypsine, et la pancréatine. L'ensemble des hydrolysats a stimulé la lyse de bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif. Certains hydrolysats ont montré une plus grande activité que d'autres : hydrolysats trypsiques > hydrolysats pepsiques > hydrolysats chymotrypsiques > hydrolysats pancréatiques.

V. Isolement et Caractérisation des peptides antimicrobiens par CLHP et Spectrométrie de masse

V.1 Isolement et purification des peptides antimicrobiens par CLHP

Les hydrolysats enzymatiques de protéines, sont souvent assimilés à 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.

Jusque vers la fin des années soixante, les mélanges peptidiques complexes, produits par hydrolyse enzymatique de protéines, étaient séparés par des techniques telles que la chromatographie d'échange d'ions (Schroeder et Robberson, 1965, et Hill et Delaney, 1967), la chromatographie bi-dimensionnelle sur papier ainsi que par électrophorèse (Bennett, 1967). Mais la faible résolution et le faible rendement de récupération des produits séparés (Böhlen et Kleeman, 1981) ont souvent été un inconvénient majeur.

A la fin des années quatre vingt, l'association de la chromatographie d'exclusion stérique à basse pression et de la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) en phase inverse, a permis à Piot *et al.* (1988 et 1989a) de purifier des peptides à partir d'un hydrolysat pepsique d'hémoglobine bovine. Ces techniques chromatographiques sont alors apparues essentielles 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 al.,* (1989b) ont ensuite substitué la chromatographie d'exclusion stérique à haute pression à la

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

chromatographie de basse pression, permettant un gain de temps pour l'isolement des peptides ainsi qu'une meilleure résolution lors de cette étape de pré-fractionnement.

Depuis les années quatre vingt dix, une majorité des peptides actifs en particulier les peptides antimicrobiens sont purifiés soit par l'association de la chromatographie échangeuse d'ions et de la CLHP (Recio et Visser, 1999, Froidevaux *et al.,* 2001, Liepke *et al.,* 2003, et Wakabayashi *et al.,* 2003), ou soit directement par CLHP (Zucht *et al.,* 1995, Harrison *et al.,* 1999, Liepke *et al.,* 2001, Budnik *et al.,* 2004, et Legros *et al.,* 2004a).

En 1991, Zavitsanos et Goetz ont décrit une méthode CLHP couplée à un détecteur à barrettes de diodes permettant une analyse spectrale en temps réel des peptides au fur et à mesure de leur élution. Même si les spectrophotomètres U.V.-Visible sont capables de générer des spectres de peptides et de protéines, leur application utile est limitée à des échantillons purs. Des systèmes de détection à barrettes de diodes, couplés à un ordinateur, permettent une acquisition instantanée de spectres U.V.-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 éluée 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 permettant 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 al.,* 1991).

Ce couplage de la CLHP en phase inverse à un détecteur à barrettes de diodes a également permis à plusieurs équipes d'étudier plusieurs peptides d'intérêt. En 1996, Zhao *et al.,* ont mesuré les cinétiques d'apparition de quatre hémorphines au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine à pH 2. Choisnard *et al.,* en 2002, ont suivi l'évolution du peptide antimicrobien α 1-23 au cours de la cinétique d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine à pH 4,5.

V.2. Caractérisation des peptides antimicrobiens par spectrométrie de masse

La caractérisation des peptides d'intérêt a commencé avec l'hydrolyse acide (HCl 6M, 110°C, 24H) qui permettait d'obtenir en partie la composition brute en acides aminés (Skreggs *et al.,* 1957). Mais l'utilisation de cette technique entraînait la destruction du

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Tryptophane et de la Cystéine ainsi que la transformation de la Glutamine et de l'Asparagine en Acide Glutamique et Acide Aspartique.

Au cours des années cinquante, Edman met au point une technique permettant l'identification de l'acide aminé en position $N_{terminale}$ (1950, 1956). Cette méthode appelée « dégradation d'Edman », consiste à faire réagir le phénylisothiocyanate (PITC) avec la fonction amine $N_{terminale}$ pour donner un complexe qui, après action d'un acide dans des conditions douces libère une phénylthiohydantoïne et le reste du peptide. Quelques années plus tard, il met au point avec Begg (1967), un séquenceur réalisant plusieurs cycles de dégradation, et permettant l'identification de la séquence en acides aminés d'un peptide. Depuis cette technique a permis d'identifier de nombreux peptides actifs comme les peptides antimicrobiens tels que les peptides MPC-1 et MPC-2 (Selsted *et al.,* 1983), la seminalplasmine (Theil et Scheit, 1983), et le GPND (Selsted et Hawig, 1987).

A partir des années soixante dix, la spectrométrie de masse fait son apparition pour l'étude de molécules biologiques tels que les peptides et les protéines, avec la découverte de l'ionisation par désorption de plasma (PDMS) par Torgerson *et al.* en 1974. Même si une des premières analyses de peptides a été réalisée sur la fortuitine, un peptide de 1359 Da par impact électronique (Barber, 1965). Elle a permis l'analyse de molécules de grande taille, non volatiles, comme certains peptides non dérivés (Macfarlane et Torgerson, 1976) ou comme l'insuline (Hålekausson *et al.*, 1982). Puis au début des années 1980, Barber (1981, et 1983) introduit deux autres techniques : l'ionisation par bombardement d'atomes rapides (FAB) et celle de LSIMS (pour Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry). Différents peptides d'intérêts ont pu ainsi être identifiés (Gibson *et al.,* 1986 et 1991, et Poulter *et al.,* 1988).

A l'époque, l'identification par la spectrométrie de masse de la séquence d'un peptide n'était qu'à ses débuts et ces techniques étaient généralement couplées à la dégradation d'Edman, ce qui a permis de caractériser différents peptides actifs comme la tachyplesine et les bacténécines (Nakamura *et al.,* 1988, et Franck *et al.,* 1990), et un peptide immunomodulateur (Salmon *et al.,* 2001).

Avec la découverte à la fin des années quatre vingt, de deux nouvelles techniques d'ionisation : l'électrospray (ESI) (Fenn *et al.*, 1989) et la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) (Karas *et al.*, 1987, Karas et Hillenkamp, 1988, Tanaka *et al.,* 1988, Karas *et al.*, 1989), la spectrométrie de masse a connu un essor considérable dans le monde de la biologie. Les applications dans ce domaine sont très nombreuses et notamment dans l'étude

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

des protéines. Elle peut en effet intervenir en contrôle qualité pour déterminer la pureté et l'homogénéité d'une protéine, ou être utilisée en protéomique pour identifier les protéines (Gevaert et Vanderkerckhove, 2000). La spectrométrie de masse est devenue une approche quasi incontournable dans l'étude et la caractérisation des biomolécules, notamment pour l'étude structurale des peptides et des protéines, pour la vérification fine d'une séquence, la localisation de certaines modifications post-traductionnelles, les études de changement de conformation et de repliement, la caractérisation de complexes covalents ou non et de leurs zones d'interactions (Mann et Wilm, 1995, et Andersen *et al.,* 1996).

La technique d'ionisation MALDI est une technique assez répandue pouvant être appliquée sur une large gamme de molécules d'intérêts biologiques et permettant de travailler sur une grande gamme de masses (moins de 1 kDa à plusieurs centaines de kDa) avec une bonne précision de mesure de masse, une préparation et une mise en œuvre relativement simples, une grande rapidité d'analyse, ainsi qu'une relative tolérance vis-à-vis des tampons, des sels, et de nombreux tensioactifs. Souvent associée à la dégradation d'Edman, elle permet d'identifier de nombreux peptides actifs, dont notamment les peptides antimicrobiens tels que les pandinines 1 et 2 (Corzo *et al.,* 2001) et les HPAPS (Tang *et al.,* 2002). Aujourd'hui, il est possible d'obtenir avec l'ionisation MALDI directement la séquence en acides aminés d'un peptide par le développement de nouvelles techniques permettant la fragmentation des ions : la première appelée « Post-Source Decay » (PSD) est réalisée sur des spectromètres de masse du type MALDI TOF en mode reflectron. Et la seconde correspond au développement d'un nouveau spectromètre de masse en tandem MALDI TOF TOF. Ces deux techniques ont permis de séquencer des peptides comme un peptide immunomodulateur (Uttenweiler-Joseph *et al.,* 1998), un peptide antimicrobien (Liu *et al.,* 2004), un neuropeptide (Proekt *et al.,* 2005), et des peptides issus du venin de scorpion (Favreau *et al.,* 2006).

L'électrospray permet d'obtenir des ions en phase gazeuse à partir d'ions en solution, à pression atmosphérique. Ce qui permet l'analyse de mélanges complexes directement en solution et de couvrir une gamme de masses assez large, en générant des espèces multichargées provenant des molécules. Avec l'arrivée en continue des échantillons en solution, l'électrospray peut être couplé avec la chromatographie liquide haute performance (LC/MS) ou avec l'électrophorèse capillaire (CZE/MS), permettant une analyse instantanée des hydrolysats issus de la dégradation protéolytique de protéines (Moseley *et al.,* 1991, Matsuo *et al*., 1994, Smith *et al.*, 1993, Nägele *et al.,* 2004, Janini *et al.,* 2004 et Losito *et al.,* 2006). Comme pour l'ionisation MALDI, l'électrospray a été couplé à la dégradation

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

d'Edman afin d'identifier la séquence de peptides actifs (Novak *et al.,* 1994 et Garcia *et al.,* 1993). L'apparition des spectromètres de masse en tandem du type triple quadripôle, a rendu possible la détermination de la séquence en acides aminés de peptides et a permis le développement de l'électrospray. Depuis quelques années, différents peptides et protéines ont pu être identifiés par cette technique : l'apamine, un peptide neurotoxique (Lange *et al.,* 1994), des peptides actifs issus de la fermentation de protéines du lait (Belem *et al.,* 1999) ou par hydrolyse de protéines par des enzymes modifiées présentes dans le fromage (Haileselassie *et al.,* 1999), et des peptides antimicrobiens (Recio et Visser, 1999, Daoud et al., 2005, et Salzet, 2005).

Mais l'utilisation courante de l'électrospray est limitée par la sensibilité (de l'ordre de la picomole) et la résolution des spectromètres de masse conventionnels. De grosses molécules multichargées peuvent être analysées. Mais la complexité des spectres et le besoin d'une plus grande résolution, d'une grande précision de mesure de masse, d'une plus grande sensibilité sont encore des facteurs limitants pour la détermination de séquences de gros biopolymères. Son utilisation nécessite une certaine pureté des échantillons à analyser mais également une certaine quantité de produit, facteur limitant pour certaines analyses. Cette difficulté a conduit à une miniaturisation de la source ESI par diminution du débit, permettant ainsi d'augmenter la sensibilité, d'utiliser moins de produits et d'augmenter la durée de l'analyse. Dans un premier temps un dispositif micro-électrospray permettant de travailler à des débits inférieurs à 1µL/min a été développé par Emmet et Caprioli en 1994. Puis Wilm et Mann introduisent la source Nano-électrospray en 1996.

La technique nano-électrospray présente le double avantage d'accroître la sensibilité de la mesure et de réduire la consommation d'échantillon. La mise en œuvre expérimentale d'un montage nano-électrospray sollicite de nombreuses précautions, cependant la qualité analytique des sources nanoESI en terme de sensibilité et de précision de mesure de masse de protéines, ont permis une grande avancée ces dernières années dans l'analyse protéomique (Körner *et al*., 1996, Shevchenko *et al*., 1996, et Legros *et al.,* 2004a).

La spectrométrie de masse à ionisation électrospray ou MALDI-TOF est aujourd'hui un outil incontournable et indispensable pour l'étude des protéines et des peptides (Cristoni et Bernardi, 2003, et Finehout et Lee, 2004). Ces deux techniques peuvent être aujourd'hui utilisées soit séparément ou soit de façon complémentaire (Destoumieux *et al.*, 1997).

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

MATERIELS ET METHODES

© 2006 Tous droits réservés.

http://www.univ-lille1.fr/bustl

I. L'hémoglobine bovine

I.1. Dosage de l'hémoglobine

15 g d'hémoglobine (Sigma, réf. H2625) sont dissous dans 100 mL d'eau. Cette solution est mise à centrifuger 15 minutes à 4000 tours/min afin d'éliminer la partie insoluble. La concentration du surnageant est déterminée par la méthode de Crosby *et al.,* (1954). L'hémoglobine en présence de cyanures et de ferricyanures (réactif de Drabkin) est transformée en cyanméthémoglobine stable qui présente un maximum d'absorption à 546 nm.

Aux 50 µL de la solution d'hémoglobine sont ajoutés 12,5 mL de réactif de Drabkin (phosphate monopotassique 1 mM, cyanure de potassium 0,75 mM, ferricyanure de potassium 0,6 mM en solution aqueuse). Après 10 minutes de réaction à température ambiante, l'absorbance de l'échantillon est lue à 546 nm contre le réactif de Drabkin.

En sachant qu'une solution standard d'hémoglobine à 14,7% (p/v) donne une absorbance de 0,4 par cette méthode, la concentration Y de la solution à doser en % (p/v), peut être déterminée selon :

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

I.2. Dénaturation de l'hémoglobine par l'urée

I.2.1. Solution d'hémoglobine à 2% dénaturée à pH 2

A partir de la solution d'hémoglobine de concentration Y, prendre un volume V contenant 5 g d'hémoglobine, et l'ajouter à une solution de 80 g d'urée dans (80 – V) mL d'eau. Après incubation à 37°C pendant une heure, 50 mL de tampon HCl / KCl à 0,25 M pH 2 sont ajoutés. Le pH est ajusté à 2 avec une solution d'acide chlorhydrique (HCL) concentrée, et le volume de la solution est ajusté à 250 mL avec de l'eau.

I.2.2. Solution d'hémoglobine à 1% dénaturée par l'urée à pH 3,5 ou 4,5 ou 5,5

Un volume V correspondant à 1g d'hémoglobine, est prélevé de la solution concentrée Y d'hémoglobine, puis ajouté dans une solution contenant 32 g d'urée dans (32 – V) mL d'eau. 20 mL de tampon acide acétique / acétate de sodium 0,5 M pH 3,5 (4,5 ou 5,5) sont ajoutés, après incubation à 37°C pendant une heure. A l'aide d'une solution d'acide

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

chlorhydrique concentrée, le pH est ajusté à 3,5 (ou 4,5 ou 5,5). Le volume de l'échantillon est ajusté à 100 mL avec de l'eau distillée.

I.2.3. Solution d'hémoglobine à 1% native à pH 3,5 ou 4,5 ou 5,5

Un volume V correspondant à 1g d'hémoglobine, est prélevé de la solution concentrée Y d'hémoglobine. 20 mL de tampon acide acétique / acétate de sodium 0,5 M pH 3,5 (4,5 ou 5,5) sont ajoutés. A l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique concentrée, le pH est ajusté à 3,5 (ou 4,5 ou 5,5). Le volume de l'échantillon est ajusté à 100 mL avec de l'eau distillée.

I.3. Dosage de l'activité de la pepsine en solution

Le dosage de l'activité enzymatique de la pepsine s'effectue par un dosage spectrophotométrique à 280 nm. Une solution mère de la pepsine est préparée en mélangeant 56 mg de pepsine de porc (Sigma réf. P6887) dans 20 mL de tampon acide acétique / acétate de sodium 0,1 M à pH 3,5 ou 4,5 ou 5,5. Pour doser son activité enzymatique, une dilution de la solution mère de pepsine est effectuée au 200ème dans de l'eau distillée

Les solutions d'hémoglobine 2% dénaturée par l'urée à pH 2 et de la pepsine diluée, sont équilibrées à 37°C. Les essais sont réalisés en ajoutant 5 mL d'hémoglobine à 1 mL de pepsine diluée, après agitation, ce mélange est mis à incuber 10 min exactement à 37°C. La réaction est arrêtée par ajout de 10 mL d'acide trichloroacétique (TCA) 5%. Un témoin est réalisé en mélangeant 10 mL de TCA 5% à 1 mL de pepsine diluée, puis en ajoutant les 5 mL d'hémoglobine.

L'ensemble est ensuite laissé 30 minutes à température ambiante. Les solutions sont centrifugées à 4000 tours/minute pendant 15 minutes, puis le surnageant est filtré sur un filtre en acétate de cellulose de 0,45 µm. L'absorbance des solutions est lue à 280 nm avec le témoin comme référence.

Une unité d'activité enzymatique (U.A.) est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à provoquer une augmentation ΔA d'absorbance à 280 nm de 0,001/min avec un trajet optique de 1 cm. La solution de pepsine concentrée contient donc :

$$\frac{\Delta 280\ nm}{10} \bullet 1000 \bullet 200\ U.A/mL \qquad \text{Soit : } U.A/mL \bullet \frac{Volume\ de\ la\ solution}{Masse\ pesée} = U.A/mg\ de\ pepsine$$

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

I.4. Hydrolyse pepsique de l'hémoglobine en solution

I.4.1. Hydrolyse pepsique de l'hémoglobine en fonction du pH

Le protocole de l'hydrolyse décrit ci-dessous, est identique pour l'hémoglobine native et l'hémoglobine dénaturée.

Les solutions d'hémoglobine (native ou dénaturée) et de pepsine à pH 3,5 ou 4,5 ou 5,5 sont incubées à 23°C. Aux 100 mL d'hémoglobine 1% (p/v), sont ajoutés 2.10^5 U.A. de pepsine correspondant à un rapport de E/S = 1/11 (mole/mole).

Après homogénéisation, ce mélange est incubé à 23°C. Des prélèvements de 2,5 mL sont effectués à des temps réguliers, puis mélangés à 1 mL de solution d'arrêt correspondant au tampon Borax (tétraborate de sodium) 0,32 M à pH 12,3. Le pH des échantillons atteint alors une valeur de 10, permettant ainsi d'inactiver la pepsine. Les échantillons sont congelés afin d'éviter une hydrolyse basique, et pour être ensuite analysés par CLHP en phase inverse.

I.4.2. Hydrolyse pepsique de l'hémoglobine en fonction de la température

Le protocole de l'hydrolyse décrit ci-dessous, est identique pour l'hémoglobine native et l'hémoglobine dénaturée.

Les solutions d'hémoglobine (native ou dénaturée) et de pepsine à pH 4,5 sont incubées à différentes températures : 4°C, 15°C, 23°C, 30°C, et 40°C. Aux 100 mL d'hémoglobine 1% (p/v), sont ajoutés 2.10^5 U.A. de pepsine correspondant à un rapport de E/S = 1/11 (mole/mole).

Après homogénéisation, ce mélange est incubé à une des températures choisies. Des prélèvements de 2,5 mL sont effectués à des temps réguliers, puis mélangés à 1 mL de solution d'arrêt (tampon Borax 0,32 M à pH 12,3). Le pH des échantillons atteint alors une valeur de 10, permettant ainsi d'inactiver la pepsine. Les échantillons sont congelés afin d'éviter une hydrolyse basique, et pour être ensuite analysés par CLHP en phase inverse.

I.5. Extraction des peptides antimicrobiens par des systèmes biphasiques (eau/alcools)

L'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine à 1% (p/v) a été menée en présence d'urée, à pH 4,5 et à 23°C. L'hydrolyse est stoppée à un degré d'hydrolyse faible (≈ 3% correspondant

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

à 2,5 minutes d'hydrolyse), en amenant le pH à 10 avec une solution d'arrêt. Le pH est ramené à 4,5 par addition d'acide chlorhydrique concentré.

Plusieurs alcools ont été testés : Butan-1-ol, Butan-2-ol, Pentan-1-ol, Pentan-2-ol, Hexan-1-ol, Hexan-2-ol, Heptan-1-ol, Octan-1-ol. Les extractions ont été menées en créant pendant 10 minutes une émulsion, et en mélangeant en proportion équivalente l'hydrolysat et le solvant. Après centrifugation, les phases organiques et aqueuses sont séparées puis analysées par CLHP en phase inverse.

II. L'α-Lactalbumine bovine

II.1. Préparation de la solution d'α-Lactalbumine

L'α-Lactalbumine utilisée, est sous deux formes : Apoforme (Sigma L6010 calcium depleted) et Holoforme (Sigma L5385 calcium saturated).

10 mg d' α-Lactalbumine (Apoforme ou Holoforme) sont dissous soit dans 10 mL de tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4 soit dans 10 mL de tampon TRA (triethanolaminehydrochloride) 200 mM + $CaCl_2$ 20 mM, pH 7,8. Après agitation, la solution est filtrée sur un filtre d'acétate de cellulose de 0,22 µm. La concentration de l'α-Lactalbumine est déterminée par la relation de Beer-Lambert :

$$DO = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

DO = Densité optique à 280 nm
ε = Coefficient d'extinction molaire en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$
l = Longueur du trajet optique en cm (soit 1 cm)
C = Concentration de la protéine en $mol^{-1}.L$

L'α-Lactalbumine possède un coefficient d'extinction molaire d'une valeur de 28 544 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$, une masse molaire 14 200 Da, ce qui correspond à un coefficient spécifique de :

$$\varepsilon_{spé} = \varepsilon_{Mol} / MM = 28\,544 / 14\,200 = 2.012\ L.g^{-1}.cm^{-1}$$

Après lecture de la densité optique à 280 nm, la concentration de l'α-Lactalbumine est déterminée par la relation :

$$C = \Delta DO / 2.012$$

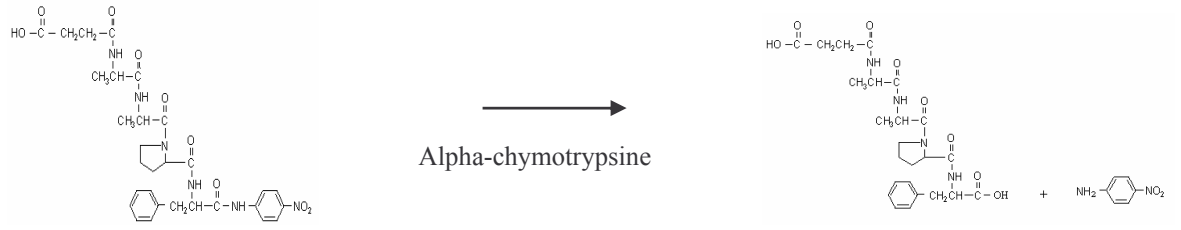
© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Un blanc est réalisé soit sur le tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4 soit sur le tampon TRA 200 mM + $CaCl_2$ 20mM, pH 7,8 selon la solution dans laquelle l'α-Lactalbumine est préparée.

II.2. Dosage de l'activité de l'α chymotrypsine en solution

Le dosage de l'activité de la chymotrypsine est réalisé sur un substrat synthétique : le N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide (Suc-AAPF-pNA Sigma S-7388) (Nakajima *et al.,* 1979). L'activité de la chymotrypsine est déterminée en suivant la variation de densité optique lors de la libération du paranitroanilide dans le milieu réactionnel à une longueur d'onde de 410 nm (Figure 1), directement dans la cuve de lecture d'un spectrophotomètre UV/Vis Perkin-Elmer Lambda 3, pendant 5 minutes, à une température de 37°C régulée par un thermostat HAAKE DC3.

Une solution mère de chymotrypsine est préparée en pesant 10 mg de chymotrypsine bovine (Sigma C-3142 TLCK treated) dans 10 mL d'HCl 0,001 M. Pour doser son activité enzymatique, une dilution de la solution mère de chymotrypsine est effectuée au 10ème dans de l'acide chlorhydrique 0,001 M.



Incolore Coloration jaune

Figure 1. *Réaction de l'alpha chymotrypsine sur Suc-AAPF-pNA.*

Aux 30 µL de substrat Suc-AAPF-pNA 10 mM dans du tampon Tris/HCl 0,1 M pH 7,4 comprenant 0,5 M de NaCl et 9 % de DMSO (dimethylsulfoxide), sont ajoutés 25 µL de chymotrypsine diluée au 1/10ème, ainsi qu'un volume de tampon Tris/HCl 0,1 M pH 7,4 + 0,5 M NaCl, correspondant à un volume final dans le milieu réactionnel de 3mL.

L'activité de la chymotrypsine s'exprime par :

Activité Enzymatique = A.E. = ΔDO / nmole d'enzyme / mL / min

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

II.3. Hydrolyse chymotrypsique de l'α-Lactalbumine en solution

II.3.1. Inhibition de l'activité enzymatique de la chymotrypsine

L'arrêt de la réaction enzymatique est suivi par un changement dans le milieu réactionnel du pH d'hydrolyse par ajout soit de soude (NaOH) 5M, ou soit d'acide trifluoroacétique (TFA) 10%, ou soit d'acide chlorhydrique (HCl) 2 M. La réaction enzymatique est menée sur l'apoforme de l'α-Lactalbumine, avec un rapport E/S de 1/100 (mole/mole) pendant 1H ou 24H. Chaque hydrolysat est ensuite centrifugé à 4000 tours/minute pendant 15 minutes. Les surnageants ainsi que les culots sont analysés par CLHP en phase inverse.

II.3.2. Détermination du rapport enzyme sur substrat

La solution d'α-Lactalbumine (Apoforme, 1 mg/mL) préparée dans du tampon phosphate 100 mM, pH 7,4, est incubée à 37°C. Le volume de chymotrypsine ajouté (1mg/mL dans de l'HCl 0,001 M), est calculé de façon à obtenir différents rapports E/S (mole/mole) : 1/10, 1/20, 1/50, 1/100, 1/250, 1/500, 1/750, et 1/1000. L'hydrolyse est menée sur 1 mL d'α-Lactalbumine pendant 24H. L'arrêt de la réaction se fait par ajout de 46 µL de solution d'arrêt (HCl 2 M). Le pH des échantillons atteint alors une valeur de 3, permettant ainsi d'inactiver la chymotrypsine. Les échantillons sont congelés, puis analysés par CLHP en phase inverse.

II.3.3. Hydrolyse chymotrypsique de l'α-Lactalbumine dans le tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4

Le protocole d'hydrolyse est le même pour l'apoforme et l'holoforme de l'α-Lactalbumine. La solution d'α-Lactalbumine (1mg/mL) préparée dans du tampon phosphate 100 mM, pH 7,4, est incubée à 25°C ou à 37°C. Aux 20 mL d'α-Lactalbumine, est ajouté un volume de chymotrypsine (1mg/mL dans de l'acide chlorhydrique 0,001 M) correspondant à un rapport E/S = 1/100 (mole/mole). Des prélèvements de 1 mL sont effectués à des temps réguliers, puis mélangés à 46 µL de solution d'arrêt (HCl 2 M). Le pH des échantillons atteint alors une valeur de 3, permettant ainsi d'inactiver la chymotrypsine. Les échantillons sont congelés, puis analysés par CLHP en phase inverse.

II.3.4. Hydrolyse chymotrypsique de l'α-Lactalbumine dans le tampon TRA 200 mM + $CaCl_2$ 20mM, pH 7,8

La solution d'α-Lactalbumine, apoforme uniquement (1mg/mL), préparée dans du tampon TRA 200 mM + $CaCl_2$ 20mM, pH 7,8, est incubée à 37°C. Aux 20 mL d'α-

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Lactalbumine, est ajouté un volume de chymotrypsine (1mg/mL dans de l'acide chlorhydrique 0,001 M) correspondant à un rapport E/S = 1/100 (mole/mole). Des prélèvements de 1 mL sont effectués à des temps réguliers, puis mélangés à 46 µL de solution d'arrêt (HCl 2 M). Le pH des échantillons atteint alors une valeur de 3, permettant ainsi d'inactiver la chymotrypsine. Les échantillons sont congelés, puis analysés par CLHP en phase inverse.

II.4. Réduction des ponts disulfures des peptides issus de l'hydrolyse chymotrypsique de l'α-Lactalbumine

Certains peptides présents dans les hydrolysats d'α-Lactalbumine possèdent dans leur structure un ou plusieurs ponts disulfures. Ceux-ci empêchent une identification précise de la séquence en acides aminés de ces peptides. Un protocole de réduction des peptides a été mis en place, avec comme référence celui établi par Legros *et al.* en 2004b. 500 µL de peptides présentant une suspicion de structure avec ponts disulfures, ont été évaporés à sec, après avoir été récoltés par CLHP. 200µL de tampon ammonium bicarbonate 25 mM contenant 5 mM de dithiotreitol (DTT), ont ensuite été ajoutés avec les peptides, puis placés 30 minutes à 55°C. Les peptides ont de nouveau été évaporés à sec pour les concentrer au maximum, et faciliter leur analyse par spectrométrie de masse.

III. Détermination du degré d'hydrolyse par la méthode de l'acide trinitrobenzène sulfonique (T.N.B.S.).

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

La réaction de l'acide trinitrobenzène sulfonique (T.N.B.S.) sur une amine primaire entraîne la formation d'un chromophore avec l'amine primaire des acides aminés (Adler-Nissen, 1979). Dans une solution peptidique, la concentration en peptide est proportionnelle au nombre de fonctions amines primaires des extrémités $N_{terminales}$ et des chaînes latérales de Lysine (Figure 2).

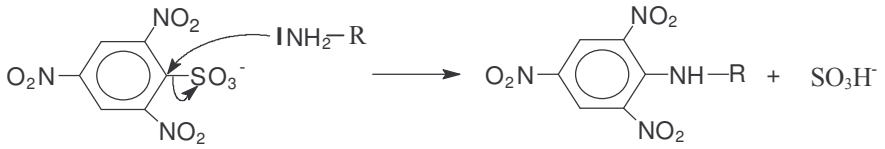


Figure 2. *Réaction du T.N.B.S. avec les groupements amine.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Une solution d'acide trinitrobenzène sulfonique (T.N.B.S., Sigma réf. P-2297) à 0,033% (v/v) dans l'eau est préparée juste avant le dosage. Le dosage est réalisé en ajoutant 2 ml de T.N.B.S. 0,033% à une solution constituée de 250 µl de l'échantillon peptidique à doser et de 2 mL de tampon phosphate 0,2125 M à pH 8,2. Après homogénéisation, le milieu réactionnel est incubé 60 minutes à 50°C et à l'obscurité. L'arrêt de la réaction se fait par ajout de 4 mL de solution d'HCl 0,1 M. L'absorbance de l'essai est lue à 340 nm contre le blanc. Chaque essai est réalisé en triple exemplaire. Une gamme étalon de Leucine est réalisée afin de vérifier la linéarité de la courbe (Figure 3).

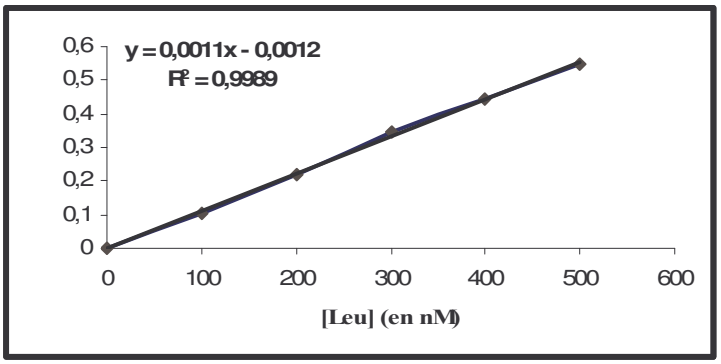


Figure 3. *Gamme étalon du dosage T.N.B.S. avec la Leucine. Chaque mesure est réalisée en triple exemplaire.*

Le degré d'hydrolyse (DH) exprimé en %, se traduit par l'équation :

$$DH = \frac{\textit{Nombre de nmoles de Leucine} \times \textit{dilution}}{\textit{Masse d'hémoglobine} \times 0{,}00025 \times (568/64500)}$$

Le nombre de Leucine (10^{-9} moles) est déterminé à partir de 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.

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, tenant compte de la proportion des chaînes ayant effectivement été hydrolysées. Il est défini par la relation :

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

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

La surface des pics contenant les chaînes α et β est considérée comme représentative de leur concentration et a été relevée au cours du temps sur les chromatogrammes en CLHP de phase inverse.

IV. Méthode d'analyses des peptides

L'ensemble des peptides issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine ou de l'hydrolyse chymotrypsique de l'α-Lactalbumine a été analysé par chromatographie liquide haute performance en phase inverse et par spectrométrie de masse.

IV.1. Analyse des peptides par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse

Cette chromatographie est basée sur la différence d'affinité des molécules à séparer vis-à-vis de la phase stationnaire hydrophobe et de la phase mobile plus ou moins hydrophile. La phase stationnaire est constituée d'un support de particules de silice de 5 ou 10 µm de diamètre très poreux, (le diamètre des pores est compris entre 60 et 100 Å), et d'un revêtement greffé de chaînes aliphatiques de 4 (C_4), ou 8 (C_8), ou 18 (C_{18}) atomes de carbone responsables de l'hydrophobicité.

L'appareillage de la CLHP analytique est constitué (Figure 4) :

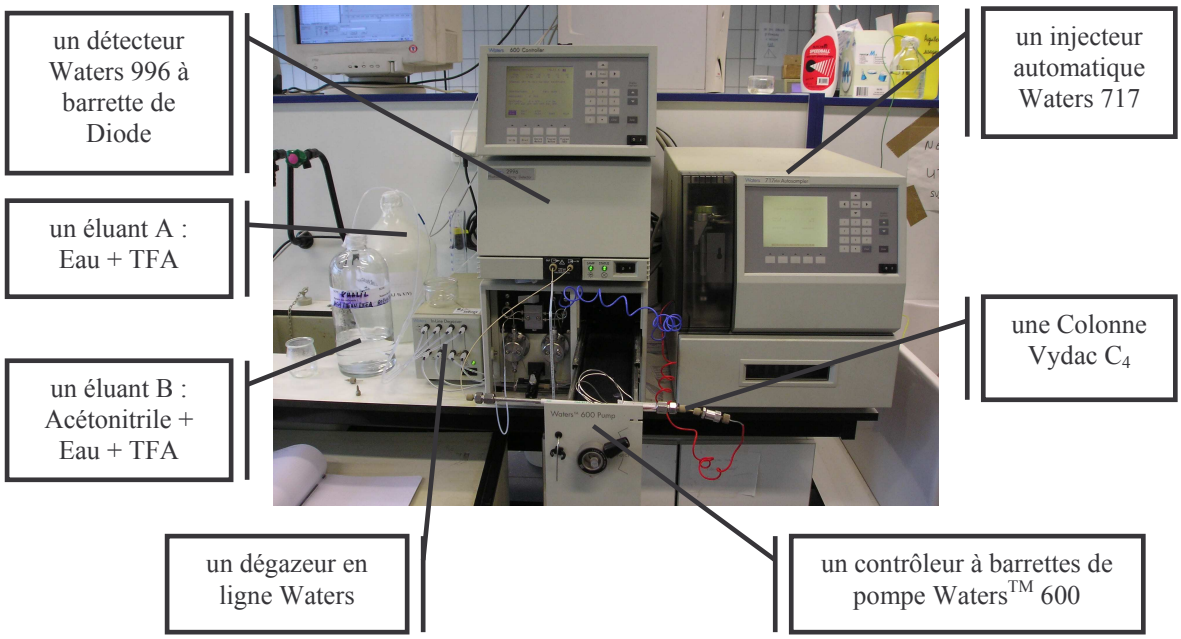


Figure 4. *Photo d'une chaîne CLHP analytique.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Le détecteur est réglé à une longueur d'onde de 226 nm. La colonne C_4 est recommandée pour l'analyse des peptides (de plus de 20 à 30 acides aminés), et pour la plupart des protéines. Deux colonnes C_4 ont été utilisées : une de 0,46×25cm réglée à un débit de 1 mL/min pour l'étude des hydrolysats d'hémoglobine bovine, et une de 0,32×25cm réglée à un débit de 0,6 mL/min pour l'étude des hydrolysats d'α-Lactalbumine bovine.

Avant l'injection, les échantillons sont filtrés sur un filtre d'acétate de cellulose de 0,22 µm. Le contenu de chacun des pics obtenus par CLHP en phase inverse a été caractérisé par spectrométrie de masse afin d'évaluer leur pureté, de déterminer la masse du ou des peptide(s) présent(s) dans chacun des hydrolysats ainsi que leur séquence en acides aminés.

Selon la protéine, hémoglobine ou α-Lactalbumine, les solvants utilisés sont différents ainsi que les gradients appliqués. Pour l'hémoglobine, l'éluant A est composé d'eau milliQ et d'acide trifluoroacétique (TFA) en proportion 100/1 (v/v) et l'éluant B , d'acétonitrile, d'eau milliQ et de TFA en proportion 60/40/1 (v/v/v). Pour éluer les peptides issus de son hydrolyse pepsique, un gradient est appliqué : passage de 0% à 67% de B en 30 minutes, et ensuite passage de 67% à 87% de B en 35 minutes. Concernant l'α-Lactalbumine, l'éluant A est composé d'eau milliQ et d'acide trifluoroacétique (TFA) en proportion 100/0,5 (v/v) et l'éluant B , d'acétonitrile et de TFA en proportion 100/0,5 (v/v). L'élution des peptides se fait en appliquant un gradient : passage de 0 à 100 % de B en 60 minutes.

IV.2. Analyse des peptides par Spectrométrie de Masse

Les spectres de masse ont été réalisés dans le Laboratoire d'Application de Spectrométrie de Masse du Service Commun de Physicochimie de Lille II, avec la précieuse collaboration du Dr Gilbert Briand et du Dr Mostafa Kouach, et dans celui du Centre Commun de mesure de Spectrométrie de masse de Lille I, avec la précieuse collaboration du Dr Guy Ricart, et de Melle Adeline Page.

En règle générale, l'analyse par spectrométrie de masse d'un échantillon est constituée d'une série d'opérations successives : les molécules à analyser sont vaporisées puis ionisées dans la source de l'appareil, obtenant un mélange d'ions. Ces ions sont filtrés selon leur rapport masse/charge par un analyseur, et terminent leur course sur un détecteur. Le spectre de masse est obtenu par le traitement du signal émis par le détecteur.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Un spectromètre de masse est toujours composé de cinq parties :

Une ***chambre d'introduction*** dans laquelle l'introduction de l'échantillon peut se faire directement avec une seringue et un pousse-seringue ou par couplage à la chromatographie liquide haute-performance (CLHP) lorsque la technique utilisée le permet.

Une ***source,*** appelée aussi chambre d'ionisation et de volatilisation, permettant le passage en phase gazeuse (vaporisation/sublimation/désorption) de l'échantillon à analyser, l'ionisation des molécules, mais aussi la décomposition des ions. Plusieurs méthodes d'ionisation existent, le choix de celle-ci étant directement lié à la nature de l'échantillon et au type d'analyses souhaitées.

Les molécules ionisées se retrouvent ensuite dans la troisième partie de l'appareil correspondant à l'***analyseur*** appelé également chambre de séparation. Il permet la séparation des ions en fonction du rapport masse/charge (m/z), par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique.

Les ions séparés par l'analyseur, arrivent au niveau du ***détecteur***, constitué d'un collecteur d'ions et d'un ensemble électronique de mesure et d'amplification des signaux associés aux ions de différentes masses. Les ions viennent heurter un multiplicateur et l'énergie amplifiée est transcrite en un signal électrique, l'intensité du signal étant proportionnelle au nombre d'ions.

La dernière partie de l'appareil correspond à un ***enregistreur,*** permettant l'acquisition des données, qui est faite par un microprocesseur nécessitant une interface. Le rôle de celui-ci est de transcrire sous forme digitale les signaux analogiques. Les données issues de cette conversion sont stockées dans la mémoire de l'ordinateur pour le traitement.

Les sources, analyseurs et détecteurs existants peuvent être associés de manière différente et ainsi créer une grande variété d'appareil. Le choix d'un type de source ou d'un type d'analyseur dépend de la nature de l'échantillon à analyser et du type de donnée souhaitée (sensibilité, résolution, et précision de mesure).

Pour étudier les peptides issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine et de l'hydrolyse chymotrypsique de l'α-Lactalbumine, deux types d'ionisation ont été utilisées : la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF) et l'Electrospray.

IV.2.1. Technique de la désorption laser assistée par matrice : MALDI-TOF

Le Maldi ou désorption/ionisation laser assistée par matrice, est une technique assez répandue permettant de travailler sur une grande gamme de masses (moins de 1 kDa à plusieurs centaines de kDa) avec une bonne précision de mesure de masse, une préparation et

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

une mise en œuvre relativement simples, une grande rapidité d'analyse, ainsi qu'une relative tolérance vis-à-vis des tampons, des sels, et de nombreux tensioactifs.

IV.2.1.1. Principe

La technique MALDI utilise en général un faisceau laser pulsé émettant dans l'ultraviolet (U.V.) ou l'infra-rouge (I.R.) pour désorber et ioniser un mélange matrice/échantillon co-cristallisé sur une surface métallique (appelée cible) (Figure 5).

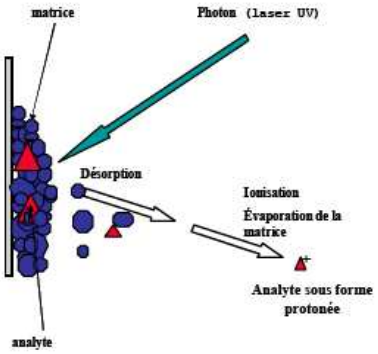


Figure 5. *Principe du MALDI.*

L'énergie est restituée en partie et transférée à l'échantillon qui sera alors volatilisé et ionisé par transfert de protons, soit avant désorption dans la phase solide, soit par collision après désorption avec la matrice excitée ou avec d'autres molécules du plasma pour former des ions mono ou dichargés de type $[M+nH]^{n+}$. Les ions formés sont ensuite accélérés par application d'un champ électrique intense entre la cible et la première lentille électrostatique du spectromètre appelée lentille d'extraction.

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 également détectables.

La source MALDI utilisée, est couplée à un analyseur en temps de vol (TOF pour « Time Of Flight ») en mode réflecteur, bien adapté à l'ionisation pulsée par désorption laser. L'analyseur en temps de vol (TOF) est un tube de vol qui sépare les ions en fonction de leur vitesse lorsqu'ils se déplacent dans un tube de vol. Le mode d'ionisation MALDI génère essentiellement des ions monochargés pour lesquels l'analyseur TOF offre une gamme de masses théoriquement illimitée.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Lors d'une analyse en MALDI, la première étape consiste à co-cristalliser une faible quantité d'échantillons avec une grande quantité de matrice, sur une surface métallique appelée cible, qui est généralement en métal inoxydable (souvent à base d'aluminium), conducteur et traité en surface de manière à être chimiquement inerte par rapport à l'échantillon.

La matrice possède plusieurs fonctions : isoler les molécules de l'échantillon les unes des autres pour éviter la formation de complexes de taille trop importante, minimiser la dégradation de l'échantillon par absorption de l'énergie du faisceau laser incident, améliorer le rendement d'ionisation. L'énergie transmise par le laser est absorbée par matrice, et cet apport d'énergie provoque son expansion en phase gazeuse en entraînant les molécules d'échantillon.

Le choix de la matrice dépend de la nature des molécules à ioniser, et de plusieurs facteurs : elle doit former des cristaux incluant l'analyte ; être soluble dans les solvants utilisés pour les macrobiomolécules ; absorber à la longueur d'onde du laser utilisé. Le solide obtenu par co-cristallisation de la matrice et de l'analyte, doit avoir une durée de vie dans le vide suffisamment longue pour permettre l'enregistrement du spectre.

Le dépôt de l'échantillon sur la cible peut se faire par de nombreuses méthodes décrites en détail par Beavis et Chait (1996) et Kussmann *et al.,* (1997). Le dépôt a été effectué en se servant de la méthode dite en couche mince : une goutte de solution saturée de matrice est déposée sur la cible (Xiang et Beavis, 1994, Vorm *et al.,* 1994). La matrice est solubilisée dans un solvant très volatil, conduisant à la formation d'une couche de cristaux de matrice très homogène appelée « couche mince ». La solution contenant l'échantillon, est déposée sur cette couche mince puis évaporée.

IV.2.1.2. Protocole d'analyse

Les spectres de masse ont été réalisés sur un spectromètre de masse Voyager-DE STR Applied Biosystems de résolution de masse 2000, en mode réflecteur. Le potentiel d'accélération a été fixé à 20 kV. La source de rayonnement est un laser U.V. à azote (λ=337 nm) de pulse 3 ns et l'analyseur est de type temps de vol (Figure 6).

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Figure 6. *Photo d'un MALDI-TOF en mode réflecteur.*

Deux matrices ont été utilisées (absorbant le rayonnement U.V.) : la première 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, et la deuxième correspond à une solution d'acide α–cyano-4-hydroxycinamique préparée à 10 mg/ml dans un mélange 4/1 (v/v) d'eau et d'acétonitrile. 1 µl de matrice et 1 µl de chaque fraction CLHP sont déposés sur les cibles. Les échantillons sont séchés avant d'être analysés.

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 en mode positif. La précision sur la masse est de 0,01%.

IV.2.2. Technique de l'ionisation Electrospray-Ionspray

L'Electrospray-Ionspray se définit par l'application à pression atmosphérique d'un fort champ électrique sur un liquide traversant un tube capillaire dans lequel coule un débit faible (≈ 1 à 10 µL/min). Le champ électrique provoque une accumulation de charge à la surface du liquide, formant un faisceau de gouttes situées à l'extrémité du capillaire, qui vont se briser pour former des gouttelettes de plus en plus petites contenant l'espèce à analyser. Un gaz de nébulisation (mélange de O_2/N_2 20/80) est injecté également au niveau du capillaire, pour aider à la formation du spray.

IV.2.2.1. Principe

L'Ionspray (Figure 7) consiste à injecter de façon coaxiale au capillaire un débit de gaz appelé gaz de nébulisation (Mélange de O_2/N_2 20/80). Ce flux va aider à la formation du spray. Cela implique une désolvatation plus rapide et une possibilité de travailler avec des débits plus importants (1 à 50 µL / min).

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Les gouttelettes chargées et désolvatées, sont ensuite séchées par un flux d'azote chauffé circulant à contre courant, entraînant une série d'éclatement de la goutte et des ions en phase gazeuse sont finalement produits. Le processus de formation des ions désolvatés en phase gazeuse peut être décomposé en trois parties : production de gouttelettes chargées à partir de l'électrolyte en solution, fission des gouttelettes chargées en gouttelettes de tailles plus petites (appelées gouttelettes filles), puis émission des ions désolvatés en phase gazeuse.

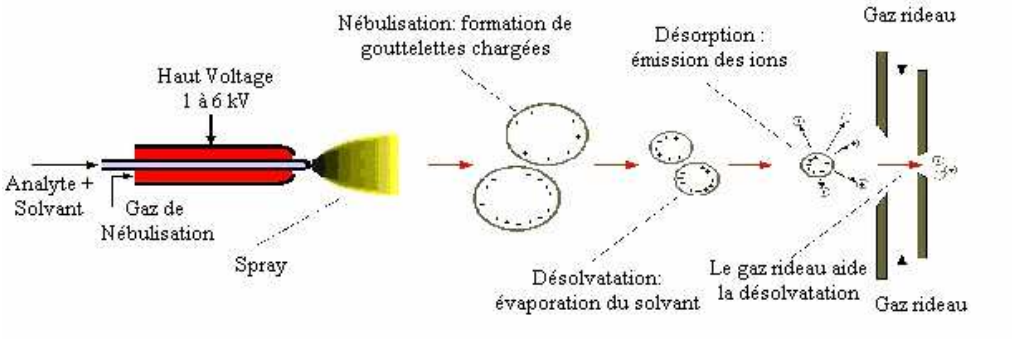


Figure 7. *Schéma du principe de l'Ionspray.*

L'analyseur quadripolaire est constitué de quatre barres métalliques parallèles ayant idéalement une section cylindrique ou hyperbolique, disposées symétriquement autour d'un axe. Ces quatre barres sont associées électriquement deux par deux. A une paire d'électrodes est appliqué un potentiel électrique : tandis qu'un potentiel électrique opposé est appliqué à l'autre paire d'électrodes (Figure 8). L'application simultanée d'une tension continue et d'une radio fréquence impose aux ions qui passent entre les cylindres un chemin oscillant. Pour des valeurs précises de tension et de radio fréquence, seuls les ions avec un rapport m/z donné peuvent atteindre l'extrémité des quadripôles et se diriger vers le détecteur (ions résonants).

Le principe de cet analyseur est d'utiliser la stabilité des trajectoires des ions dans le quadripôle en fonction des tensions qui y sont appliquées pour les séparer selon leur rapport m/z.

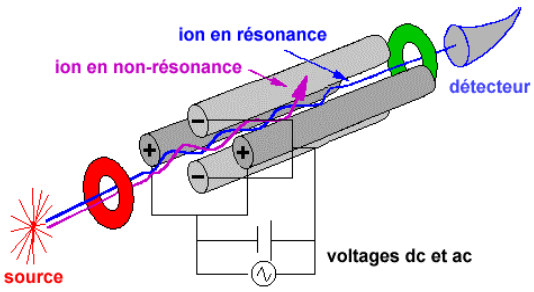


Figure 8. *Schéma d'analyseur quadripolaire.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Un triple quadripôle (Figure 9), comme son nom l'indique, est composé de trois quadripôles appelés Q1, q2, Q3 disposés en série : le premier (Q1) et le troisième (Q3) sont des analyseurs de masse (m/z), alors que le deuxième (q2) constitue une cellule de collision, dans laquelle les ions se brisent par collision (CID) à l'aide d'un gaz inerte comme l'azote N_2 (appelé gaz de collision) et d'une énergie de collision.

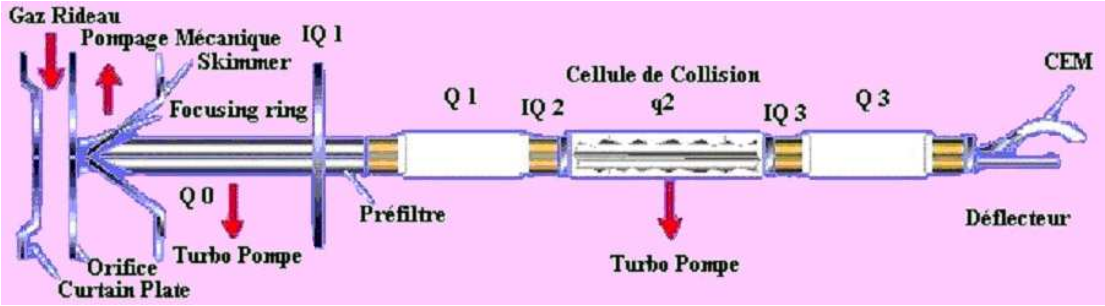


Figure 9. *Schéma en coupe d'un triple quadripôle.*

Un triple quadripôle (ou spectromètre de masse en tandem), permet lors de l'analyse d'un peptide, d'identifier sa séquence en acides aminés : un ion de masse appelé ion parent, correspondant au peptide analysé, est sélectionné dans le premier analyseur Q1. Cet ion parent est ensuite fragmenté dans la cellule de collision q2, permettant l'obtention d'ions fragments analysés dans Q3 (Figure 10).

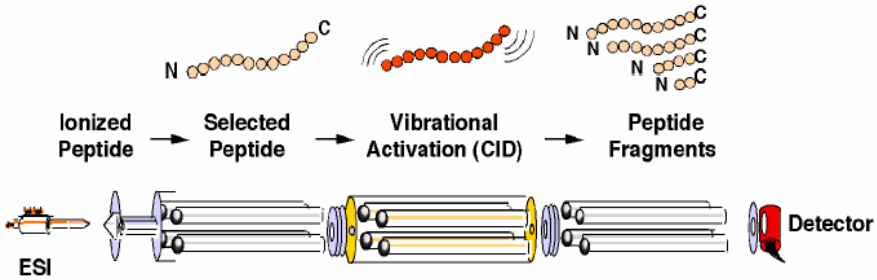


Figure 10. *Principe d'un spectromètre de masse en tandem.*

Les peptides se fragmentent toujours de la même façon, essentiellement au niveau des liaisons peptidiques selon une nomenclature établie par Roepstorff et Fohlman, en 1984, et Biemann, en 1990. Plusieurs types de fragments existent : les fragments N-terminaux et C-terminaux, les fragments internes et les pertes de chaînes latérales.

Les fragments N-terminaux sont obtenus en rompant la liaison peptidique et en conservant la charge de l'ion sur la partie N-terminale du peptide : les fragments primaires obtenus à basse énergie sont de types a, b, c et les fragments secondaires obtenus à haute énergie de type d. Quant aux fragments C-terminaux, ils sont obtenus en rompant la liaison peptidique et en conservant la charge de l'ion sur la partie C-terminale du peptide : les

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

fragments primaires obtenus à basse énergie sont de types x, y, z et les fragments secondaires obtenus à haute énergie de type v et w. Ces fragments sont notés avec un indice qui précise le nombre de résidus portés par l'ion fragment (Figure 11).

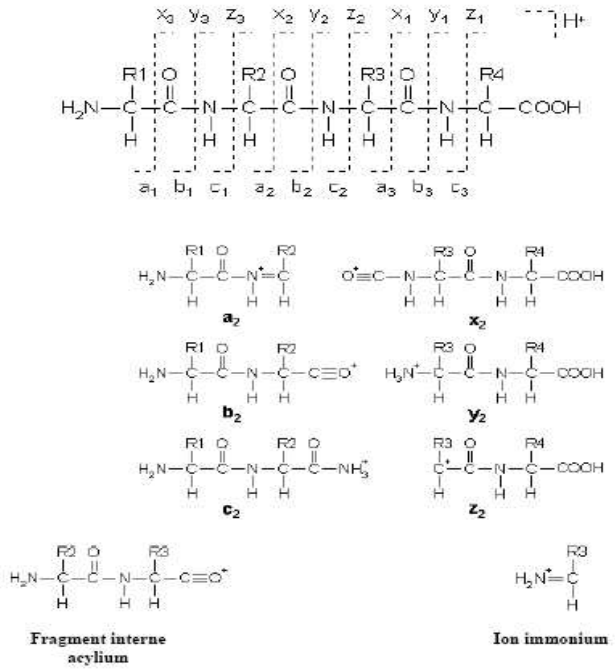


Figure 11. *Schéma théorique de la fragmentation d'un peptide.*

Les spectres de fragmentations peptidiques à basse énergie donnent majoritairement des ions de série y et b. La séquence partielle ou totale du peptide est déterminée par la succession de clivages consécutifs appartenant à une même série (y ou b). Ainsi deux clivages consécutifs induisent la formation d'ions fragments dont la différence de masse équivaut à la masse moléculaire caractéristique d'un acide aminé. Les ions obtenus par fragmentation des chaînes latérales (ions de série d, v, w) apparaissent essentiellement lors des fragmentations à haute énergie. Ils résultent de clivages homolytiques des liaisons carbone-carbone des chaînes latérales ou de mécanismes radicalaires avec réarrangement sur un site éloigné de la charge.

Il existe cependant des ambiguïtés lors de l'interprétation des spectres de fragmentation. Il est par exemple difficile de distinguer : les acides aminés isobares (Leucine et Isoleucine), les acides aminés de masses très proches comme la Lysine et la Glutamine, et certaines combinaisons de résidus de masse égale à celle d'un autre résidu. Les acides aminés isobares ou de masses proches peuvent être discriminés en générant des fragmentations de leurs chaînes latérales (ions de série d) par spectrométrie de masse en tandem à haute énergie.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

IV.2.2.2. Protocole d'analyse

Les spectres de masse ont été réalisés avec un spectromètre de masse triple quadripolaire de type Applied Biosystems modèle API 3000 LC/MS/MS (PE Sciex, Toronto, Canada), et un spectromètre de masse simple quadripôle de type Applied Biosystems modèle API I ESI/MS (PE Sciex, Toronto, Canada).

IV.2.2.2.1. Etude des peptides par couplage LC/MS

Le couplage LC/MS a été réalisé sur un spectromètre de masse simple quadripôle de type Perkin-Elmer Sciex API I (Figure 12). Les spectres de masse ont été réalisés en mode LC/MS, avec une chaîne CLHP du type Applied Biosystems (140B Solvent Delivery System) reliée à un détecteur UV Perkin-Elmer LC 290.

Figure 12. *Photo du spectromètre de masse simple quadripôle de type API I.*

Les analyses ont été effectuées avec deux colonnes C_4 : de 1 et 2,1 mm de diamètre. Le gradient appliqué en couplage LC-MS est identique à celui utilisé lors de l'analyse des peptides par CLHP. Un diviseur de débit appelé « splitter » est utilisé quand le débit en sortie de CLHP est supérieur à celui toléré par le spectromètre de masse. Le Polypropylène glycole ou PPG est utilisé pour la calibration et l'optimisation de l'appareil. L'acquisition des données est faite par le logiciel Tune 2.4.1, et le traitement des données par le logiciel Mac Spec 3.3.

IV.2.2.2.2. Etude des peptides par ESI/MS

L'analyse des peptides par ESI/MS a été effectuée avec un spectromètre de masse de type Electrospray-triple quadripôle (API 3000 LC/MS/MS, PE Sciex, Toronto, Canada) (Figure 13). Le système est piloté par un ordinateur muni du logiciel : Analyst Software 1.4, permettant le contrôle du spectromètre, l'analyse et le traitement des données. Les interprétations des spectres MS-MS ont été faites avec le logiciel Bioanalyst.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Figure 13. *Photo du spectromètre de masse triple quadripolaire de type Applied Biosystems modèle API 3000 LC/MS/MS.*

Les spectres ESI présentent en général un ensemble de pics correspondant aux ions multichargés de type $[M+nH]^{n+}$ où M correspond à la masse moléculaire de la molécule analysée et n correspond au nombre de charges portées par cette molécule ionisée.

Lors de nos analyses, deux types de source ont été utilisés : Electrospray-Ionspray et Nano-Electrospray.

♦ **Etude des peptides avec la source du type Electrospray-Ionspray**

Les spectres de masse ont été réalisés en mode électrospray-ionspray (ESI/MS/MS) avec ionisation positive à pression atmosphérique (Figure 14).

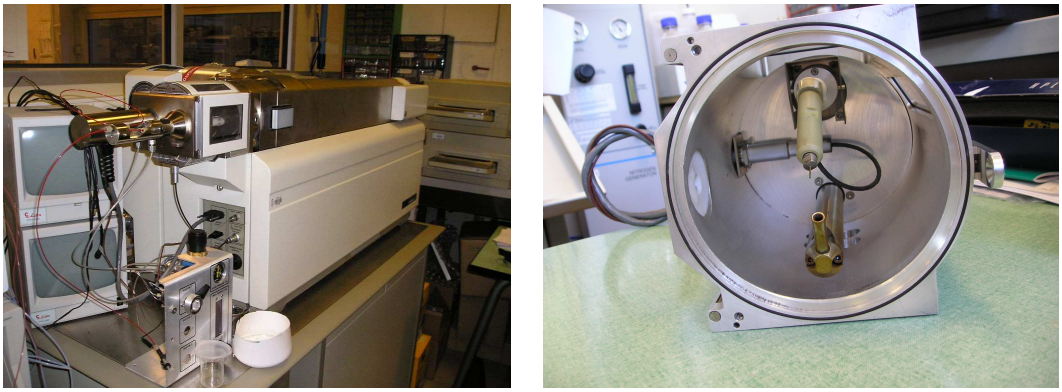


Figure 14. *Photos de la source Electrospray-Ionspray.*

Les échantillons lyophilisés sont dissous dans un solvant acétonitrile/eau (20/80 v/v) contenant de l'acide formique 0,1% pour le mode positif, tandis que les échantillons sous forme liquide sont injectés tel quel. La solution est injectée (nébulisée) en continu, grâce à une pompe (Model 22, Harward Apparatus, South Natick, USA) avec un débit de 5µL/min.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Le potentiel d'ionisation est de 5000 V (volt) en mode positif. Lors de l'enregistrement du spectre, 30 balayages en moyenne sont additionnés (MCA mode) pour chaque spectre.

Les gaz utilisés (azote et air) sont ultras purs (> à 99%) et sont produits par un compresseur Jun-Air 4000-40M et un générateur d'azote Whatman modèle 75-72 (Whatman Inc, Haverhill, MA USA). Le polypropylène glycol (PPG) est utilisé pour la calibration et l'optimisation de la machine.

♦ **Etude des peptides avec la source du type Nano-Electrospray**

Les échantillons analysés avec la source nano-électrospray, ont été au préalable purifiés sur ZipTip C_{18}. Le ZipTip est un embout de pipette de 10 µL possédant un lit de résine C_{18} ou C_4 de 0,6 µL fixé à son extrémité de façon à ce qu'il n'y ait aucun volume mort. Les embouts de pipette Zip Tip sont destinés à la concentration, au dessalage et au fractionnement d'échantillons contenant quelques picomoles de peptides, de protéines et d'oligonucléotides avant analyse.

La purification sur ZipTip se déroule en plusieurs étapes et nécessite la préparation de trois solutions : la solution n°1 ou solution de mouillage est constitué d'un mélange eau milliQ/acétonitrile en proportion 50/50 (v/v), la solution n°2 ou solution de conditionnement constituée d'eau milliQ et de TFA à 0,1%, sert également de solution de rinçage, et la solution n°3 ou solution d'élution contient 80% d'acétonitrile, 20 % d'eau milliQ, et 0,1% de TFA.

Dans une première étape, le ZipTip est humidifié avec la solution n°1, en effectuant plusieurs allers-retours avec une pipette automatique de 10 µL. Le conditionnement se fait de la même façon avec la solution n°2. Après avoir repris les échantillons lyophilisés dans la solution de conditionnement, plusieurs allers-retours sont effectués pour qu'une quantité maximale d'échantillon se fixe sur le ZipTip. Un rinçage est ensuite effectué par plusieurs allers-retours dans la solution n°2, afin d'éliminer une partie des sels. Puis, 6 µL sont prélevés de la solution n°3, afin d'éluer l'échantillon fixé sur le ZipTip. L'élution se fait par plusieurs allers-retours de la quantité prélevée, afin de décrocher les échantillons à analyser.

Pour une analyse en nano-électrospray, l'introduction de l'échantillon se fait à l'aide d'une aiguille en verre recouverte d'Or et de Palladium (Protana) (Figure 15).

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

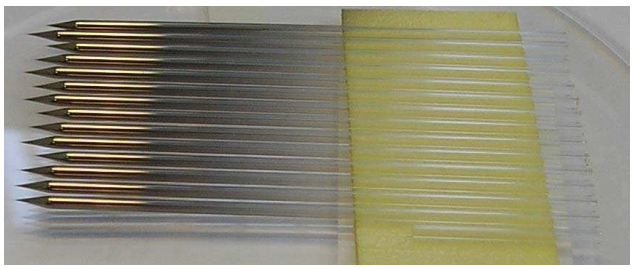


Figure 15. *Photo d'une aiguille pour la nano-électrospray.*

A l'aide d'une pince, une aiguille est détachée de son support, puis coupée à l'aide d'une lime, afin d'enlever une partie de l'aiguille non recouverte de métal. Ensuite 2µL d'échantillons sont prélevés et introduits à l'intérieur de l'aiguille. Celle-ci est ensuite montée sur la source. Avant de commencer l'analyse, on ouvre l'extrémité de l'aiguille par contact avec l'une des parois externes de la source. Deux caméras fixées au niveau de la source, permettent de suivre toutes les manipulations effectuées sur deux écrans vidéo (Figure 16).

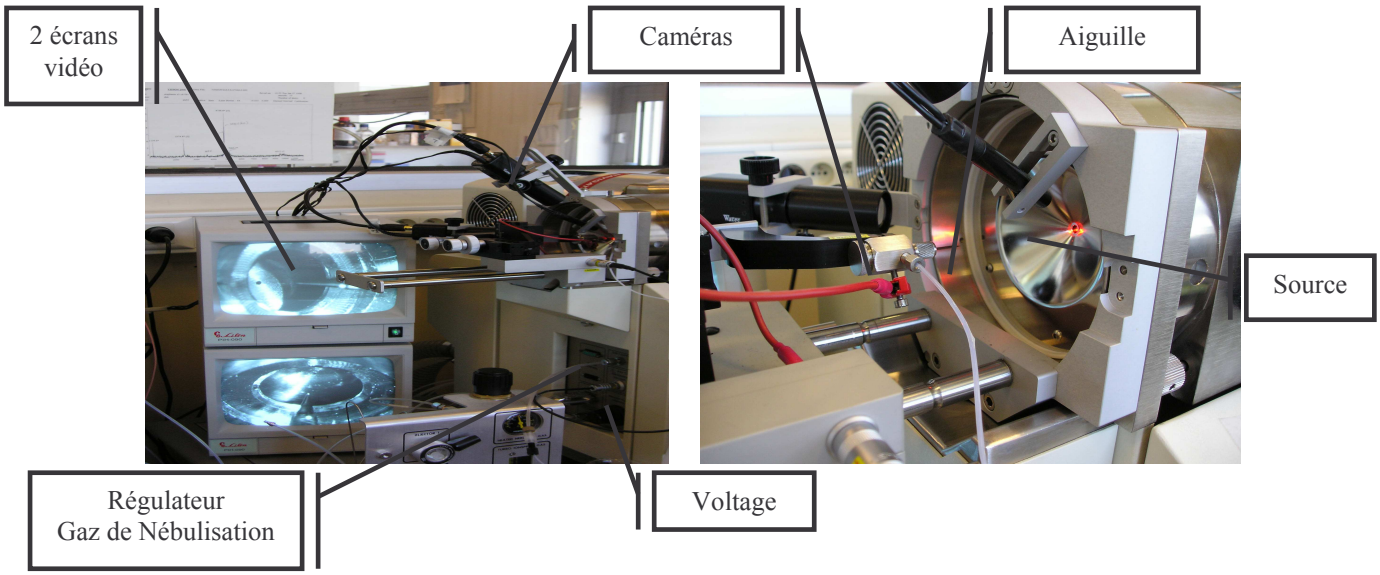


Figure 16. *Photos de la source Nano-Electrospray.*

Le potentiel d'ionisation est de 800 V (volts) en mode positif. L'avancée de l'échantillon se fait en modulant l'arrivée du gaz de nébulisation (dont le débit maximum est de 0,1L/min) au niveau de l'extrémité de l'aiguille. Lors de l'enregistrement du spectre, 10 balayages en moyenne sont additionnés (MCA mode) pour chaque spectre.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

V. L'activité antimicrobienne

V.1 La méthode en double couche (Parish *et al.*, 2001)

La détection des activités antimicrobiennes des hydrolysats et des peptides a été réalisée selon la méthode de Parish *et al.,* (2001) au sein de notre laboratoire, avec l'aide du Dr François Krier, mais également en collaboration avec le Centre d'Etude et de Recherches Technologiques des Industries Alimentaires, INRA de Villeneuve d'Ascq.

Plusieurs souches bactériennes ont été utilisées : 9 souches à Gram-positif : *Micrococcus luteus* A270*, Listeria innocua, Listeria monocytogenes Scott A, Listeria monocytogenes 500, Staphylococcus aureus, Staphylococcus saprophyticus, Staphylococcus simulans, Bacillus cereus, et Enterococcus faecalis,* et 6 souches à Gram-négatif *: Escherichia coli, Shigella sonnei, Salmonella enteritidis, Salmonella arizonae, Salmonella typhimurium, et Yersinia enterocolitica.*

La détection de l'activité antimicrobienne sur milieu gélosé est basée sur la diffusion de l'agent antibactérien au sein de ce milieu ensemencé avec une souche cible.

Le dépôt de l'agent antimicrobien se fait en puits confectionnés à l'aide d'un emporte-pièce. Le diamètre des puits est de 5 mm et le volume de l'échantillon déposé est de 20µL.

Après 18 heures d'incubation à 30°C dans du bouillon nutritif, pour *Micrococcus luteus* A270, et 37°C pour les autres souches, les cultures bactériennes sont centrifugées à 10 000 tours/minutes pendant 5 minutes. Les cellules récupérées sont lavées deux fois dans du tampon phosphate 10 mM à pH 7,5. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et 200 µL de tampon phosphate 10 mM pH 7,5 sont ajoutés au culot de cellules bactériennes. 100 µL sont prélevés après homogénéisation, puis ajoutés à 900 µL de tampon, pour lire l'absorbance des cellules à 660 nm.

Une relation linéaire entre le nombre de cellules par mL obtenu par dénombrement et l'absorbance à 660 nm a été établie au préalable au laboratoire (Tableau I).

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Souches	Nombre d'UFC/mL à 660 nm D.O=1
Enterococcus faecalis	$1,46\times10^8$
Micrococcus luteus A270	$1,76\times10^8$
Salmonella enteretidis LT127	$6,7\times10^8$
Escherichia coli LT102	$2,5\times10^8$
Listeria inocua	$1,8\times10^8$
Staphylococcus aureus	$2,2\times10^8$
Bacillus cereus	$6,8\times10^7$

Tableau I. *Relation entre le nombre d'UFC/mL et l'absorbance à 660 nm selon la souche Bactérienne.*

Le volume de la culture est calculé de façon à avoir une concentration cellulaire de 10^7 UFC / 10 mL de milieu Műller-Hinton une fois concentré (21 g/L) pour *Micrococcus luteus* A270, et 10^7 UFC / 10 mL de tampon phosphate 10 mM pH 7,5 contenant de l'agarose 1 %, du triton X100 0,02 %, et de la sérum albumine bovine 0,02 % pour les autres souches.

Après une brève homogénéisation par vortex, les 10 mL contenant les 10^7 UFC sont coulés rapidement dans une boîte de Petri vide. Après solidification, les puits sont confectionnés et 20 µL de chaque échantillon à tester sont déposés.

Après 3 heures de diffusion à 4°C pour *Micrococcus luteus* A270, la souche est mise à incuber à 30°C. Pour les autres souches, la diffusion s'effectue à 37°C. Puis 10 mL de Műller-Hinton doublement concentré (42 g/L) contenant de l'agar 1%, sont coulés pour former une 2ème couche (Figure 17). L'activité antimicrobienne est détectée par l'apparition de zones d'inhibition de croissance autour des puits après 24 heures d'incubation à 37°C.

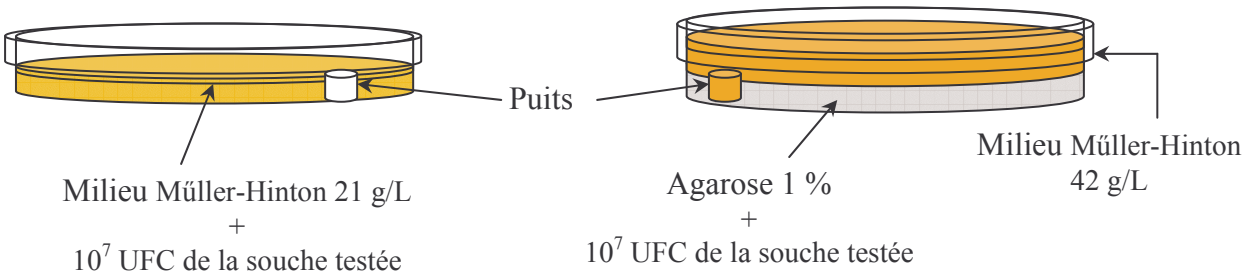


Figure 17. *Schéma représentant la simple et la double couche sur boîte de Petri.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

A chaque essai, un témoin négatif et un témoin positif sont également testés, afin de valider l'activité antimicrobienne des échantillons testés. Le témoin négatif, permettant la croissance des souches bactériennes, correspond au tampon phosphate pH 7,4 utilisé pour resuspendre les échantillons lyophilisés. Quant au témoin positif, un antibiotique, la tétracycline (0,1mg/mL) il permet d'inhiber la croissance des souches bactériennes testées.

V.2. Détermination de la CMI

Le principe général de cette méthode est de mettre en évidence l'activité antimicrobienne d'un peptide vis-à-vis d'une souche cible en milieu liquide.

La croissance ou non de la culture bactérienne en présence d'un peptide est alors comparée à une culture témoin sans peptide. Ainsi, l'absence de croissance de la culture bactérienne en présence du peptide après une durée d'incubation définie (généralement 24 heures) traduit l'activité antimicrobienne de ce peptide. L'utilisation de cette technique permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI).

La CMI correspond à la plus faible concentration de l'agent antimicrobien capable d'inhiber la croissance de la souche testée après un temps d'incubation de 24 heures. La détermination de la CMI se fait sur microplaque stérile (15 minutes sous U.V.) et s'accompagne d'un dénombrement de la population bactérienne des puits présentant une absence de croissance afin de mettre en évidence un effet soit bactériostatique soit bactéricide du peptide testé. L'effet bactériostatique correspond à une inhibition de la croissance cellulaire sans mort des cellules et l'effet bactéricide correspond à une mortalité cellulaire.

Deux puits vont contenir respectivement un témoin négatif correspondant à 100 µL de Műller-Hinton, et un témoin positif contenant 50 µL de Műller-Hinton et 50 µL de la souche. Les autres puits servent à tester l'activité des peptides. La concentration en peptide de départ est fixée à 2mg/mL dans du milieu Műller-Hinton. Pour chaque souche testée, 50 µL de Műller-Hinton et 50 µL de peptides sont déposés dans le premier puits, et des dilutions successives au demi sont ensuite effectuées. Puis, 50 µl de la souche à tester, diluée au 1/500 dans un bouillon de Műller-Hinton sont ajoutés dans tous les puits. La microplaque est incubée à 37 °C pendant 24 heures sous une légère agitation (100 rpm).

La CMI correspond à la concentration en peptide du dernier puits présentant une absence de croissance (Figure 18).

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

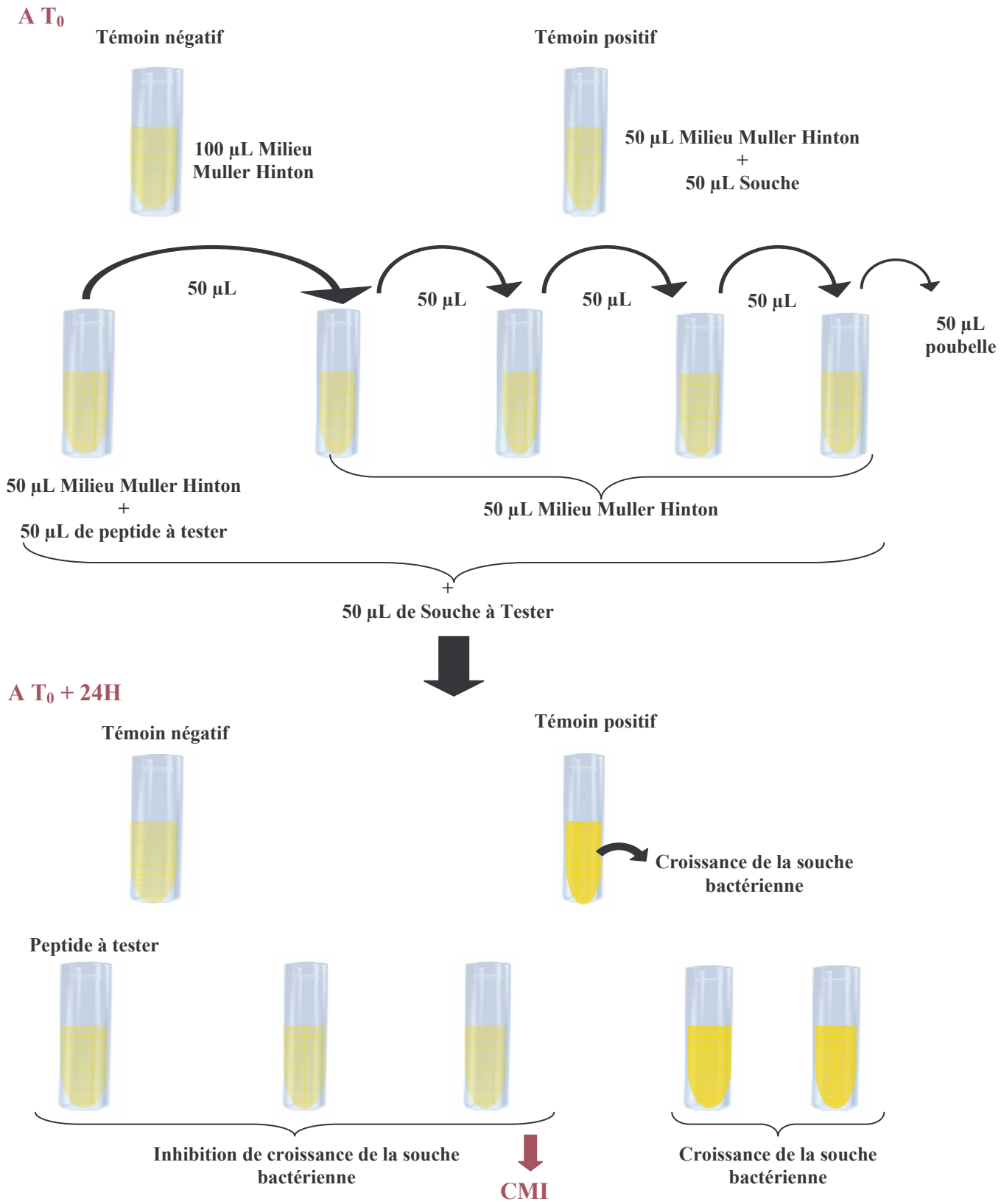


Figure 18. *Schéma du principe de la CMI. La couleur correspond à une inhibition de croissance de la souche bactérienne, et la couleur correspond à une croissance de la souche bactérienne.*

© 2006 Tous droits réservés.

http://www.univ-lille1.fr/bustl

Une fois la CMI déterminée, l'effet bactériostatique ou bactéricide du peptide est recherché par dénombrement des cellules bactériennes dans le tube correspondant à la CMI. Le principe de la méthode du dénombrement sur boîte est le suivant. A T_0, 50 µL du témoin de culture sont mis dans 9,95 mL de Tryptone Sel (Tube 1). Après homogénéisation, 1 ml du tube 1 est prélevé et ajouté à un tube 2 contenant 9 mL de Tryptone Sel. De la même façon, 1 mL du tube 2 est ajouté aux 9 mL du Tryptone Sel (Tube 3). Ainsi, à partir des 50 µL du témoin, les dilutions réalisées dans les tubes 1, 2, et 3 correspondent respectivement à une dilution au 1/200ème, 1/2000ème, et 1/20000ème. De chaque tube, 1 mL est déposé dans trois boîtes de Petri vides dans lesquelles est coulée de la gélose ordinaire. Les boîtes sont ensuite incubées 24 heures à 37 °C afin de déterminer le nombre d'U.F.C. par mL (Figure 19).

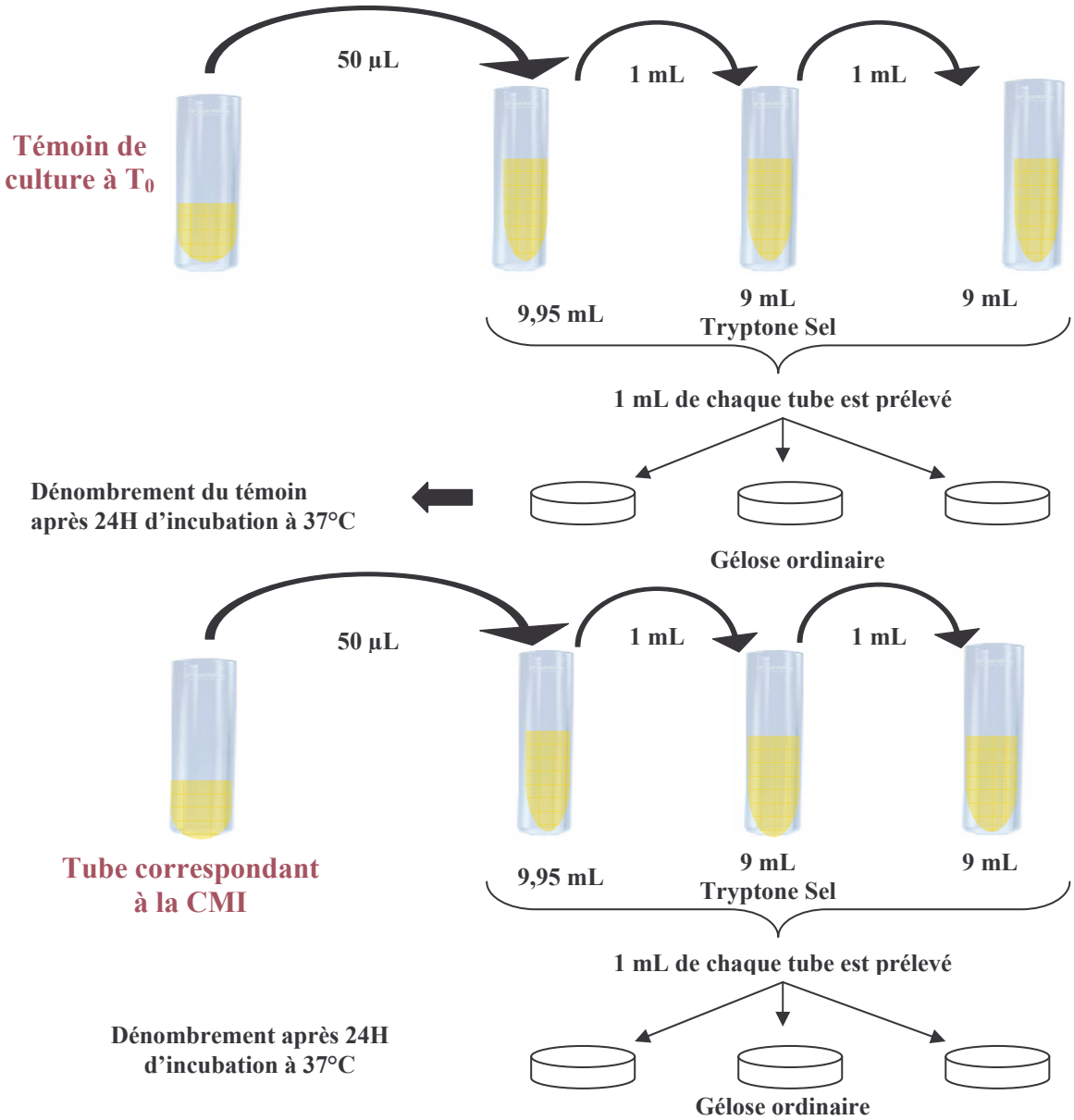


Figure 19. *Schéma du principe du dénombrement des cellules bactériennes.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Après 24 heures d'incubation de la microplaque, un dénombrement sur boîte selon le même protocole est réalisé au sein des puits correspondant à la CMI. Une comparaison entre le nombre d'U.F.C./mL du témoin à T0 et celui des puits présentant une inhibition de croissance des souches bactériennes après 24H, permet de déterminer le pourcentage de mortalité des cellules bactériennes d'après la formule :

$$\% \text{ Mortalité} = \frac{P_{\text{Témoin de culture}} - P_{\text{Tube CMI}}}{P_{\text{Témoin de culture}}} \times 100$$

$P_{\text{Témoin de culture}}$ = Population du témoin de culture
$P_{\text{Tube CMI}}$ = Population du tube correspondant à la CMI
} après 24H d'incubation à 37°C

Il devient alors possible de conclure à un l'effet bactéricide ou bactériostatique des peptides (Figure 20).

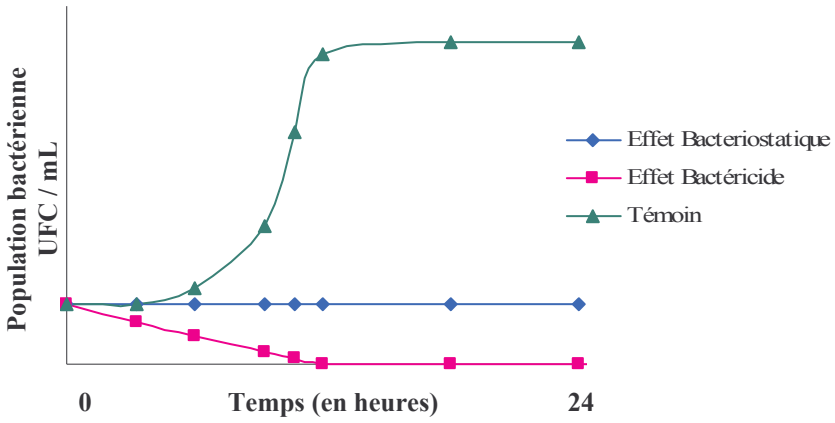


Figure 20. *Représentation de l'effet bactéricide ou bactériostatique sur une population bactérienne.*

VI. L'activité hémolytique

L'activité hémolytique des peptides antimicrobiens a été mise en évidence sur des globules rouges de bœuf, d'après les méthodes de Strub *et al.* (1996) et de Dathe *et al.* (1996). L'hémolyse des globules rouges se traduisant par la libération dans le milieu réactionnel, d'hémoglobine dont la quantité est déterminée par spectrophotométrie à 420 nm.

Après centrifugation 10 minutes à 3500 rpm de 5 mL de sang de bœuf à 1g/L dans l'acide éthylène-diamine-tétracétique (EDTA), le culot contenant les globules et le surnageant contenant le plasma et les globules blancs sont séparés.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Après deux lavages avec du tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7,5 contenant du NaCl (9g/L), les globules rouges (1 mL) sont dénombrés à l'aide d'une cellule de Thomas afin de préparer une solution mère de concentration cellulaire 1×10^9 cellules/mL. Le peptide antimicrobien est préparé dans du tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7,5, et plusieurs concentrations en peptide sont testées, correspondant à des multiples de la CMI.

Aux 12,5 µL de la suspension de globules rouges, est ajouté un volume de peptide correspondant à un multiple de la CMI. Un volume de tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7,5 est ajouté de façon à obtenir un volume final de 50µL.

Après 40 minutes d'incubation à 37°C, et 5 minutes de centrifugation à 5000 rpm, 30 µL de surnageant sont ajoutés à 470 µL d'eau distillée. L'absorbance de cette solution est déterminée à 420 nm. Deux témoins sont également réalisés : un témoin négatif correspondant à 0% d'hémolyse contenant 12,5 µL de globules et 32,5 µL de tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7,5, et un témoin positif soit 100% d'hémolyse contenant en plus 5 µL de SDS à 2%. Le pourcentage d'hémolyse se détermine selon :

$$\% \text{ Hémolyse} = \frac{A_{\text{échantillon}} - T_{0\%} - A_{\text{peptide}}}{T_{100\%} - T_{0\%}} \times 100$$

VII. Détermination du coefficient d'absorption molaire des peptides

Le coefficient d'absorption molaire des peptides a été évalué d'après les coefficients d'absorption molaire des différents acides aminés le constituant et celui de la liaison peptidique (Tableau II). Un peptide contenant au total N acides aminés et comportant Ni acides aminés du type i (AAi) aura pour coefficient d'absorption :

$$\varepsilon_{\text{peptide}} = \sum_{i=1}^{20} N_i \times \varepsilon_{AAi} + (N-1) \times \varepsilon_{\text{liaison peptidique}}$$

Ces coefficients ont été calculés à partir des spectres U.V. des acides aminés solubilisés dans un mélange eau/acétonitrile (90/10) contenant 0,1% de TFA, pH 1,9 (Perrin, 1996).

L'absorption des solutions d'acides aminés est lue à 226 nm. Connaissant la concentration des acides aminés, nous avons pu accéder à la valeur approximative du coefficient d'absorption de chaque peptide. D'après la relation de Beer-Lambert :

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

$$DO = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

$$\varepsilon = DO_{226nm} / (l \times [C_{peptide}])$$

DO = Densité optique à 226 nm

ε = Coefficient d'extinction molaire en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$

l = Longueur du trajet optique en cm (soit 1 cm)

C = Concentration du peptide en $mol^{-1}.L$

Acide Aminé (AA_i)	Coefficient d'absorption molaire εAA_i (en $M^{-1} \times cm^{-1}$) $\lambda = 226$ nm
A	10
R	13
N	46
D	26
C	632,5
E	48
Q	24,5
G	8
H	1512,5
I	10
L	8
K	13
M	82
F	122,5
P	13
S	13
T	13
W	15 000
Y	5 000
V	10
ε Liaison Peptidique	202,5

Tableau II. *Valeurs des Coefficients d'absorption molaire des acides aminés et de la liaison peptidique.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

RESULTATS ET DISCUSSIONS

© 2006 Tous droits réservés.

http://www.univ-lille1.fr/bustl

CHAPITRE I

OBTENTION ET CARACTERISATION DE PEPTIDES ANTIMICROBIENS A PARTIR DE L'HYDROLYSE PEPSIQUE DE L'HEMOGLOBINE BOVINE

© 2006 Tous droits réservés.

http://www.univ-lille1.fr/bustl

I. Obtention et caractérisation de peptides antimicrobiens à partir de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine.

L'hémoglobine a été décrite par Ivanov *et al.,* (1997), comme une source endogène de peptides actifs. L'hydrolyse de ses chaînes α et β, engendre des peptides présentant des activités biologiques diverses tels que : peptide solubilisateur de l'héme (Lebrun *et al.*, 1998), peptide transporteur d'agents photosensibilisants (Cempel *et al.*, 1995), peptides opioïdes (Piot *et al.*, 1992 et Lignot *et al.*, 1999), peptide analgésique (Zhao *et al.*, 1997) et peptide hypotenseur (Dale *et al.*, 2005)….

Des peptides antimicrobiens ont également été isolés de l'hémoglobine, par hydrolyse chimique ou enzymatique. Le premier peptide antimicrobien a été découvert par Fogaça *et al.,* (1999), à partir de l'hémolymphe du tique *Boophilus microplus* (parasite des bovins). Ce peptide actif contre des bactéries à Gram-positif et des champignons, correspond au fragment 33-61 de la chaîne α de l'hémoglobine bovine.

En 2001, Parish *et al.,* ont obtenu après coupure au bromure de cyanogène de l'hémoglobine humaine, quatre fragments issus de la chaîne β présentant des activités antimicrobiennes contre certaines bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif. Après identification, ces fragments correspondaient aux peptides : β 1-55, β 56–146, β 116-146 et β 56–72.

Puis Froidevaux *et al.,* (2001) au sein du laboratoire, ont pour la première fois, isolé et caractérisé à partir d'un hydrolysat pepsique de l'hémoglobine bovine, un peptide antimicrobien, actif vis-à-vis de *Micrococcus luteus*. La séquence en acides aminés de ce peptide correspond au fragment 1-23 de la chaîne α de l'hémoglobine.

L'objectif de cette étude est double : d'une part d'isoler et de caractériser de nouveaux peptides antimicrobiens générés au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine, et d'autre part d'améliorer les méthodes de préparation de ces peptides, afin de rendre plus aisée la caractérisation de leurs propriétés grâce à l'obtention de quantités suffisantes.

I.1. Hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine

L'hémoglobine est une protéine « modèle » au sein du laboratoire, de nombreuses études ont déjà été réalisées, dont notamment l'étude de ses cinétiques d'hydrolyse par la pepsine et de la population peptidique obtenue au cours de la cinétique d'hydrolyse (Lignot, 1998).

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Généralement, les peptides antimicrobiens sont constitués d'un nombre plus ou moins important d'acides aminés, ce qui leur permet d'adopter une structure linéaire en hélice α ou une structure circulaire organisée en feuillets β (Epand et Vogel, 1999).

Afin de trouver les conditions idéales permettant l'obtention de peptides antimicrobiens, une cinétique d'hydrolyse de l'hémoglobine a été menée en conditions dénaturantes (urée 6M), dans du tampon acétate de sodium 0,1M à pH 4,5 et à 23°C, avec un rapport Enzyme/Substrat (E/S) de 1/11 (mole/mole). En conditions dénaturantes, l'hémoglobine est hydrolysée selon un mécanisme du type « zipper » permettant l'obtention de peptides intermédiaires de grande taille.

Linderstrom-Lang (1952), a montré que 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. Un modèle simplifié pour expliquer ces phénomènes fréquemment observés lors de l'hydrolyse de protéines globulaires a été établi :

$$\text{Native} \underset{V_{-0}}{\overset{V_{+0}}{\rightleftharpoons}} \text{Dénaturée} \xrightarrow[V_I]{\text{enzyme}} \text{Intermédiaires} \xrightarrow[V_{II}]{\text{enzyme}} \text{Produits finaux}$$

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 $v_0 \ll v_I$ et v_{II}. 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 (1952). Cela signifie que la protéase dégrade une molécule d'hémoglobine à la fois.

Dans le cas de l'hémoglobine dénaturée, v_I et v_{II} constituent 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.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

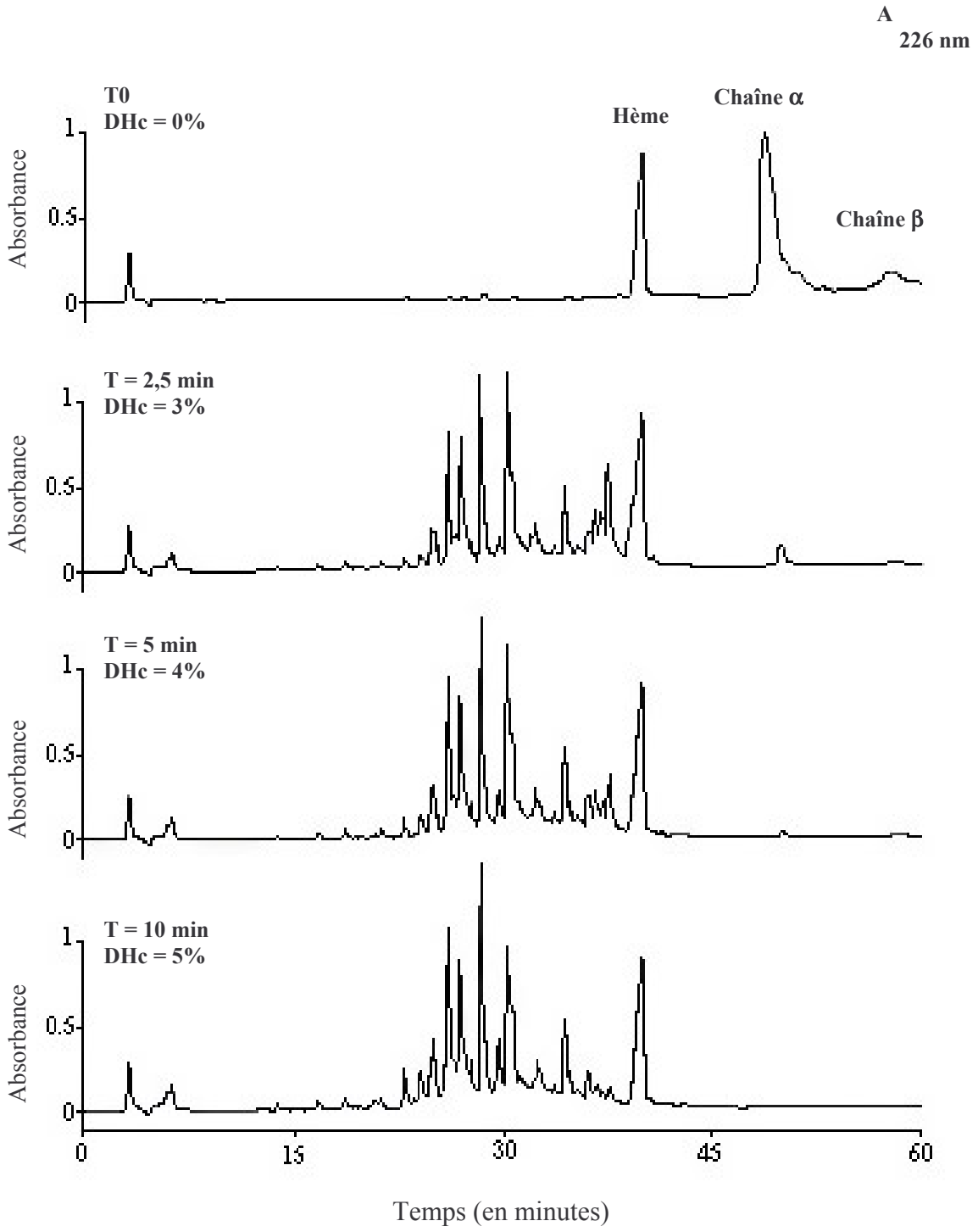
La pepsine hydrolyse donc l'hémoglobine dénaturée selon un mécanisme appelé "zipper" par Linderstrom-Lang (1952), mécanisme qui suppose une conversion rapide de la protéine en des produits de dégradation intermédiaires et consiste en un clivage progressif (par étapes) des intermédiaires formés.

Lors de la cinétique d'hydrolyse de l'hémoglobine 1 % (p/v) par la pepsine en conditions dénaturantes, des prélèvements à des temps réguliers ont été effectués, et la réaction a été stoppée en amenant le pH à 10 avec une solution d'arrêt (Tampon Borax 0,32 M pH 12,3). Chaque prélèvement de la cinétique a ensuite été analysé par CLHP en phase inverse sur une colonne C_4 de 4,6 mm de diamètre.

Le profil chromatographique obtenu par CLHP de la cinétique d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine, représenté au sein de la figure 1, montre que l'hydrolyse se déroule bien selon un mécanisme du type « zipper ». Les chaînes α et β de l'hémoglobine disparaissent dès le début de l'hydrolyse. Les peptides situés à côté de l'hème, sont présents au début de l'hydrolyse, et disparaissent très rapidement. Ce sont des peptides intermédiaires de grande taille. Au fur et à mesure que l'hydrolyse progresse, un décalage de peptides vers le début du chromatogramme est observé. Ces peptides correspondent à des peptides de taille moyenne puis des petits peptides.

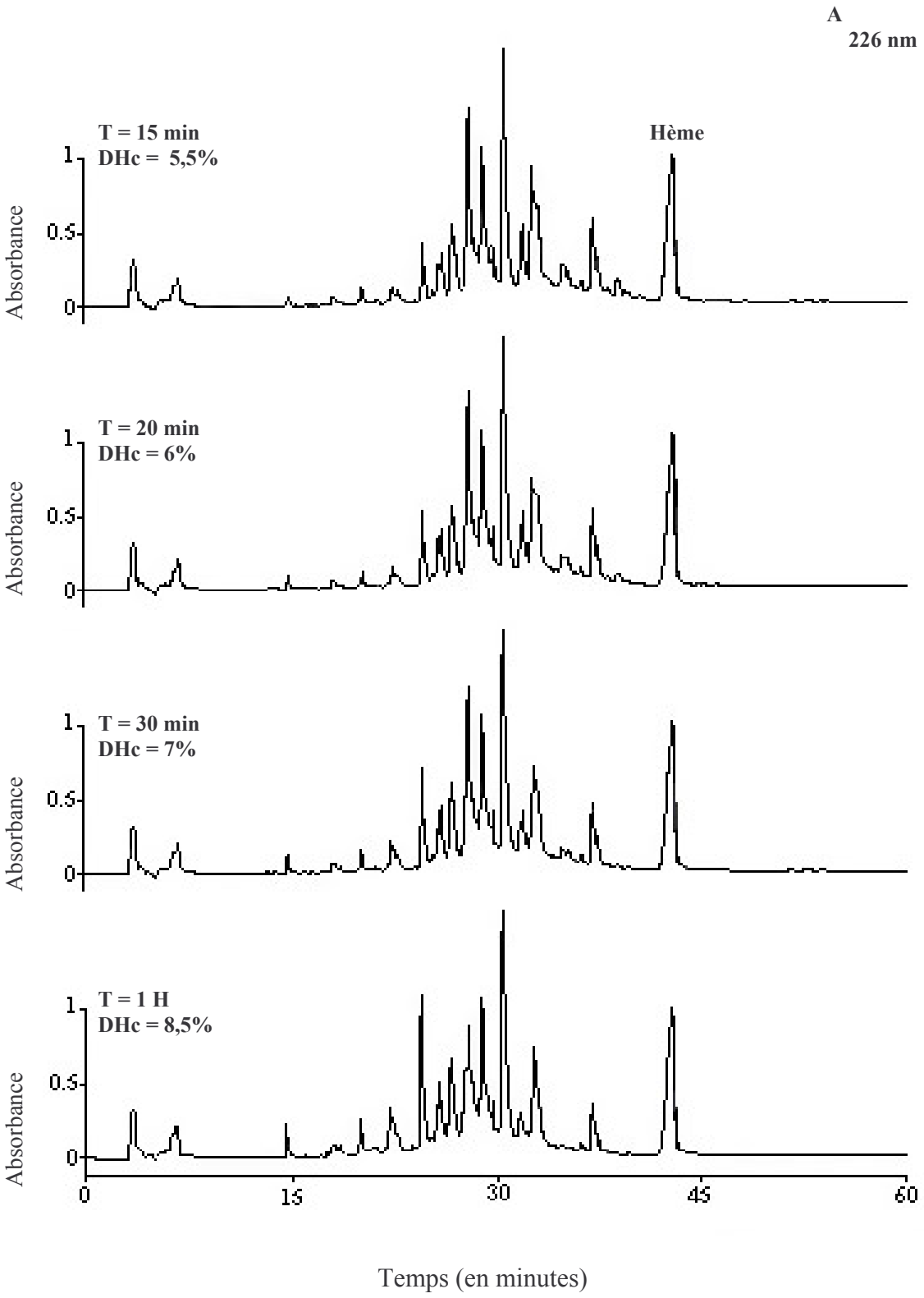
Les peptides antimicrobiens étant généralement des peptides de grande taille (entre 10 et 40 AA) (Toke, 2005), l'hydrolyse de l'hémoglobine a donc été stoppée à un temps très court (2,5 minutes) correspondant à un degré d'hydrolyse faible (DHc ≈ 3%), permettant l'obtention de peptides intermédiaires de grande taille susceptibles de présenter une activité antimicrobienne. La mise en évidence et la caractérisation de nouveaux peptides antimicrobiens a été effectuée sur cet hydrolysat d'hémoglobine bovine de 3% de DHc.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl



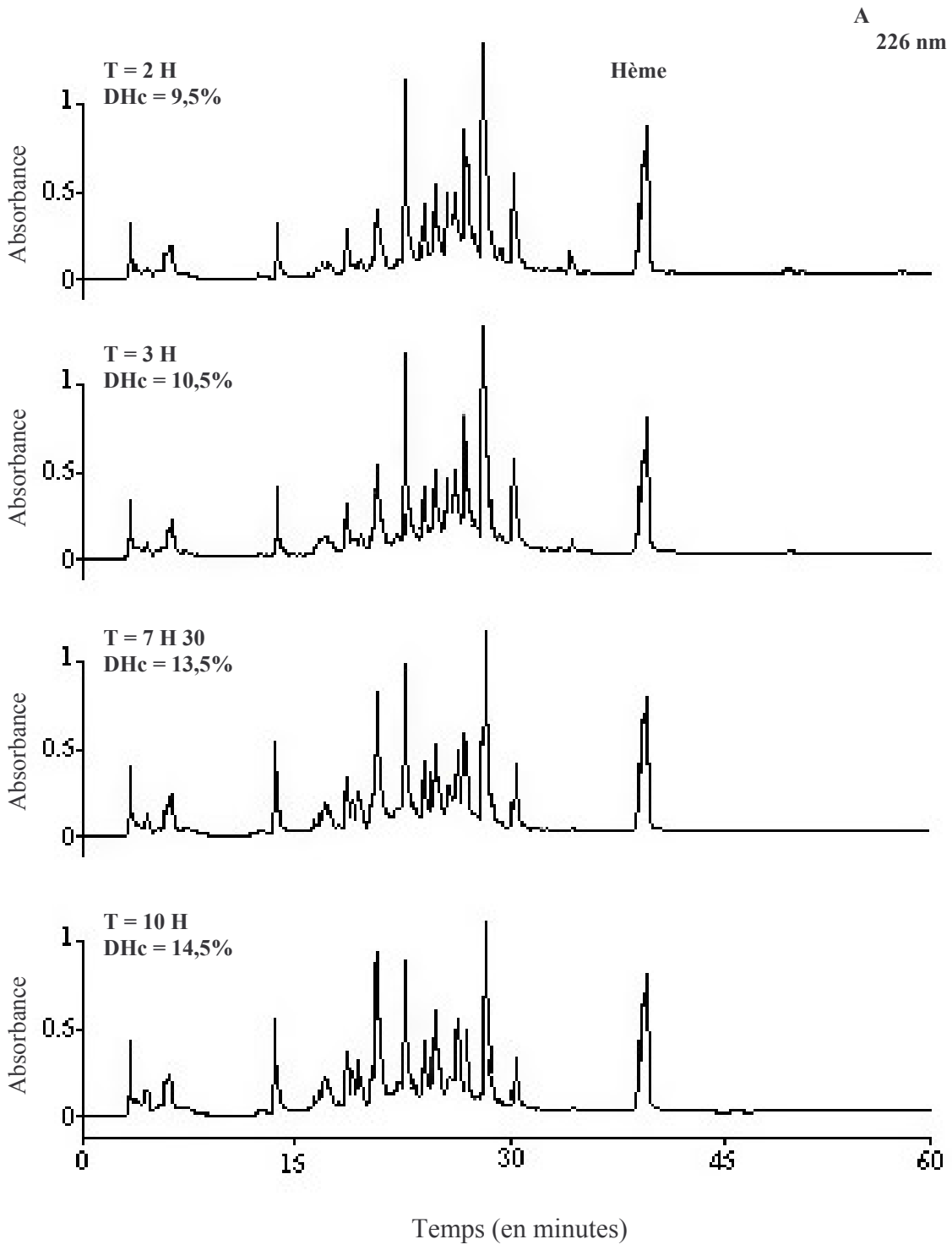
a

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl



b

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl



c

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

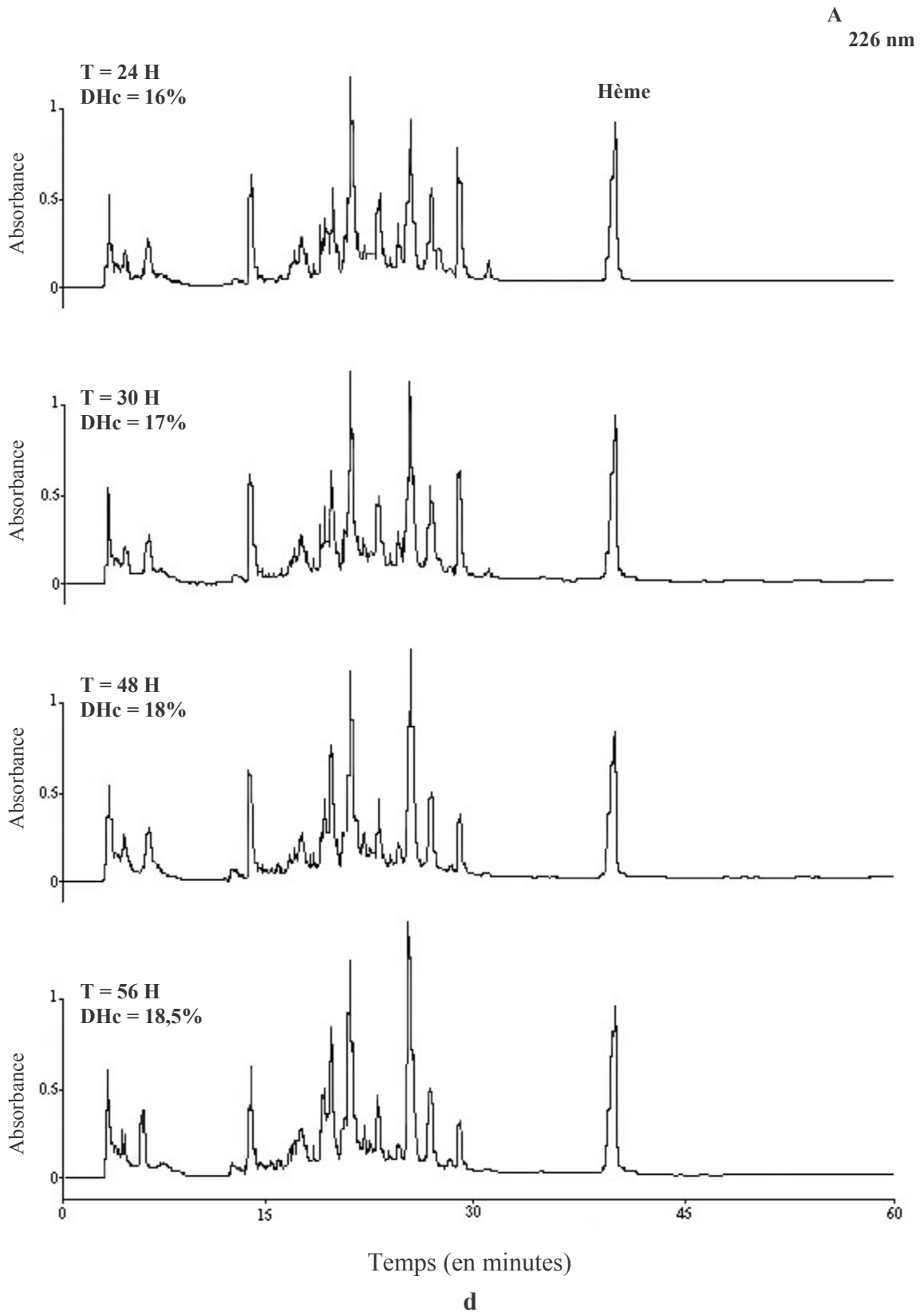


Figure 1. *Profil CLHP (a, b, c, et d) de la cinétique d'Hydrolyse de l'hémoglobine bovine 1% (p/v) par la pepsine à pH 4,5 et à 23°C en conditions dénaturantes.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

I.2. Obtention de peptides antimicrobiens

I.2.1 Mise en évidence des peptides à activité antimicrobienne à partir de l'hydrolysat d'hémoglobine bovine.

L'hémoglobine 1% (p/v) a été hydrolysée par la pepsine en conditions dénaturantes (urée 6M) sur une durée de 2,5 minutes soit 3% de degré d'hydrolyse. Dans un premier temps, l'activité antimicrobienne de l'hydrolysat dans sa totalité a été testée.

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne au sein de l'hydrolysat d'hémoglobine bovine est effectuée selon la technique en double couche de Parish *et al.,* (2001) décrite dans la section « Matériels et Méthodes ». Après 24H d'incubation à 37°C de la souche bactérienne avec l'échantillon à tester, l'activité antimicrobienne de l'échantillon est détectée par l'apparition de zone d'inhibition de croissance autour des puits contenant la souche et l'échantillon. L'hydrolysat a été testé à une concentration de 1mg/mL. La validation du test a été faîte par un nombre élevé de tests effectués et par l'utilisation de témoins : un antibiotique, la tétracycline à une concentration de 0,1 mg/mL (témoin positif c'est-à-dire 100% inhibition de croissance) et le tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7,5 (témoin négatif c'est à dire 0% inhibition de croissance).

L'activité antimicrobienne de l'hydrolysat a été testé sur 10 souches bactériennes : 7 souches à Gram-positif (*Micrococcus luteus* A270*, Listeria innocua, Staphylococcus aureus, Staphylococcus saprophyticus, Staphylococcus simulans, Bacillus cereus, Enterococcus faecalis)* et 3 souches à Gram-négatif (*Escherichia coli, Shigella sonnei, et Salmonella enteritidis)* (Tableau I). L'hydrolysat est actif vis-à-vis de 4 souches bactériennes : 2 bactéries à Gram-positif *Micrococcus luteus* A270, et *Listeria innocua*, et 2 bactéries à Gram-négatif : *Escherichia coli* et *Salmonella enteritidis*.

Souches bactériennes		Inhibition de croissance des souches bactériennes
Micrococcus luteus	Gram +	+
Listeria innocua	Gram +	+
Bacillus cereus	Gram +	-
Enterococcus faecalis	Gram +	-
Staphylococcus aureus	Gram +	
Staphylococcus simulans	Gram +	-
Staphylococcus saprophyticus	Gram +	-
Escherichia coli	Gram -	+
Shiegella sonnei	Gram -	-
Salmonella enteritidis	Gram -	+

Tableau I. *Inhibition de croissance des souches bactériennes par l'hydrolysat d'hémoglobine bovine (DHc = 3%) à une concentration de 1mg/mL.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

L'hydrolysat a ensuite été analysé par CLHP à l'échelle analytique sur une colonne de phase inverse de type C_4 (Figure 2). Les pics du chromatogramme ont été numérotés de 1 à 26 afin de faciliter leur identification.

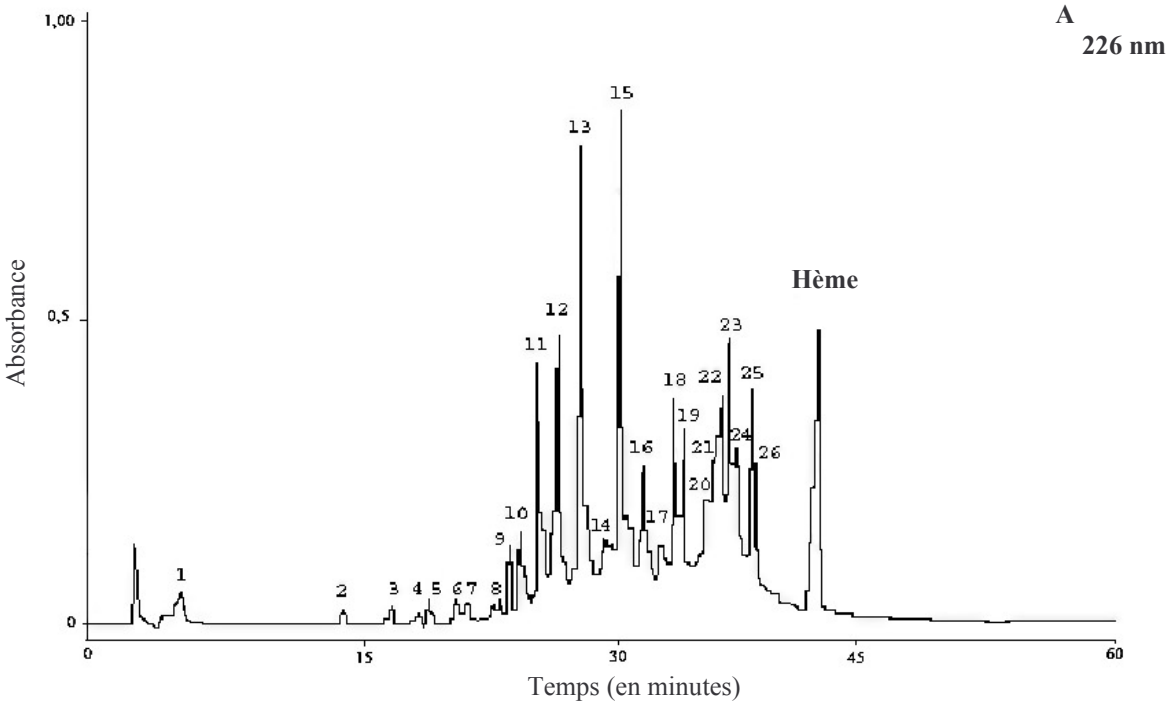


Figure 2. *Profil CLHP à l'échelle analytique de l'hydrolysat pepsique d'hémoglobine bovine 1% (p/v) obtenu en conditions dénaturantes dans du tampon acétate de sodium 0,1M pH 4,5 (DHc=3%).*

Afin de tester chacune de ces fractions, celles-ci ont été récoltées lors de l'analyse de l'hydrolysat par CLHP à l'échelle semi-préparative sur une colonne C_4 de 10mm de diamètre. Le débit et les quantités injectées ont été calculés pour que le profil chromatographique soit identique à celui obtenu à l'échelle analytique. Puis l'ensemble des fractions a été lyophilisé.

Après lyophilisation, chaque fraction a été testée sur les quatre souches : *Listeria innocua, Micrococcus luteus, Salmonella enteritidis* et *Escherichia coli*. Le tableau II montre les résultats obtenus pour les 26 fractions. Une inhibition de croissance des souches bactériennes testées, est observée pour 15 fractions peptidiques. Celles-ci correspondent aux fractions : 1, 5, 7, 8, 11, 13, 14, 16, 18, 19, 21, 22, 23, 25 et 26. Ces fractions ont été caractérisées par spectrométrie de masse afin de déterminer le ou les peptides présents ainsi que leur séquence en acides aminés.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Fraction	Souches bactériennes			
	Salmonella enteritidis	*Escherichia coli*	*Listeria innocua*	*Micrococcus luteus*
1	+	+	+	+
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	+	+	+	+
6	-	-	-	-
7	+	+	+	+
8	+	+	+	+
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	+	+	+	+
12	-	-	-	-
13	+	+	+	+
14	+	+	+	+
15	-	-	-	-
16	+	+	+	+
17	-	-	-	-
18	+	+	+	+
19	+	+	+	+
20	-	-	-	-
21	+	+	+	+
22	+	+	+	+
23	+	+	+	+
24	-	-	-	-
25	+	+	+	+
26	+	+	+	+

Tableau II. *Activité des fractions issues de l'hydrolysat pepsique d'hémoglobine bovine DHc=3%. Présence d'activité antimicrobienne (+) et absence d'activité antimicrobienne (-).*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

I.2.2. Identification et caractérisation des peptides antimicrobiens par spectrométrie de masse

Les fractions peptidiques ont été analysées par MALDI-TOF et ESI/MS. La population peptidique au cours de la cinétique d'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine a été établie par Lignot (1998). Les peptides générés au cours de cette hydrolyse pepsique de l'hémoglobine ont tous été identifiés selon leur séquence en acides aminés et selon leur masse molaire. Au sein des fractions actives, l'obtention de une ou plusieurs masses, va permettre l'identification du ou des peptides présents.

Les résultats obtenus, sont présentés dans le tableau III. Cinq fractions (1, 5, 18, 23, et 25) sont pures. La fraction 1 contient le peptide α 137-141 de 654 Da (Figure 3a). Celui-ci correspond à un peptide isolé par Zhao *et al.,* (1997), la néokyotorphine, connue pour ses propriétés analgésiques (Takagi *et al.*, 1982), et comme facteur stimulant la croissance de cellules tumorales (Blishchenko *et al.*, 2001 et Sazonova *et al.*, 2003). La fraction 5 contient un peptide de 1054 Da correspondant au fragment α 133-141 (Figure 3b), qui stimule la croissance de cellules tumorales comme la néokyotorphine (Sazonova *et al.*, 2003). La fraction 18 correspond au peptide β 126-145 de 2195 Da (Figure 3c). Le peptide de 3151 Da (Figure 3d) contenu dans la fraction 23 correspond au fragment α 106–135 ou α 107–136. La séquence a été élucidée après fragmentation par ESI/MS/MS, il s'agit du peptide α 107–136 (Figure 4). La fraction 25 contient le peptide α 107–141 de 3787 Da (Figure 3e). Par contre, les autres fractions (7, 8, 11, 13, 14, 16, 19, 21, 22, et 26) contiennent plusieurs peptides allant de deux à cinq peptides (spectres de masse non présentés). Il est difficile de savoir lequel ou lesquels de ces peptides ont une activité antimicrobienne ou seulement l'un d'entre eux. Dans la fraction 7, se trouve le peptide α 1-23 dont l'activité antimicrobienne avait été mise en évidence sur *Micrococcus luteus* A270 par Froidevaux *et al.* en 2001.

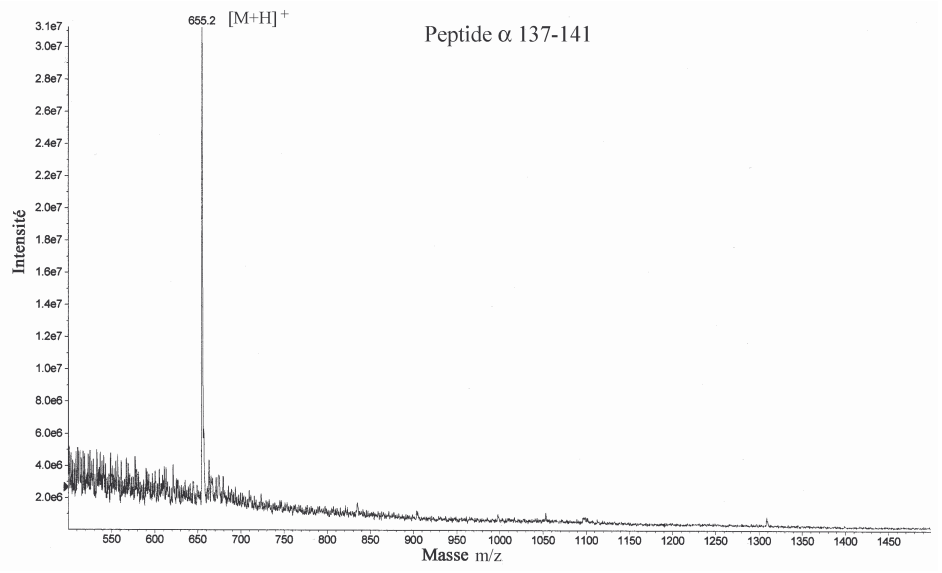
Après avoir récupéré les peptides purs en grande quantité par CLHP à l'échelle semi-préparative, leur concentration minimale inhibitrice (CMI), et leur mode d'action ont été déterminés. Puis dans un second temps, l'effet hémolytique ainsi que quelques propriétés structurales de ces peptides ont été étudiés.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

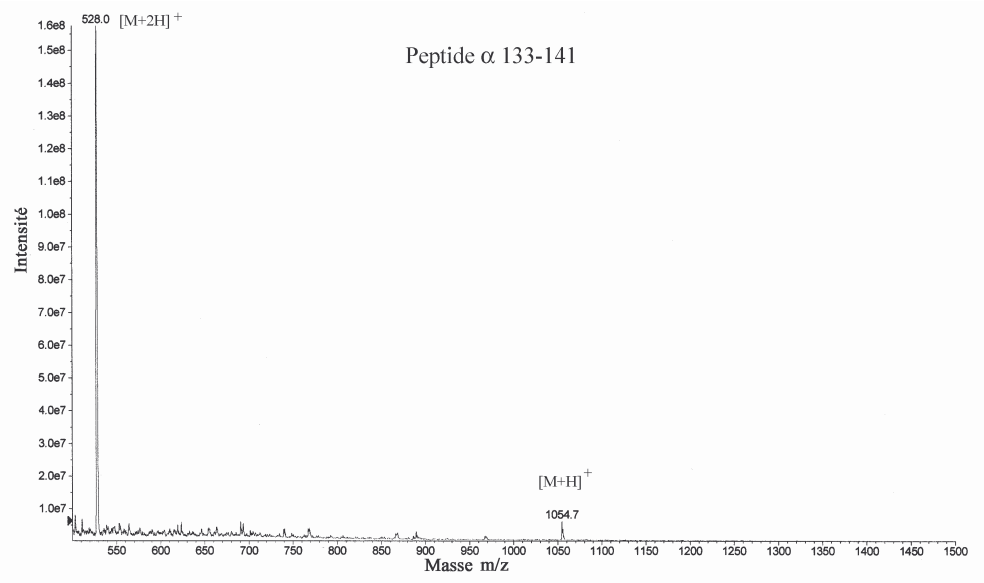
Fraction	Masse $(M+H)^+$ en Da	Peptide (s)
1	655	α 137-141
5	1055	α 133-141
7	2237	α 1-23
	1038	α 24-32
8	2728 2657 1305	α 1-28 α 1-27 β 91–101
11	2841 1650 1240	α 1-29 α 109–124 ou α 110–125 α 36–45 ou α 37–46
13	3258 2038	α 1-32 α 110–128
14	4292 3488	β 44-83 ou β 45-84 α 34-66
16	4802 3540 3635 1734 1587	β 40-83 ou β 41-84 α 67-98 α 33–66 α 33–46 α 33–45 ou α 34–46
18	2196	β 126-145
19	2753 2196 3177	β 121-145 β 126-145 β 1-30
21	6086 5274 6655 5435	β 31-84 α 34-83 α 36–97 ou α 37–98 α 47–98
22	1820 2838 7151 5422 7004	β 31-44 α 107–133 α 33-98 α 33-83 α 33-97 ou α 34-98
23	3152	α 107–136 ou α 106-135
25	3788	α 107-141
26	3788 3556 2104	α 107-141 β 114–145 β 31-47

Tableau III. *Identification des peptides issus des fractions actives par spectrométrie de masse.*

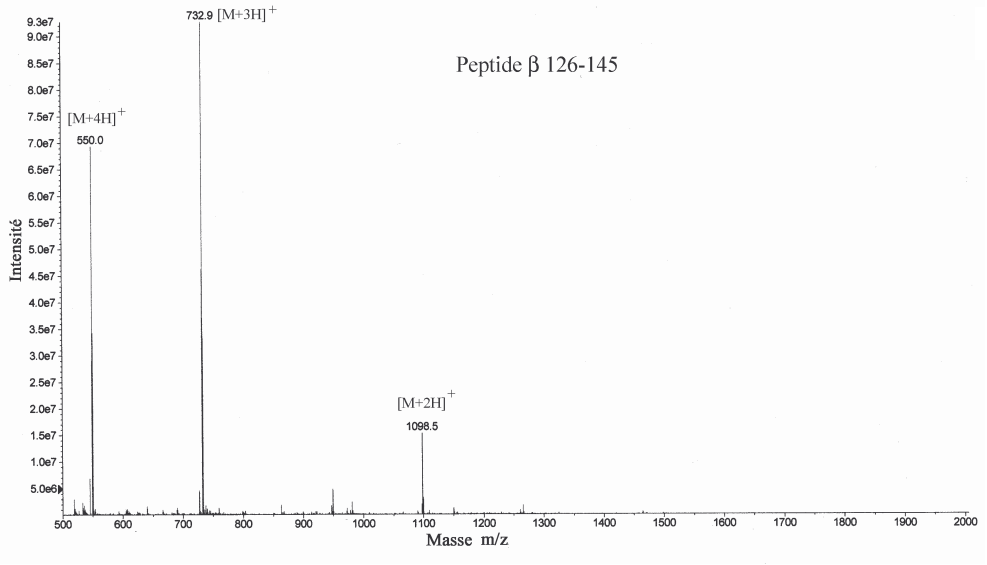
© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl



a



b



c

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

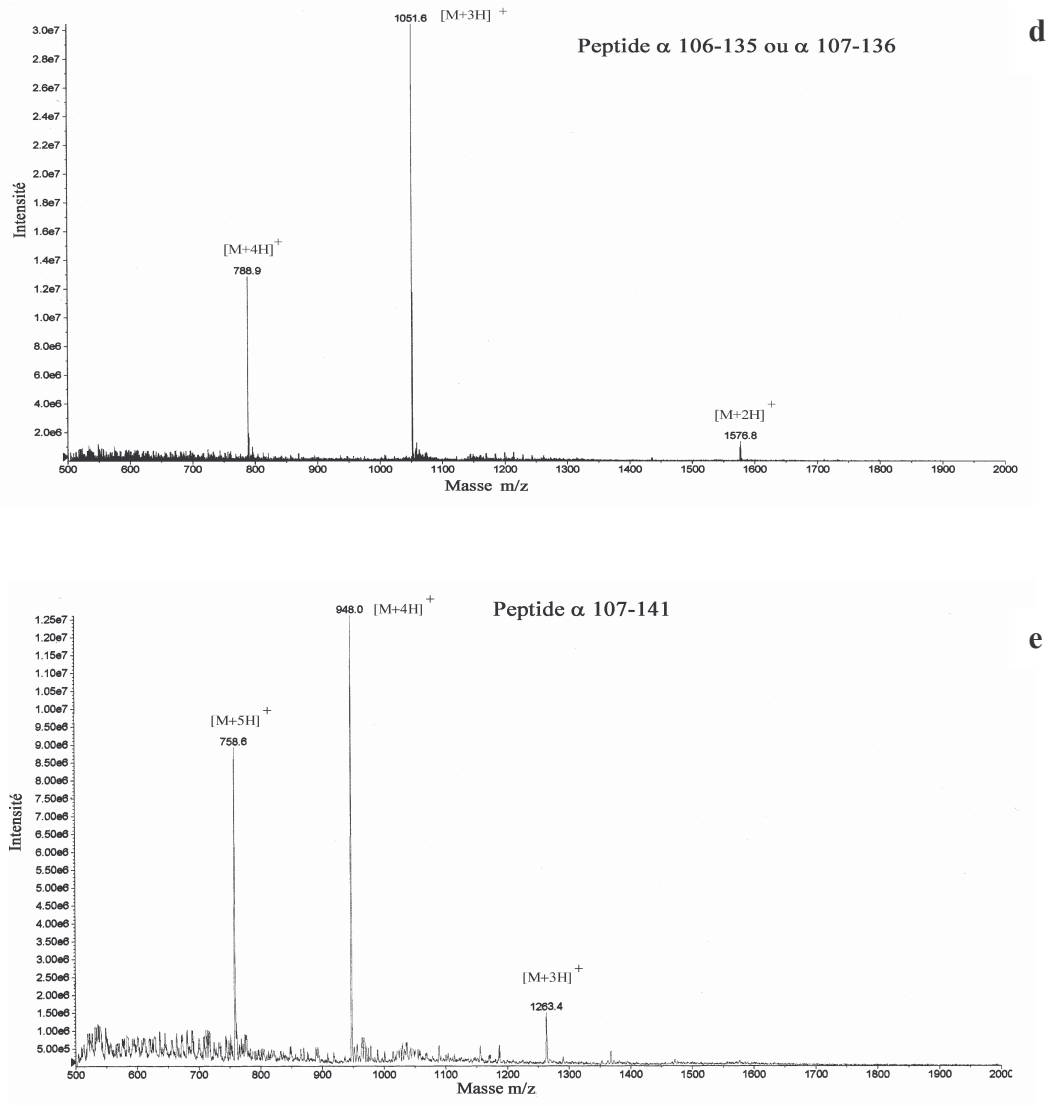


Figure 3. *Spectres de masses des fractions pures analysées par ESI/MS : a fraction 1, b fraction 5, c fraction 18, d fraction 23 et e fraction 25.*

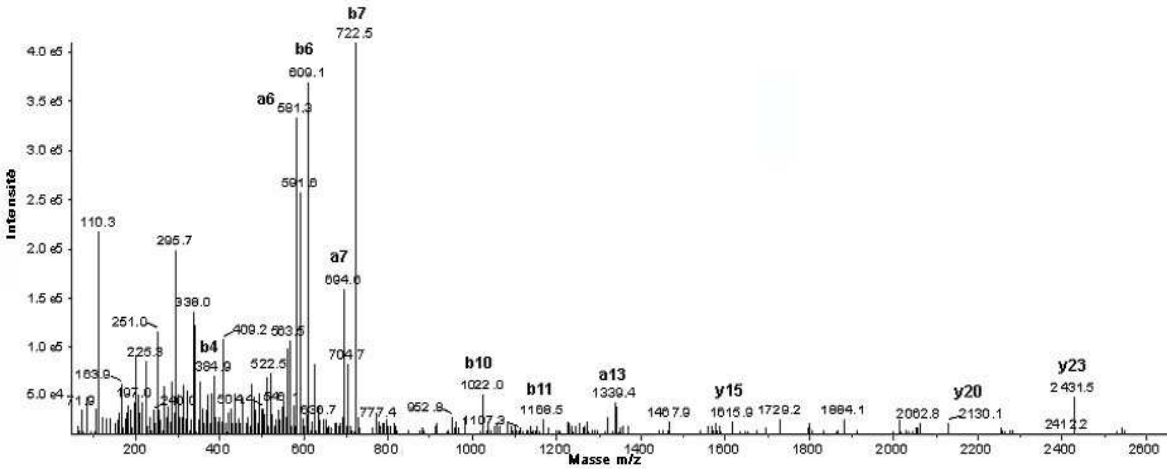


Figure 4. *Spectre ESI/MS/MS du peptide de 3152 Da $(M + H)^+$.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

I.2.3. Détermination de la CMI et du mode d'action des peptides antimicrobiens purs

Pour déterminer la CMI, l'activité antimicrobienne a été testée en milieu liquide sur microplaque dans du milieu Müller-Hinton liquide contenant des concentrations variables de peptides. L'activité antimicrobienne est détectée par l'absence de croissance dans les puits contenant la souche bactérienne et le peptide à la concentration testée.

Cette méthode permet de calculer la concentration minimale inhibitrice qui correspond à la plus faible concentration de l'agent antimicrobien capable d'inhiber la croissance de la souche bactérienne testée après un temps d'incubation de 24 heures à 37°C. Des dilutions successives au ½ des différents peptides purs ont été testées vis-à-vis des quatre souches cibles. La concentration initiale des peptides a été évaluée, en calculant leur coefficient d'extinction molaire à 226 nm et en mesurant leur absorbance à 226 nm (Perrin, 1999). Pour le peptide α 107-141, la concentration de départ est de 0,66 mg/mL, pour le peptide α 107-136, elle est de 0,48 mg/mL, pour les autres peptides (β 126-145, α 133-141, et α 137-141) elle est de 1mg/mL.

Le tableau IV présente les CMI obtenues à partir de ces peptides actifs. Deux groupes se distinguent : d'un côté se trouvent les peptides β 126-145, α 107-136, et α 107-141, et de l'autre côté les peptides α 133-141, et α 137-141 qui possèdent une CMI plus faible que ceux de l'autre groupe.

Souches Bactériennes	CMI (µM)				
	β 126-145	α 107-136	α 107-141	α 133-141	α 137-141
Micrococcus luteus	71	76	87	15	9
Salmonella enteritidis	35	76	87	8	5
Escherichia coli	71	76	87	8	9
Listeria innocua	71	38	43	2	1

Tableau IV. *CMI des peptides antimicrobiens.*

A partir du puits correspondant à la CMI, il est possible de déterminer si le peptide présente des propriétés bactéricides ou bactériostatiques. Pour cela, chaque puits correspondant à la CMI sert au dénombrement des cellules restantes. Le nombre de cellules obtenues sans avoir ajouté de peptides (témoin de croissance) est également dénombré pour définir un pourcentage de mortalité cellulaire. Après incubation à 37°C pendant 24 h, un dénombrement est effectué afin de déterminer le nombre d'UFC (Unité Formant Colonie) par mL.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Peptide	*Micrococcus luteus*	*Salmonella enteritidis*	*Escherichia coli*	*Listeria innocua*
β 126-145	97,14%	98,5%	97,44%	98%
α 107-136	98,8 %	99,1 %	97,2 %	97 %
α 107-141	99 %	97,84 %	98,3 %	96,4 %
α 133-141	99,6%	97,3%	97,6%	97%
α 137-141	97,7%	97,8%	99,45%	97,6%

Tableau V. *Mortalité cellulaire des souches bactériennes engendrée par les peptides antimicrobiens.*

Le tableau V montre que, lorsque l'ensemble des peptides antimicrobiens se trouve à une concentration correspondant à leur CMI, ils induisent une mortalité supérieure ou égale à 96,4 %. Un agent antimicrobien est dit « bactéricide » lorsque celui-ci induit une mortalité cellulaire supérieure ou égale à 99,99 %. Les peptides antimicrobiens ne sont donc pas bactéricides, mais bactériostatiques.

I.2.4. Détermination de l'effet hémolytique

L'activité hémolytique des peptides antimicrobiens purs a été mise en évidence sur des globules rouges de bœuf, d'après les méthodes de Strub *et al.,* (1996) et de Dathe *et al.,* (1996). Différentes concentrations en peptide correspondant à des multiples de la CMI sont testées sur les globules rouges. Afin de valider le test, il est nécessaire de réaliser des témoins : un témoin négatif avec lequel aucune hémolyse n'est observée, et un témoin positif où 100 % des globules rouges sont hémolysés. Dans le témoin négatif, du tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7,5 est mis à incuber avec les globules rouges, tandis que dans le témoin positif le tampon phosphate de sodium est remplacé par du dodécyl sulfate de sodium (SDS) à 2%.

Les essais sont incubés à 37°C pendant 40 minutes, puis centrifugés 5 minutes à 5000 rpm. Après séparation du culot et du surnageant, celui-ci est dilué au 1/16ème, afin de lire son absorbance à 420 nm et ainsi de déterminer la quantité d'hémoglobine libérée lors de la lyse des globules rouges. Les différentes concentrations des peptides antimicrobiens testées, sont comprises entre la CMI et cinq fois la CMI.

Aucun des peptides antimicrobiens n'a entraîné une hémolyse des globules rouges de bœuf, même à une concentration élevée, correspondant à cinq fois la CMI. Ceci montre que ces peptides antimicrobiens issus de l'hémoglobine bovine, ne sont pas toxiques vis-à-vis des globules rouges.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

I.2.5. Propriétés structurales des peptides antimicrobiens purs

Après avoir déterminé la CMI, le mode d'action, et l'effet hémolytique des peptides purs, les propriétés structurales de ces peptides ont été recherchées.

L'utilisation de différents modèles mathématiques issus du pôle bio-informatique lyonnais (http://pbil.ibcp.fr), ont permis d'étudier les caractéristiques structurales des peptides antimicrobiens : le nombre d'acides aminés, le pourcentage de résidus hydrophobes, la charge globale, et la structure secondaire. La prédiction de la structure secondaire se fait par alignement de séquences.

Le tableau VI montre que les peptides antimicrobiens se répartissent en deux familles. La première famille comprend les peptides β 126-145, α 107-136, et α 107-141. Ces trois peptides présentent les mêmes caractéristiques que les peptides antimicrobiens répertoriés dans la littérature. Ils contiennent un grand nombre d'acides aminés avec une charge globale positive, un grand pourcentage de résidus hydrophobes et une structure secondaire en hélice α (Powers et Hancock, 2003).

Peptide	*Masse (Da)*	*Nombre AA*	*Résidus Hydrophobes (en %)*	*Charge à pH 7*	*Structure Secondaire*
β 126-145	2195	20	50%	+ 3	70 % Hélice α
α 107-136	3151	30	50%	+ 1	54% Hélice α
α 107-141	3787	35	42%	+ 3	47% Hélice α
α 133-141	1054	9	22%	+ 2	59% Random Coil
α 137-141	654	5	0%	+ 2	93% Random Coil

Tableau VI. *Caractéristiques structurales des peptides antimicrobiens.*

La seconde famille contenant les peptides α 133-141, et α 137-141 est différente de celle des peptides antimicrobiens classiques. Ce sont de petits peptides (5 et 9 AA) chargés positivement, ne présentant pas ou peu de résidus hydrophobes, et un pourcentage élevé de structure en « Random coil ». Généralement, les peptides antimicrobiens chargés positivement, avec une structure en « Random coil » peuvent en solution aqueuse se structurer au contact de la membrane biologique (Powers et Hancock, 2003, et Corbier *et al.*, 2001).

En comparant les structures secondaires des chaînes α et β de l'hémoglobine (Section Rappels, IV.2.1.1. Figures 7 et 9), il est possible de confirmer les prédictions des structures secondaires de ces peptides antimicrobiens. Entre les résidus 123 et 145, la chaîne β est formée de 2 hélices α (H10 et H11) ce qui coïncide avec la structure en hélice α du peptide β

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

126-145 qui a été prédite. Les peptides α 107-136 et α 107-141, sont localisés sur la chaîne α au sein de 2 hélices α : H7 (Val^{96}-His^{112}) et H8 (Pro^{119}-Leu^{136}), ce qui confirme leur structure en hélice α. Par contre, la région 137-141 de la chaîne α ne possède pas de structure secondaire spécifique, ce qui explique les 93% de structure en « random coil » pour le peptide α 137-141. Le pourcentage de structure en « random coil » est un peu plus faible pour le peptide α 133-141 (59%), car les résidus 133-136 font partis de l'hélice H8.

Les peptides α 133-141, et α 137-141 ont probablement un mécanisme d'action différent de celui généralement décrit pour les peptides antimicrobiens : adsorption par interactions électrostatiques avec la membrane, puis insertion de la partie hydrophobe dans la membrane, ce qui induit la formation de pores (Yeaman et Yount, 2003).

Afin de préciser la partie active au sein du peptide α 137-141, des tests ont été réalisés sur le peptide synthétique YR correspondant à la kyotorphine (α 140-141), peptide analgésique (Shiomi *et al.*, 1981). Plusieurs concentrations (de 1 à 10 mg/mL) ont été testées sur les quatre souches cibles. Aucune inhibition de croissance des souches bactériennes n'a été détectée. La kyotorphine de séquence YR, n'est donc pas active.

Lopes *et al.,* (2005), ont montré que la néokyotorphine (α 137-141 : TSKYR) pouvait interagir avec les membranes biologiques. Cette interaction induit un changement de conformation du groupement phénolique de la tyrosine, permettant à la néokyotorphine de se fixer sur un récepteur membranaire provoquant un effet analgésique. L'interaction se fait par l'intermédiaire de deux acides aminés, la lysine et l'arginine qui apportent les charges positives nécessaires pour interagir avec les charges négatives des phospholipides des membranes biologiques. Ceci montre que pour interagir avec les membranes des souches bactériennes, la séquence KYR est indispensable, ce qui pourrait expliquer l'activité antimicrobienne de la néokyotorphine. Celle-ci pourrait également par l'intermédiaire de la Tyrosine se fixer sur un récepteur présent à la surface des membranes des souches bactériennes et induire une inhibition de croissance de la souche bactérienne.

I.3. Purification des fractions antimicrobiennes par CLHP

Les fractions (8, 11, 13, 14, 16, 19, 21, 22, et 26) non pures contenant plusieurs peptides, ont subi plusieurs étapes de purification supplémentaires afin de séparer les peptides. Après leur récupération par CLHP à l'échelle semi-préparative, chaque peptide, a été lyophilisé pour tester à nouveau son activité antimicrobienne. Les résultats de ces tests sont présentés dans le tableau VII.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

La fraction 8 doit son activité antimicrobienne à la présence des peptides α 1-28 et α 1-27. La fraction 11 contient deux peptides antimicrobiens correspondant aux peptides α 1-29 et α 36–45 (ou α 37–46). Le peptide α 1–32 présent dans la fraction 13, est responsable de l'activité antimicrobienne de celle-ci. La fraction 14 contient un peptide antimicrobien correspondant au peptide α 34–66. Trois peptides présentent une activité antimicrobienne au sein de la fraction 16, il s'agit des peptides α 33–66, α 33–46, et α 33–45 (ou α 34–46). La fraction 19 contient en plus du peptide antimicrobien β 126–145, deux autres peptides antimicrobiens, le peptide β 121–145 et le peptide β 1–30. La fraction 21 contient deux peptides antimicrobiens, correspondant aux peptides α 34-83, et α 36–97 (ou α 37–98). Les peptides α 107-133, α 33-83, α 33-98, et α 33-97 (ou α 34-98) contenus dans la fraction 22, présentent également une activité antimicrobienne. Quant à la fraction 26, en plus de la présence du peptide antimicrobien α 107-141, elle contient un deuxième peptide antimicrobien, le peptide β 114–145.

Fraction	Masse $(M+H)^+$ en Da	Peptides
8	**2728**	**α 1-28**
	2657	**α 1-27**
	1305	β 91–101
11	**2841**	**α 1-29**
	1650	α 109–124 ou α 110–125
	1240	**α 36–45 ou α 37–46**
13	**3258**	**α 1-32**
	2038	α 110–128
14	4292	β 44-83 ou β 45-84
	3488	**α 34-66**
16	4802	β 40-83 ou β 41-84
	3540	α 67-98
	3635	**α 33–66**
	1734	**α 33–46**
	1587	**α 33–45 ou α 34–46**
19	**2753**	**β 121-145**
	2196	**β 126-145**
	3177	**β 1-30**
21	6086	β 31-84
	5274	**α 34-83**
	6655	**α 36–97 ou α 37–98**
	5435	α 47–98
22	1820	β 31-44
	2838	**α 107–133**
	7151	**α 33-98**
	5422	**α 33-83**
	7004	**α 33-97 ou α 34-98**
26	**3788**	**α 107-141**
	3556	**β 114–145**
	2104	β 31-47

Tableau VII. *Identification des peptides antimicrobiens présents dans les fractions actives.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Lignot (1998) a montré lors de l'étude cinétique de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine, que les peptides générés, se répartissent en famille. Il en est de même pour l'ensemble des peptides antimicrobiens obtenus au cours de cette hydrolyse. L'étude des tableaux III et VII montre que ces peptides antimicrobiens, sont répartis en quatre familles : trois familles sont localisées au sein de la chaîne α (Figure 5) et une famille au sein de la chaîne β (Figure 7).

La première famille (Figure 5) localisée du côté $N_{terminal}$ de la chaîne α de l'hémoglobine bovine, est constituée des peptides α 1-32, α 1-29, α 1-28, α 1-27, et α 1-23. La partie active de ces peptides est donc localisée entre les résidus 1 et 23. L'observation des propriétés structurales de ces peptides (Tableau VIII), montre que la partie active de ces peptides antimicrobiens correspondant au peptide α 1-23, possède un pourcentage en hélice α plus faible (30 %) que les autres peptides. Par contre, ce peptide possède une charge globale plus élevée (+2) et un grand pourcentage de résidus hydrophobes.

Peptide	*Masse (Da)*	*Nombre AA*	*Résidus Hydrophobes (en %)*	*Charge à pH 7*	*Structure Secondaire*
α 1-32	3257	32	46%	+ 1	58 % Hélice α
α 1-29	2840	29	48%	+ 1	44 % Hélice α
α 1-28	2727	28	46%	+ 1	45 % Hélice α
α 1-27	2656	27	44%	+ 1	45 % Hélice α
α 1-23	2236	23	47%	+ 2	30% Hélice α

Tableau VIII. *Caractéristiques structurales des peptides antimicrobiens.*

Certains de ces peptides antimicrobiens ont également été isolés à partir de la dégradation protéolytique de l'hémoglobine humaine Mak *et al.,* (2004). Cette équipe a en effet obtenu des peptides antimicrobiens purs ainsi que des fractions peptidiques actives. Parmi ces peptides purs, ont été identifiés les peptides α 1-40, α 1-33, α 1-32, α 1-31, α 1-29, et α 1-20. Dans cette région de la chaîne α, il n'y a que 4 AA qui diffèrent entre les deux séquences (Figure 6). Ceci montre que le changement de 4 AA (Proline par Alanine, Thréonine par Glycine, Alanine par Glycine, et Glycine par Alanine) n'entraîne pas de perte totale d'activité antimicrobienne.

$V^{1}LSAADKGNV^{10}KAAWGKVGGH^{20}AAEYGAEALE^{30}RMFLSFPTTK^{40}$

$V^{1}LSPADKTNV^{10}KAAWGKVGAH^{20}AGEYGAEALE^{30}RMFLSFPTTK^{40}$

Figure 6. *Séquence en acides aminés de la région 1-40 de la chaîne α de l'hémoglobine bovine (noir) et de l'hémoglobine humaine (bleu). La couleur rouge représente les acides aminés variables.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

© 2006 Tous droits réservés.

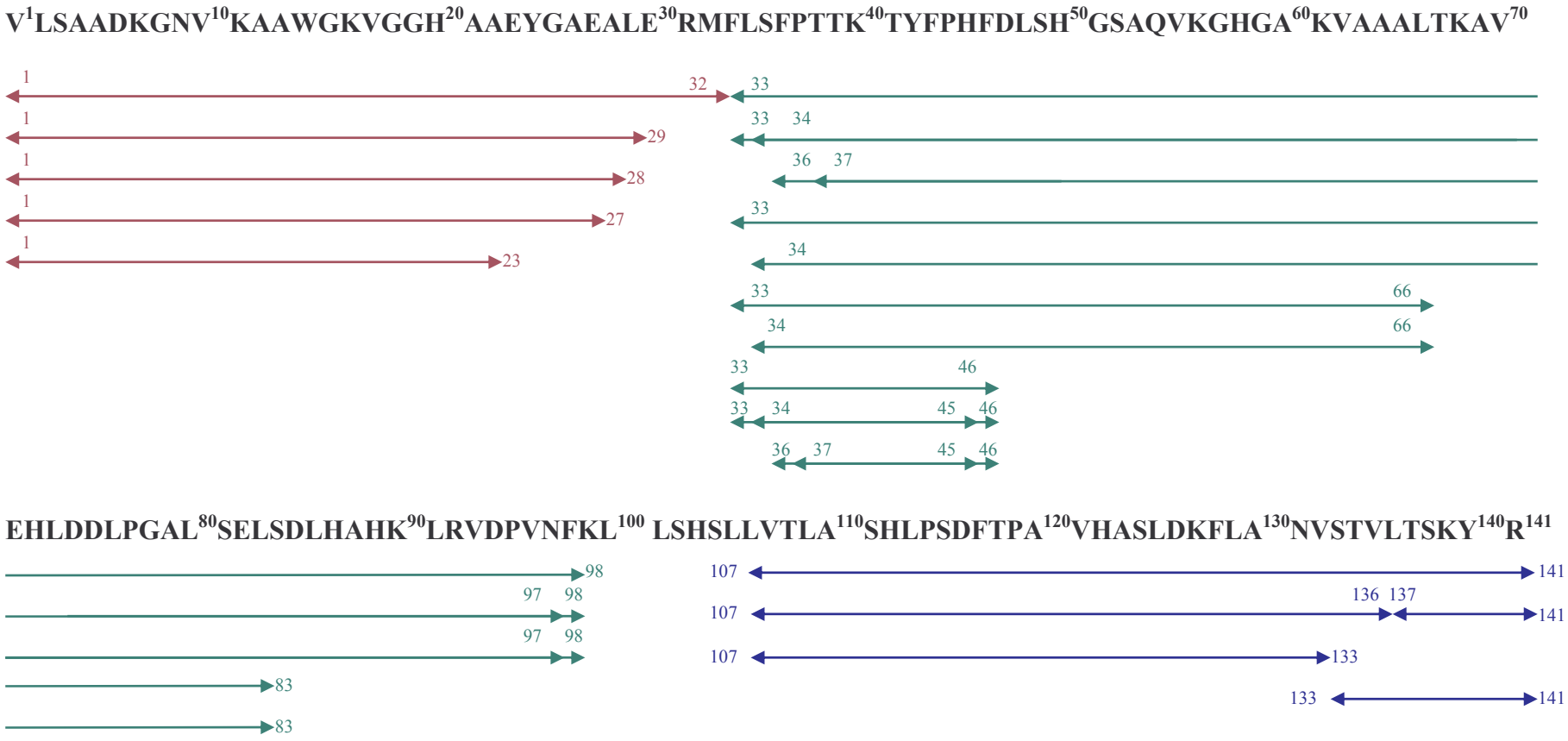


Figure 5. *Représentation des peptides antimicrobiens sur la chaîne α de l'hémoglobine bovine.*

La seconde famille située entre les résidus 33 et 98 (Figure 5), comprend les peptides α 33-98, α 33-97 (ou α 34-98), α 36-97 (ou α 37-98), α 33-83, α 34-83, α 33-66, α 34-66, α 33-46, α 33-45 (ou α 34-46), et α 36-45 (ou α 37-46). Le peptide α 33-98 en générant les peptides α 33-66, et α 33-46, libère les peptides α 67-98, et α 47-98 qui ne présentent pas d'activité antimicrobienne. En étudiant l'ensemble de ces peptides, il devient alors possible de préciser la séquence active. Celle-ci est située entre les résidus 36 et 46. Le tableau IX présente les propriétés structurales de ces peptides. Celui-ci montre que tous les peptides actifs ont une charge globale positive. Par contre, il est possible de séparer cette famille en deux groupes : le premier groupe est constitué de peptides α 33-98, α 33-97 (ou α 34-98), α 36-97 (ou α 37-98), α 33-83, et α 34-83. Ceux-ci possèdent un pourcentage en hélice α autour de 50%. Par contre le second groupe, formé des peptides α 33-66, α 34-66, α 33-46, α 33-45 (ou α 34-46), et α 36-45 (ou α 37-46), possède un nombre d'acides aminés plus petit (inférieur à 50). Le tableau IX montre qu'au sein de ce groupe, plus le nombre d'AA diminue, plus le caractère hydrophobe des peptides diminue, par contre le pourcentage de structure secondaire en « Random Coil » augmente.

Peptide	***Masse (Da)***	***Nombre AA***	***Résidus Hydrophobes (en %)***	***Charge à pH 7***	***Structure Secondaire***
α 33-98	7150	66	40 %	+ 4	50% Hélice α
α 33-97 (ou α 34-98)	7003	65	38 %	+ 4	49 % Hélice α
α 36-97 (ou α 37-98)	6654	62	37 %	+ 4	52 % Hélice α
α 33-83	5421	51	40 %	+ 3	49 % Hélice α
α 34-83	5273	50	38 %	+ 3	50% Hélice α
α 33-66	3634	34	41 %	+ 5	63 % Random Coil
α 34-66	3487	33	39 %	+ 5	61 % Random Coil
α 33-46	1733	14	35 %	+ 2	72 % Random Coil
α 33-45 (ou α 34-46)	1586	13	30 %	+ 2	74 % Random Coil
α 36-45 (ou α 37-46)	1239	10	20 %	+ 2	75 % Random Coil

Tableau IX. *Caractéristiques structurales des peptides antimicrobiens.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

La dernière famille située du coté $C_{terminal}$ de la chaîne α (Figure 5), se forme à partir du peptide α 107-141, qui va ensuite générer quatre peptides correspondant aux peptides α 107-136, α 137-141, α 107-133, et α 133-141. Le tableau X montre que dans cette famille, les peptides actifs se répartissent en deux groupes. Au sein du premier groupe, se trouvent les peptides α 107-141, α 107-136, et α 107-133 qui possèdent une charge globale positive, un grand pourcentage de résidus hydrophobes et une structure secondaire en hélice α. Tandis que les peptides α 133-141, et α 137-141 sont localisés dans le second groupe. Ces deux peptides présentent une structure différente de celle des peptides du premier groupe. Ils possèdent une structure secondaire en « Random coil » ne présentant pas ou peu de résidus hydrophobes, avec une charge globale positive. Ce sont également des peptides de petite taille : 5 et 9 acides aminés.

Peptide	*Masse (Da)*	*Nombre AA*	*Résidus Hydrophobes (en %)*	*Charge à pH 7*	*Structure Secondaire*
α 107-141	3787	35	42%	+ 3	47% Hélice α
α 107-136	3151	30	50%	+ 1	54% Hélice α
α 107-133	2837	27	48%	+ 1	51% Hélice α
α 133-141	1054	9	22%	+ 2	59% Random Coil
α 137-141	654	5	0%	+ 2	93% Random Coil

Tableau X. *Caractéristiques structurales des peptides antimicrobiens.*

La figure 5 montre que ces trois familles recouvrent presque toute la totalité de la chaîne α. Celle-ci est donc une source importante de peptides antimicrobiens.

Du côté de la chaîne β de l'hémoglobine bovine, ont été répertoriés le peptide β 1-30 et une famille de peptides localisée dans la région $C_{terminal}$ de la chaîne β (Figure 7). Le premier peptide formant cette famille correspond au peptide β 114-145, qui va ensuite générer le peptide β 121-145, lui-même précurseur du peptide β 126-145. Il devient alors possible de préciser la partie active au sein de ces trois peptides, elle est située entre les résidus 126 et 145. L'observation du tableau XI, montre que les propriétés structurales de ces peptides sont assez proches, seul le peptide β 114-145 possède une charge globale positive plus élevée.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

© 2006 Tous droits réservés.

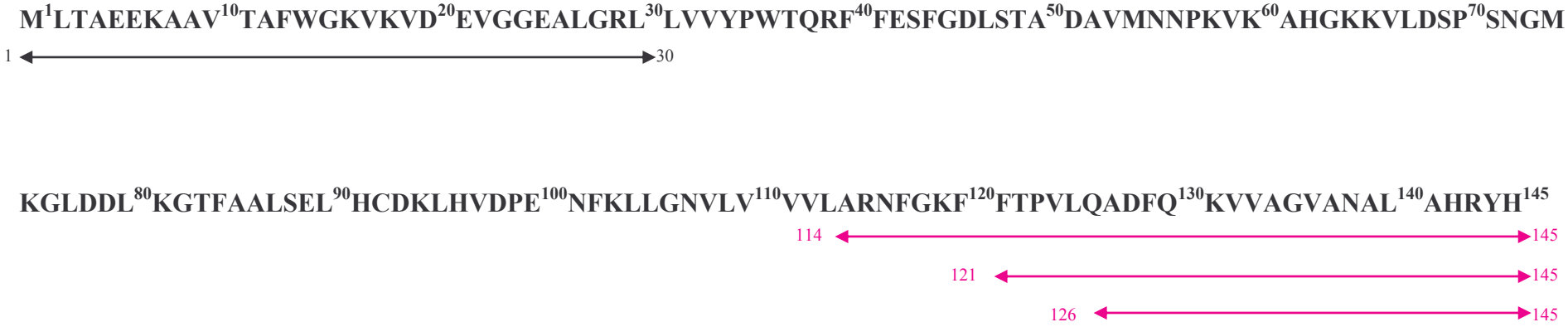


Figure 7. *Représentation des peptides antimicrobiens sur la chaîne β de l'hémoglobine bovine.*

http://www.univ-lille1.fr/bustl

Thèse de Véronique Dubois-Delval, Lille 1, 2006

Peptide	*Masse (Da)*	*Nombre AA*	*Résidus Hydrophobes (en %)*	*Charge à pH 7*	*Structure Secondaire*
β 114-145	3555	32	50%	+ 5	72 % Hélice α
β 121-145	2752	25	52%	+ 3	79 % Hélice α
β 126-145	2195	20	50%	+ 3	70 % Hélice α

Tableau XI. *Caractéristiques structurales des peptides antimicrobiens.*

Ces peptides sont tous des peptides intermédiaires qui se trouvent parmi une centaine d'autres peptides au sein de l'hydrolysat pepsique de l'hémoglobine. Afin de faciliter l'isolement de ces peptides antimicrobiens intermédiaires, une étude sur l'amélioration des méthodes de préparation de ces peptides antimicrobiens a été envisagée.

I.4. Amélioration des méthodes de préparation des peptides antimicrobiens

Des études sur l'amélioration des méthodes de préparation de ces peptides antimicrobiens ont été menées sur les cinétiques d'apparition de ces peptides au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine. Trois paramètres ont été envisagés : la mise au point d'un système d'extraction des peptides antimicrobiens par des systèmes biphasiques (eau/alcools), l'effet de la température et l'effet du pH sur les cinétiques d'apparition des peptides antimicrobiens.

I.4.1. Etude de l'extraction des peptides antimicrobiens par des systèmes biphasiques (eau/alcools)

L'extraction de peptides antimicrobiens, grâce à un système biphasique représente un intérêt pratique dans la procédure de purification de telles molécules. Elle présente un moyen simple à mettre en œuvre et contribue à réduire quantitativement le nombre de peptides extraits, grâce à la sélectivité du solvant organique. Cela contribuerait à réduire les étapes nécessaires à l'isolement de ces peptides actifs, qui font souvent appel à la combinaison de différentes techniques chromatographiques coûteuses.

Plusieurs auteurs, ont rapporté l'extraction de peptides hydrophobes ou actifs à partir d'un hydrolysat final d'hémoglobine : Aubes-Dufau *et al.,* (1995 et 1997) ont montré la capacité d'extraire les peptides amers avec du butan-2-ol. Zhao et Piot (1998), ont montré également l'extraction de deux peptides opioïdes par les alcools : butan-1-ol, butan-2-ol, pentan-1-ol, et pentan-2-ol. Puis en 2001 au laboratoire, Froidevaux *et al.,* ont mis au point

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

par un plan d'expérience un mélange : eau/butan-2-ol/octan-1-ol (45/45/10 v/v/v) permettant l'extraction sélective de ces deux opioïdes au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine.

L'étude de l'extraction des peptides antimicrobiens a été faîte avec des solvants de la famille des alcools : Butan-1-ol, Butan-2-ol, Pentan-1-ol, Pentan-2-ol, Hexan-1-ol, Hexan-2-ol, Heptan-1-ol et Octan-1-ol. L'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine à 1% (p/v) a été menée en conditions dénaturantes (urée 6M), à pH 4,5 dans du tampon acétate de sodium 0,1M et à 23°C. L'hydrolyse a été stoppée à un faible degré d'hydrolyse : 3% soit 2,5 minutes d'hydrolyse, permettant l'obtention de peptides antimicrobiens.

L'extraction se déroule en plusieurs étapes. Lors de l'arrêt de la réaction enzymatique, le pH du milieu réactionnel est amené à pH 10 afin de dénaturer de façon irréversible la pepsine. La première étape consiste à diminuer le pH de l'hydrolysat à une valeur de 4,5 par addition d'acide chlorhydrique concentré. La deuxième étape correspond à la réalisation de l'extraction : une émulsion est créée pendant 10 minutes, en mélangeant l'hydrolysat et le solvant à volume égal. La dernière étape consiste à séparer les phases organiques et aqueuses par centrifugation et de les analyser par CLHP en phase inverse à l'échelle analytique sur une colonne C_4 de 4,6 mm de diamètre.

Après analyse par CLHP des solvants et des extractions, certains solvants ont été éliminés, c'est le cas du butan-1-ol et de l'hexan-2-ol, leur profil chromatographique présente des pics pouvant sortir au même endroit que certains peptides présents au sein de l'hydrolysat de l'hémoglobine bovine. Il en est de même pour l'heptan-1-ol et l'octan-1-ol puisque aucune extraction n'a été observée (profils CLHP non montrés). Par contre les profils chromatographiques des surnageants ont montré que plusieurs fractions peptidiques ont été extraits par le Butan-2-ol (Figure 8), le Pentan-1-ol (Figure 9), le Pentan-2-ol (Figure 10), et l'Hexan-1-ol (Figure 11). Certains pics présents sur le profil CLHP, non répertoriés par un temps de rétention, correspondent à des pics présents sur le profil CLHP du solvant (profils CLHP non montrés). Chaque fraction a ensuite été récoltée par CLHP à l'échelle semi-préparative, lyophilisée puis analysée par spectrométrie de masse afin d'identifier le ou les peptides présents.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

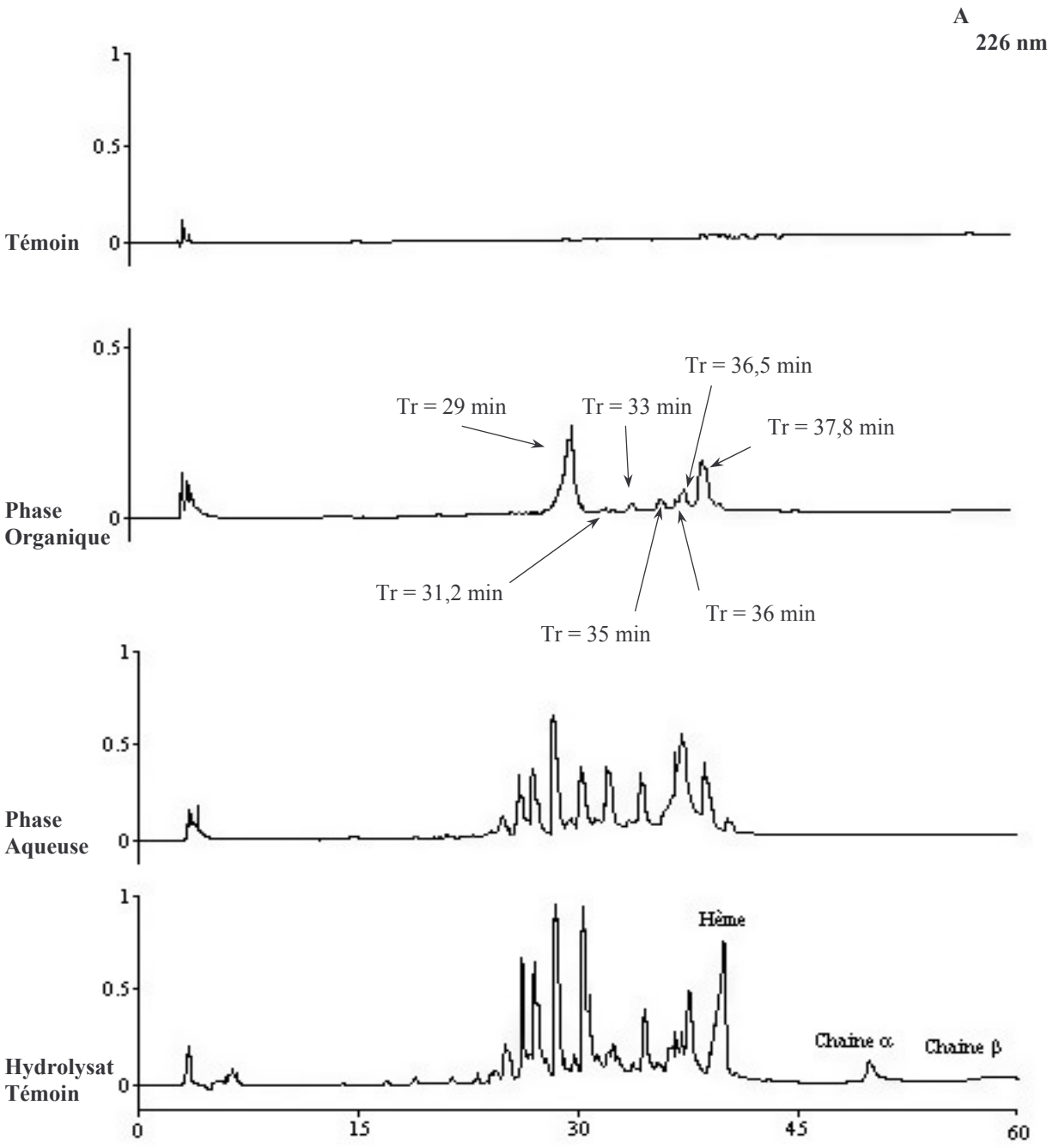


Figure 8. *Extraction des peptides par le Butan-2-ol à 3 % de degré d'hydrolyse.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

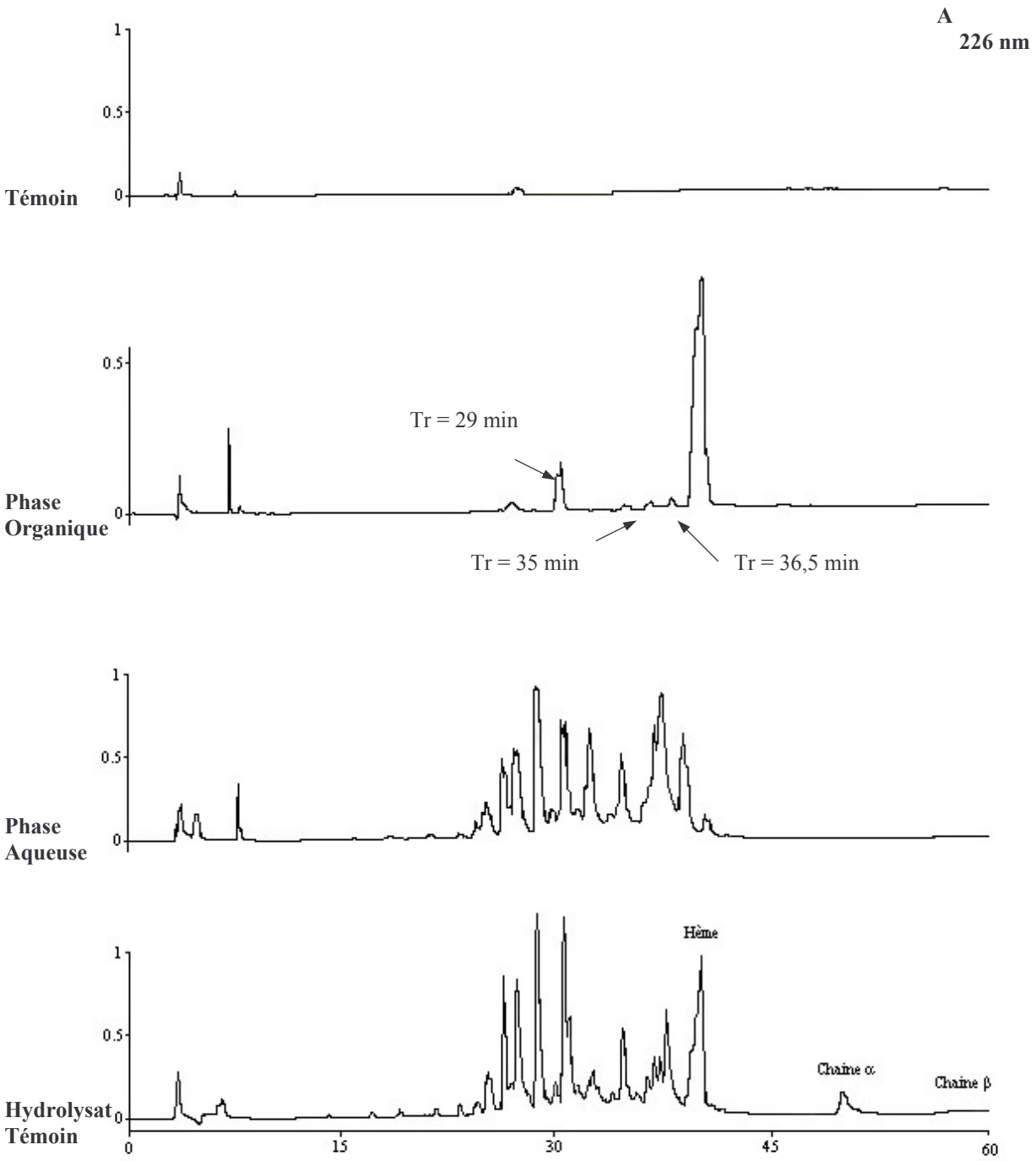


Figure 9. *Extraction des peptides par le Pentan-1-ol à 3 % de degré d'hydrolyse.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

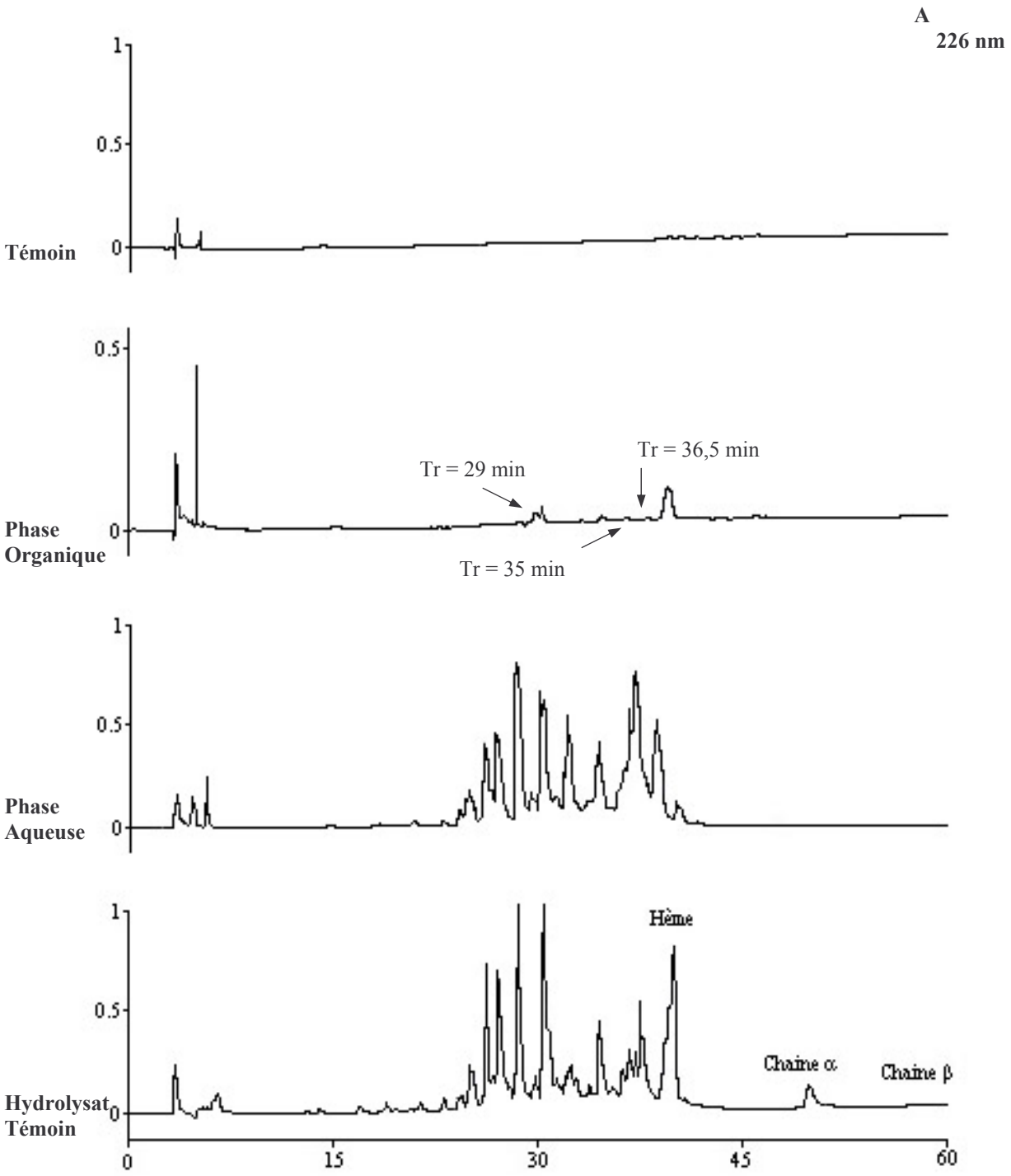


Figure 10. *Extraction des peptides par le Pentan-2-ol à 3 % de degré d'hydrolyse.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

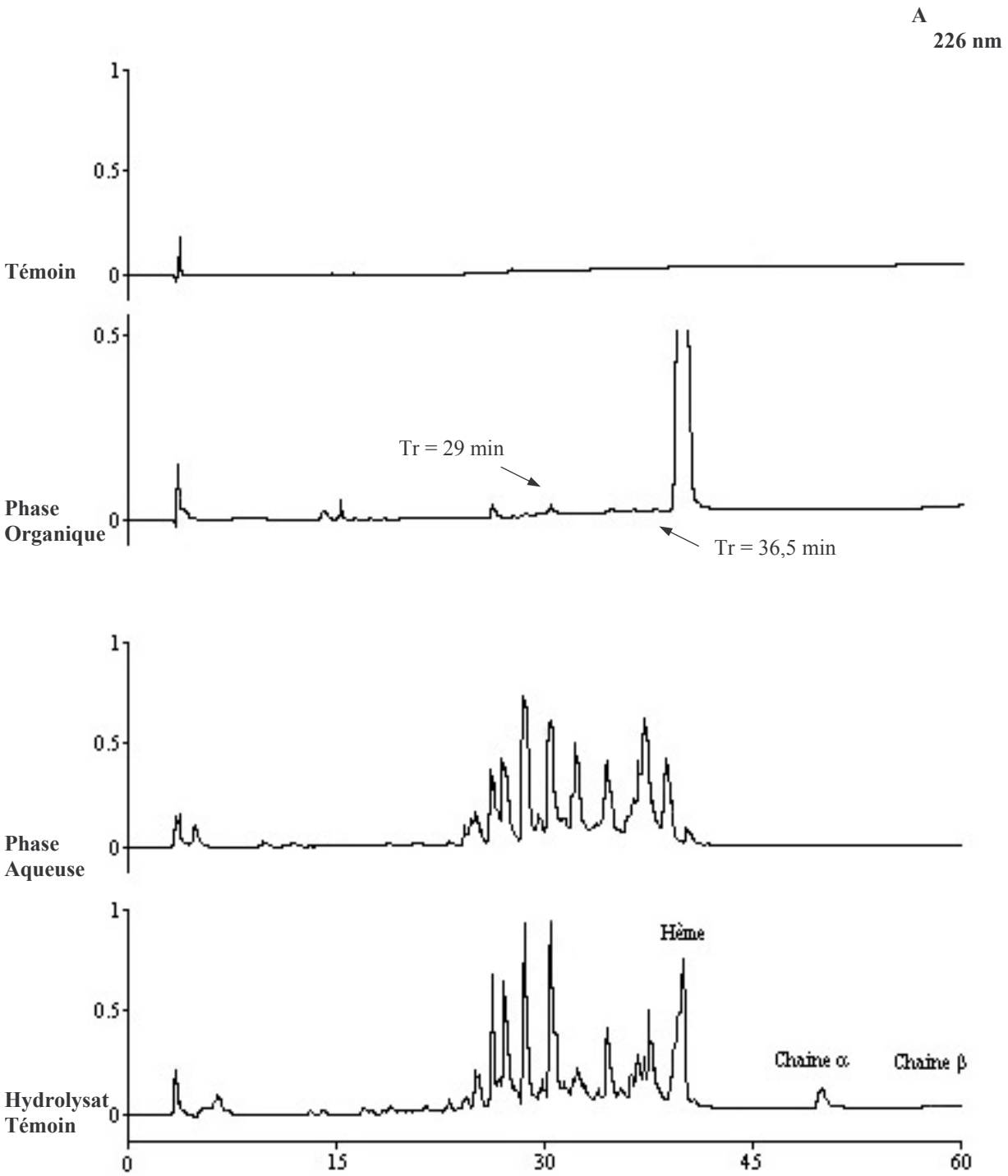


Figure 11. *Extraction des peptides par l'Hexan-1-ol à 3 % de degré d'hydrolyse.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Les résultats obtenus pour chaque solvant sont présentés dans le tableau XII, ainsi que le pHi et l'hydrophobicité (calculée selon l'échelle de Bigelow, 1967) de chaque peptide. Les spectres de masse obtenus par MALDI-TOF ont permis d'identifier les peptides extraits (Figures 12, 13 et 14).

Le butan-2-ol permet d'extraire d'un côté des peptides ayant des masses très élevées et une hydrophobicité moyenne (entre 800 et 1000), et de l'autre des petits peptides possédant une hydrophobicité plus élevée (> à 1000). Les gros peptides peuvent se replier et offrir au solvant leurs chaînes latérales les plus hydrophobes, ce qui permet leur extraction. Tandis que les petits peptides ne pouvant se réarranger, doivent posséder une hydrophobicité élevée pour être extraits. Quelque soit le peptide, à pH 4,5 ils sont en grande majorité chargés positivement, ce sont donc des peptides amphiphiles cationiques qui peuvent être extraits.

Sur l'ensemble des peptides extraits par le butan-2-ol, huit présentent une activité biologique. Le peptide β 31-40, est un peptide opioïde correspondant à la LVV-hémorphine-7 (LVVH 7) découvert par Piot *et al.,* en 1992, et le peptide β 1-30 découvert par Lebrun *et al.,* en 1998, permet de solubiliser l'hème et possède une activité antimicrobienne. Six peptides antimicrobiens sont également extraits : le peptide β 114-145, le peptide β 126-145, le peptide α 107-133, le peptide α 107-136, le peptide α 107-141 et le peptide α 33-46. Les autres peptides (β 31-44, et β 31-47) correspondent à des peptides dont l'activité n'a pas encore été définie. Il a été montré que les peptides β 31-44, et β 31-47 ne possédaient pas d'activités antimicrobiennes, mais il se trouve que ceux sont les précurseurs de la LVVH 7, l'activité opioïde de ces peptides devrait être vérifiée.

Avec les autres solvants (pentan-1-ol, pentan-2-ol, et hexan-1-ol), seule la LVVH 7, et les peptides β 31-44, et β 31-47 sont extraits. Ces peptides possèdent un caractère hydrophobe marqué contrairement aux autres peptides extraits avec le butan-2-ol, ce qui explique leur extraction par des solvants plus apolaires.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

© 2006 Tous droits réservés.

Solvant	Temps de rétention (en min)	Masse (en Da)	Peptide	Activité	pHi	Hydrophobicité (cal/mole)
Butan-2-ol	29	1308,2	β 31-40	Opioïde	8,75	1675
	31,2	1732,3	α 33-46	Antimicrobienne	8,60	1585
	33	2195,6	β 126-145	Antimicrobienne	8,60	842
	33	3175,8	β 1-30	Solubilisation de l'hème et Antimicrobienne	9,67	905
	35	1819,6	β 31-44	Non définie	6,00	1532
	35	2837,9	α 107-133	Antimicrobienne	5,97	962
	36	3151,0	α 107-136	Antimicrobienne	5,97	990
	36,5	2104.7	β 31-47	Non définie	4,37	1367
	37,8	3555,6	β 114-145	Antimicrobienne	9,70	965
	37,8	3786,6	α 107-141	Antimicrobienne	8,48	981
Pentan-1-ol	29	1308,3	β 31-40	Opioïde	8,75	1675
	35	1819 ,6	β 31-44	Non définie	6,00	1532
	36,5	2104,8	β 31-47	Non définie	4,37	1367
Pentan-2-ol	29	1308,3	β 31-40	Opioïde	8,75	1675
	35	1819,6	β 31-44	Non définie	6,00	1532
	36,5	2104,8	β 31-47	Non définie	4,37	1367
Hexan-1-ol	29	1308,3	β 31-40	Opioïde	8,75	1675
	36,5	2104,8	β 31-47	Non définie	4,37	1367

Tableau XII. *Extraction sélective de peptides actifs par certains alcools à 3 % de degré d'hydrolyse.*

http://www.univ-lille1.fr/bustl

Thèse de Véronique Dubois-Delval, Lille 1, 2006

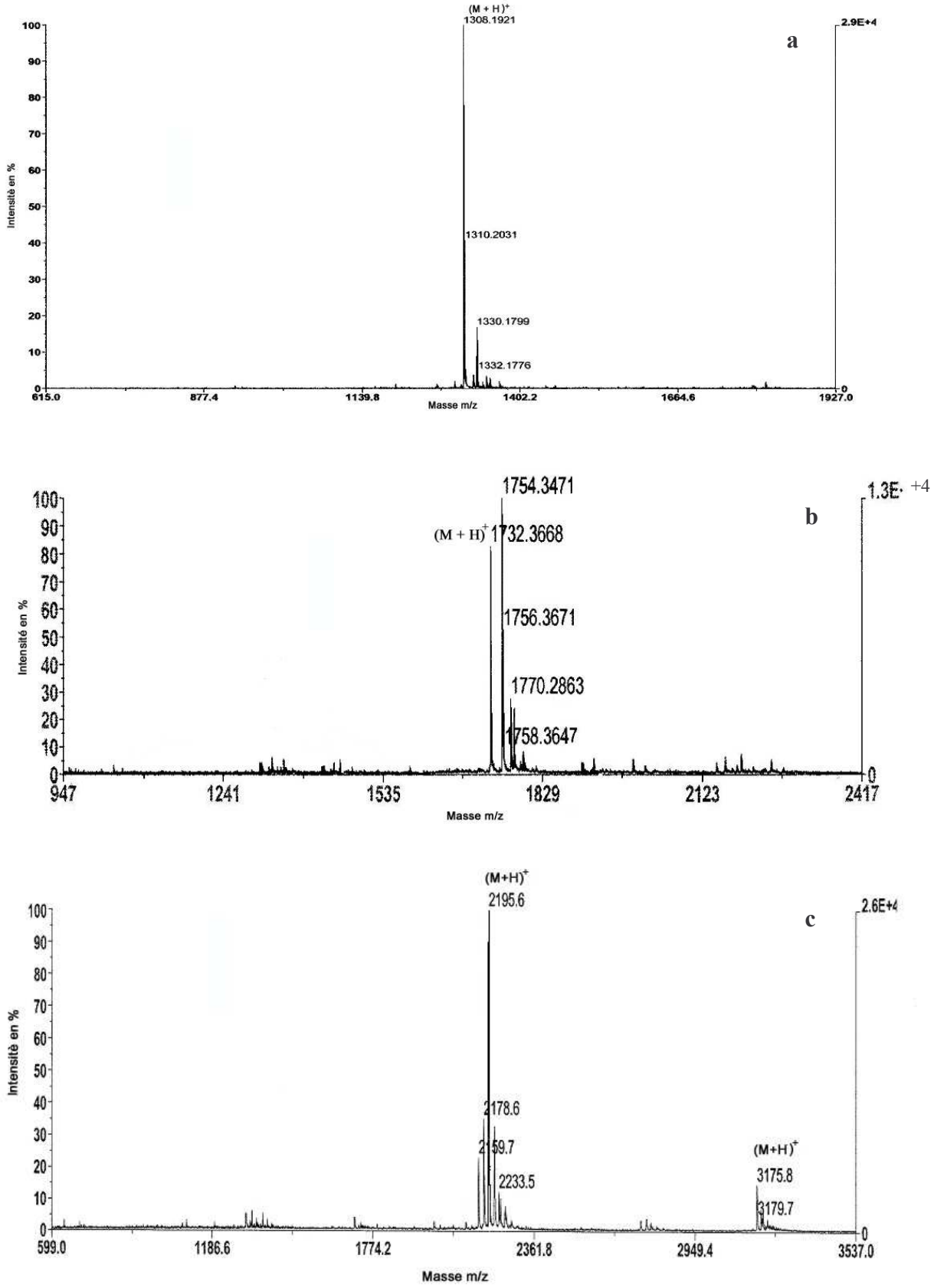
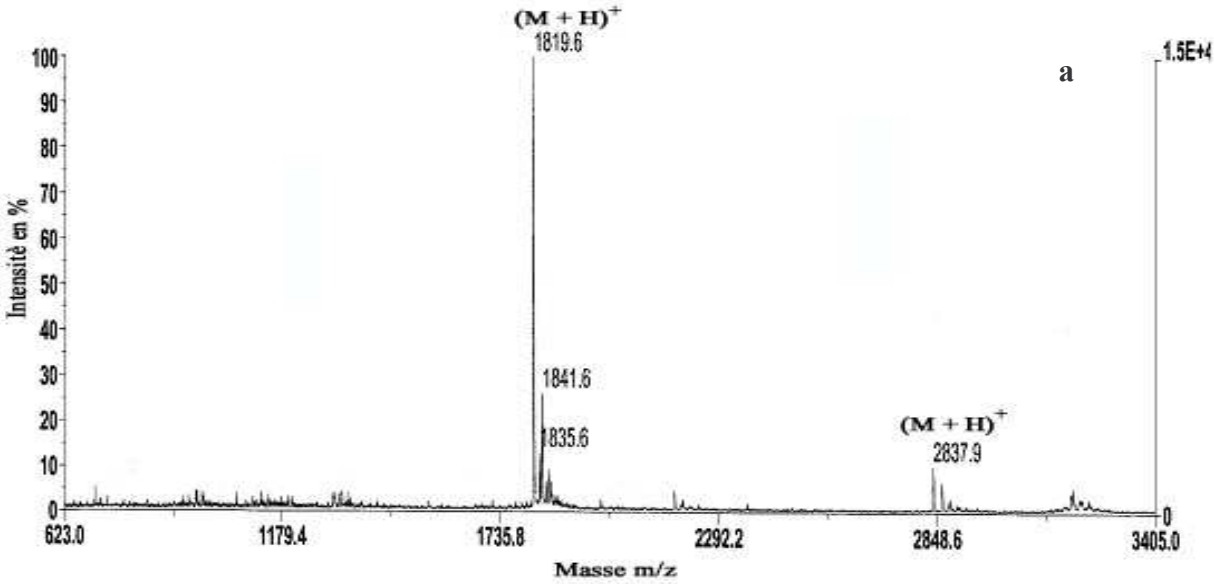


Figure 12. *Spectre MALDI-TOF des peptides extraits à 3% de degré d'hydrolyse. a : peptide β 31–40, b : peptide α 33-46, et c : peptides β 126–145 et β 1-30.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl



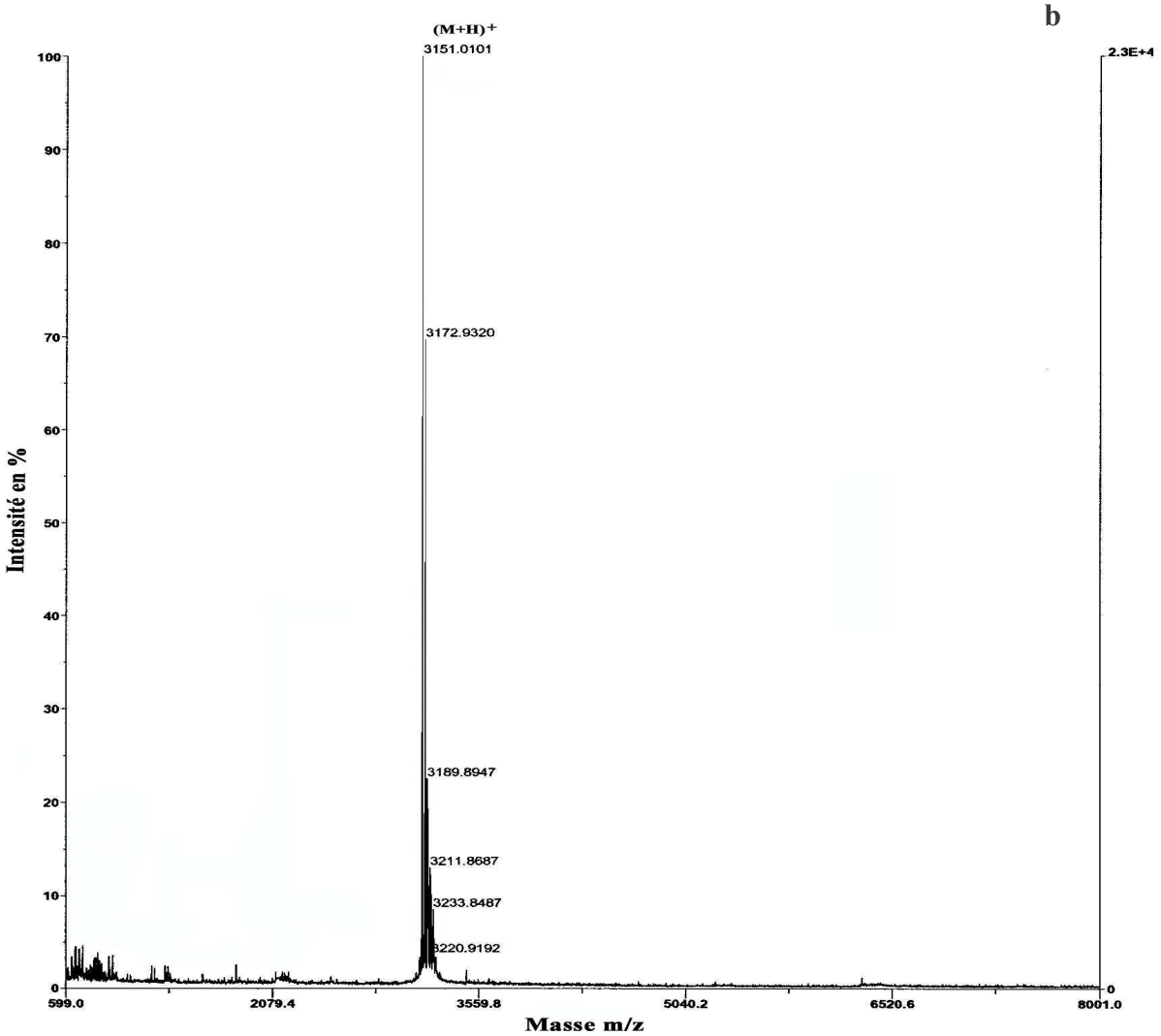
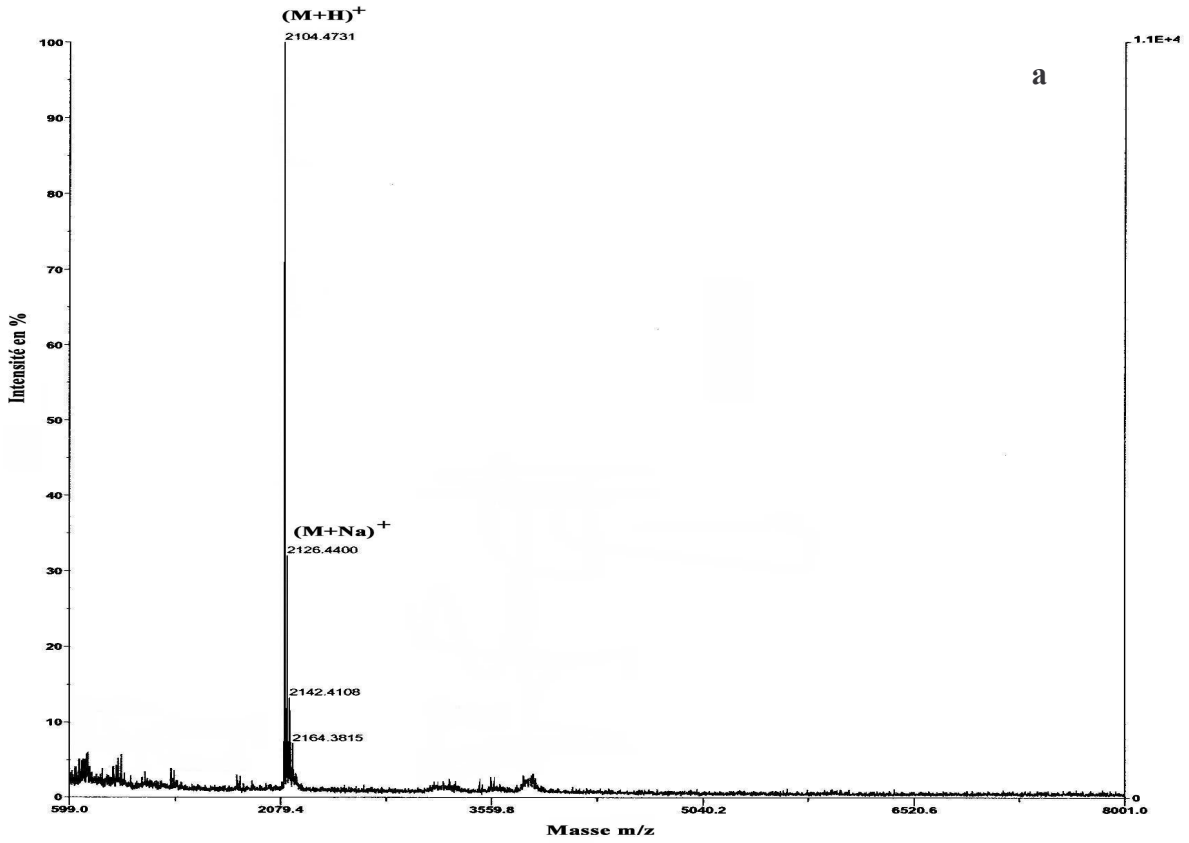


Figure 13. *Spectres MALDI-TOF des peptides extraits à 3% de degré d'hydrolyse. a : peptides β 31–44 et α 107-133, et b : peptide α 107-136.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl



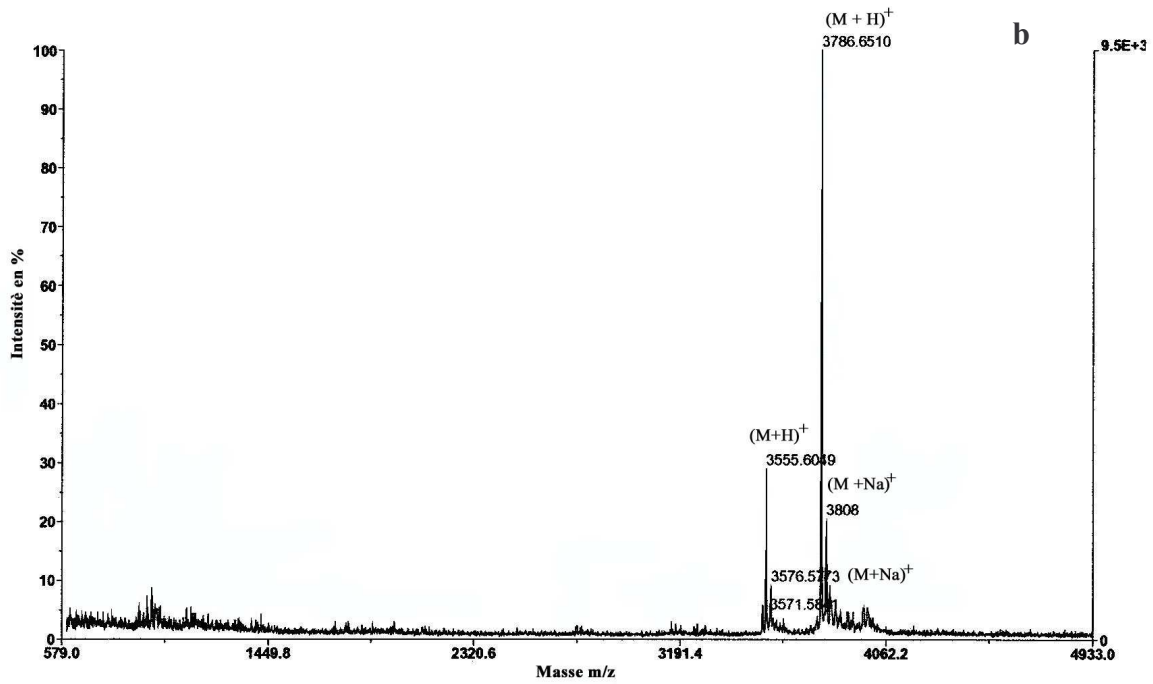


Figure 14. *Spectres MALDI-TOF des peptides extraits à 3% de degré d'hydrolyse. a : peptide β 31–47, et b : peptides β 114–145 et α 107 – 141.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Sur l'ensemble des peptides extraits par les alcools, il est possible de comparer sur la figure 15, l'efficacité des alcools. Celle-ci montre que c'est l'utilisation de butan-2-ol qui permet d'extraire le plus grand nombre de peptides actifs, et que plus la taille de la chaîne aliphatique des alcools augmente, moins il y a de peptides extraits.

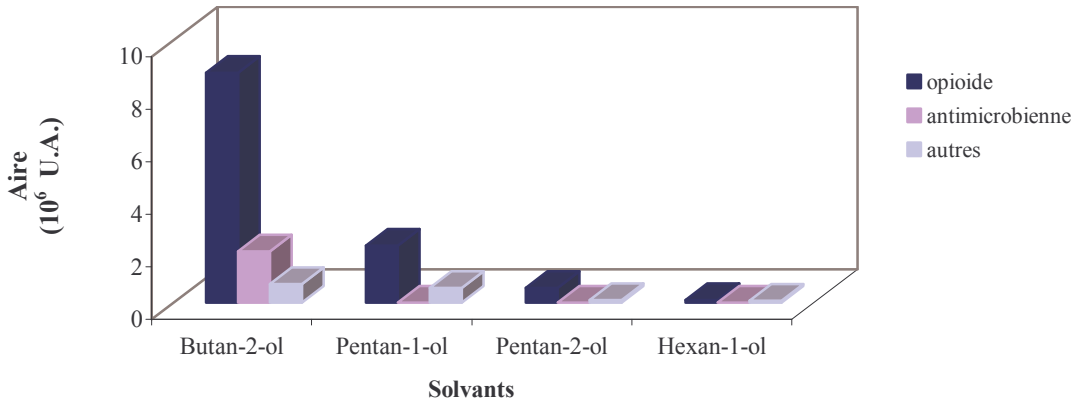


Figure 15. *Efficacité des alcools vis-à-vis de l'extraction des peptides actifs à 3 % de degré d'hydrolyse.*

Il est possible de déduire de ces expériences, que pour extraire les peptides antimicrobiens, ou d'autres peptides actifs tels que les peptides opioïdes, il faut utiliser le butan-2-ol. L'extraction des peptides actifs par des systèmes biphasiques (eau / alcools) permet de simplifier la méthode de purification d'un grand nombre de peptides actifs à faible degré d'hydrolyse. Cela permet un gain de temps au niveau d'une purification quantitative et d'éviter la CLHP qui est une méthode coûteuse.

L'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine en présence de concentrations élevées en urée étant contraignante pour des extrapolations à l'échelle préparative, la cinétique d'apparition des peptides antimicrobiens a été étudiée en faisant varier la température d'incubation ou le pH du milieu réactionnel, afin d'améliorer leur préparation.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

I.4.2. Etude de l'effet de la température sur la cinétique d'apparition des peptides antimicrobiens

L'objectif de cette étude est de montrer que le changement de la température dans le milieu réactionnel, peut influencer la cinétique d'apparition des peptides antimicrobiens et améliorer leur obtention. Pour cela, l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine à 1 % (p/v), a été menée à différentes températures d'incubation, dans le tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 en présence puis en l'absence d'urée, avec le même rapport E/S de 1/11 (mole/mole). Cinq températures ont été testées : 4°C, 15°C, 23°C, 30°C, et 40°C. L'hydrolyse menée à 23°C sert de référence. Des prélèvements à des temps réguliers ont été effectués, et la réaction a été stoppée en amenant le pH à 10 avec une solution d'arrêt (Tampon Borax 0,32 M pH 12,3). Chaque prélèvement de la cinétique a ensuite été fractionné par CLHP en phase inverse à l'échelle analytique.

Au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine, l'effet de la température, a été suivi sur les cinétiques d'apparition de certains peptides antimicrobiens c'est-à-dire les peptides : α 137-141, α 1-23, α 107–136, et β 126–145.

En absence d'urée (Figure 16b), l'augmentation progressive de la température est corrélée à une hausse de la concentration en peptides. A l'exception du peptide α 107–136, pour qui la température optimale d'obtention est 23°C (la température de référence), les températures 30°C et surtout 40°C favorisent l'augmentation en concentration des peptides α 137-141, α 1-23, et β 126–145, jusqu'à les augmenter d'un facteur 2 pour la néokyotorphine α 137-141 par rapport à la température de référence 23°C. Le décalage des optima de concentration est assez marqué en conditions non dénaturantes, avec une tendance générale : les températures 30°C et 40°C se décalent ensemble, par rapport aux températures 4°C, 15°C et 23°C. Pour chacun des deux groupes, l'effet température provoque une augmentation progressive de la concentration des peptides, au même degré d'hydrolyse. Cette tendance est principalement observée à basses températures : 4°C, 15°C et 23°C.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

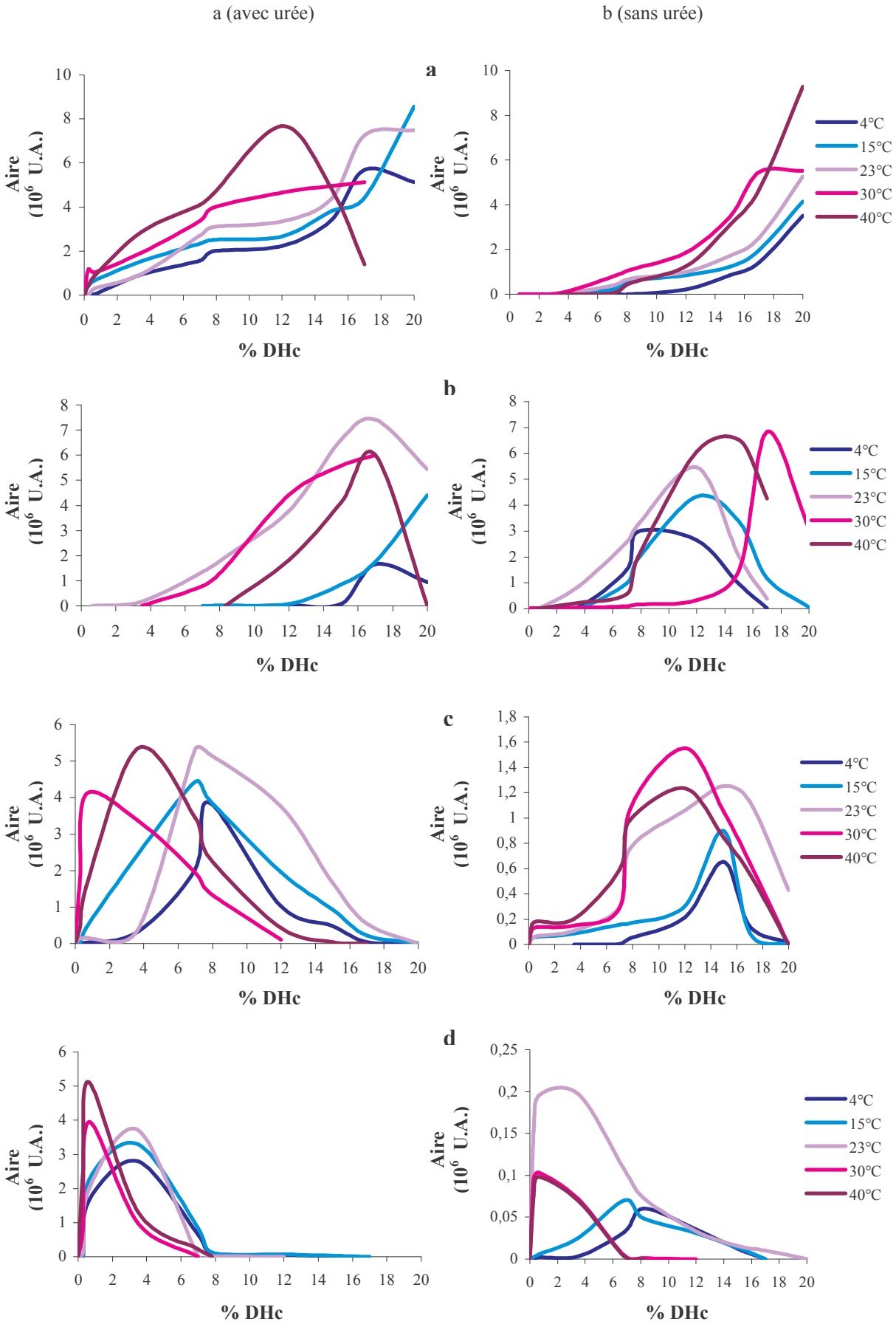


Figure 16. *Evolution des peptides antimicrobiens en fonction de la température et du degré d'hydrolyse. a : peptide α 137–141, b : peptide α 1–23, c : peptide β 126–145, et d : peptide α 107–136.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

De façon générale en présence d'urée (Figure 16a), l'augmentation de la température favorise l'obtention de concentrations plus élevées en peptides. L'augmentation progressive des concentrations de peptides en fonction de la température, à un même degré d'hydrolyse est toujours valable pour les températures 4°C, 15°C et 23°C. Par contre, à 30°C et à 40°C, un décalage des optima des concentrations vers des degrés d'hydrolyse plus faible est observé, ce qui montre une vitesse de catalyse plus élevée. Un autre effet est décelable en ce qui concerne le peptide α 137-141 plus connu sous l'appellation néokyotorphine. A 23°C (température de référence) c'est un peptide final qui s'accumule au fur et à mesure de l'avancée de l'hydrolyse que ce soit en conditions natives ou dénaturantes (Lignot *et al.*, 1999). Par contre, à 40°C et en présence d'urée, elle devient un peptide intermédiaire : sa concentration augmente jusqu'à un optimum, puis elle décroît avec l'augmentation du degré d'hydrolyse.

L'hydrolyse de l'hémoglobine en conditions natives et à 23°C, se fait selon un mécanisme du type « one by one » (Linderstrom-Lang, 1952). L'augmentation ou la diminution de la température d'incubation n'a pas entraîné de changement de mécanisme d'hydrolyse. L'incubation à 30°C et 40°C ne permet pas de dénaturer l'hémoglobine bovine qui reste dans une conformation native. Seule la concentration des peptides a été modifiée selon la température d'incubation : à basse température (4°C et 15°C) les concentrations des peptides antimicrobiens sont plus faibles. Le fait d'augmenter la température d'incubation, permet d'augmenter les concentrations des peptides antimicrobiens. En conditions dénaturantes, la pepsine hydrolyse l'hémoglobine bovine selon un mécanisme du type « zipper ». Ce mécanisme d'hydrolyse a été conservé quelque soit la température d'incubation testée. Comme pour l'hydrolyse en conditions natives, la température ne change que la concentration des peptides antimicrobiens: lorsque l'hydrolyse est réalisée à basse température, leur concentration est plus faible, et inversement, une augmentation de la température permet d'augmenter leur concentration.

Le changement de la température d'incubation n'a pas permis de modifier la sélectivité de l'enzyme quelques soient les conditions d'hydrolyse. L'augmentation de la température a donc conduit à l'augmentation de la concentration des peptides actifs. Pour générer un maximum de peptides il faut se placer à une température comprise entre 23°C et 40°C. La présence d'urée permet également d'augmenter ces quantités.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

I.4.3. Etude de l'effet du pH sur la cinétique d'apparition des peptides antimicrobiens

Après l'effet de la température, l'influence du pH dans le milieu réactionnel a été étudiée sur la cinétique d'apparition des peptides antimicrobiens au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine. L'objectif étant d'une part d'améliorer l'obtention de ces peptides antimicrobiens, et d'autre part, de trouver un pH permettant d'éviter l'urée.

L'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine 1 % (p/v) a été menée à 23°C, en présence puis en l'absence d'urée, avec un rapport E/S de 1/11 (mole/mole), dans un tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1 M. Trois pH ont été testés : 3,5, 4,5, et 5,5. Des prélèvements à des temps réguliers ont été effectués, et la réaction a été stoppée en amenant le pH à 10 avec une solution d'arrêt (Tampon Borax 0,32 M pH 12,3). Chaque prélèvement de la cinétique a ensuite été fractionné par CLHP en phase inverse sur une colonne C_4 à l'échelle analytique. L'effet du pH, a été étudié sur les cinétiques d'apparition des peptides antimicrobiens, correspondant aux peptides α 137-141, α 133-141, α 1-23, β 126-145, α 107-136, et α 107-141. Les cinétiques d'hydrolyse menées à pH 4,5 ont servi de référence.

L'étude des cinétiques d'hydrolyse de l'hémoglobine menées à différents pH a montré qu'en conditions dénaturantes, l'hydrolyse de l'hémoglobine se fait selon un mécanisme du type « zipper » aussi bien à pH 3,5 qu'à pH 4,5 ou 5,5 (Profils CLHP non présentés). En conditions natives, un mécanisme du type « one by one » est observé lors de l'hydrolyse à pH 4,5 et 5,5. Par contre à pH 3,5, un mécanisme du type « zipper » est obtenu comme lors des hydrolyses en conditions dénaturantes (Profils CLHP non présentés). Le mécanisme zipper observé pour l'hémoglobine en l'absence d'urée à pH 3,5 peut s'expliquer par le fait qu'à pH 3,5 nous sommes en conditions dénaturantes, l'hémoglobine est donc plus accessible pour la pepsine, qui se rapproche de son pH optimal.

Les figures 17 et 18 montrent l'évolution de chaque peptide antimicrobien en fonction du degré d'hydrolyse et du pH d'incubation. En absence d'urée (Figures 17b et 18b), lorsque le pH décroît une augmentation de la concentration de ces peptides est observée. L'augmentation des concentrations des peptides α 133–141, α 1–23, α 107–136, α 107–141, et β 126–145 est optimale à pH 3,5. Ce sont des peptides intermédiaires qui sont très rapidement hydrolysés, ce qui explique leur absence aux pH 4,5 et 5,5, où un mécanisme « one by one » est observé. Le pH 3,5 a un effet spectaculaire sur l'obtention de ces peptides

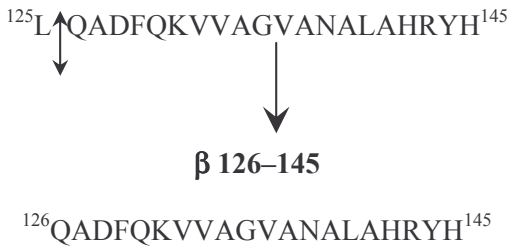
© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

antimicrobiens, qui sont invisibles à pH 5,5. Ceci peut s'expliquer par la dénaturation de l'hémoglobine à pH 3,5 permettant l'obtention d'un mécanisme de type « zipper ».

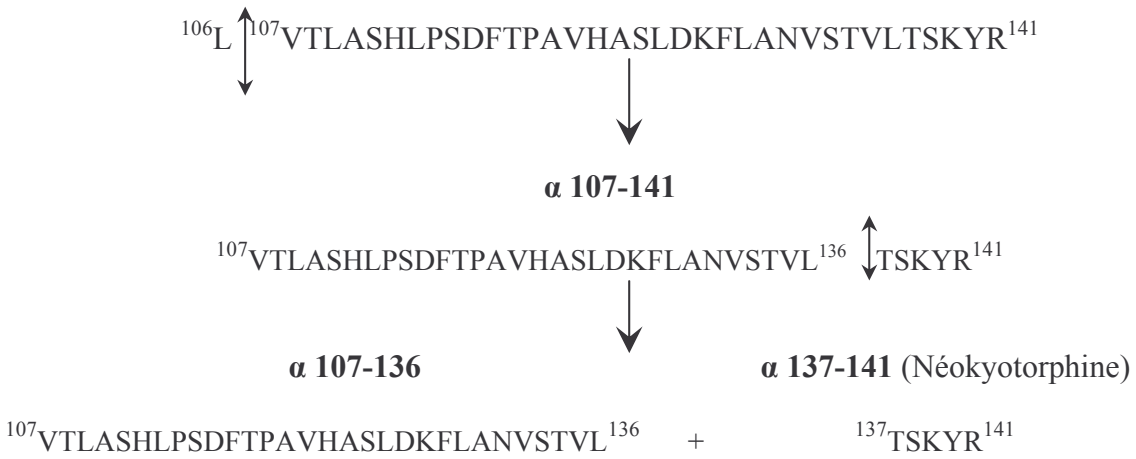
En présence d'urée (Figures 17a et 18a), le pH a un effet important sur l'accumulation de ces peptides comparée à leur quantité obtenue en absence d'urée. En étudiant les cinétiques d'apparition des peptides antimicrobiens, deux phénomènes sont observés. Le premier résulte en une augmentation de la concentration des peptides α 1–23 et α 133–141, à pH 3,5 et pH 4,5 respectivement. Le deuxième correspond à une augmentation de l'optimum de concentration des peptides : α 137–141, β 126–145, α 107–136, et α 107–141 à pH 5,5.

En observant la localisation du site de coupure de la pepsine à pH 5,5 pour ces quatre peptides, le clivage de la liaison peptidique s'effectue toujours en $C_{terminale}$ d'une Leucine :

Pour le peptide β 126–145 :



Et pour les peptides α 137–141, α 107–136, et α 107–136 :



© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

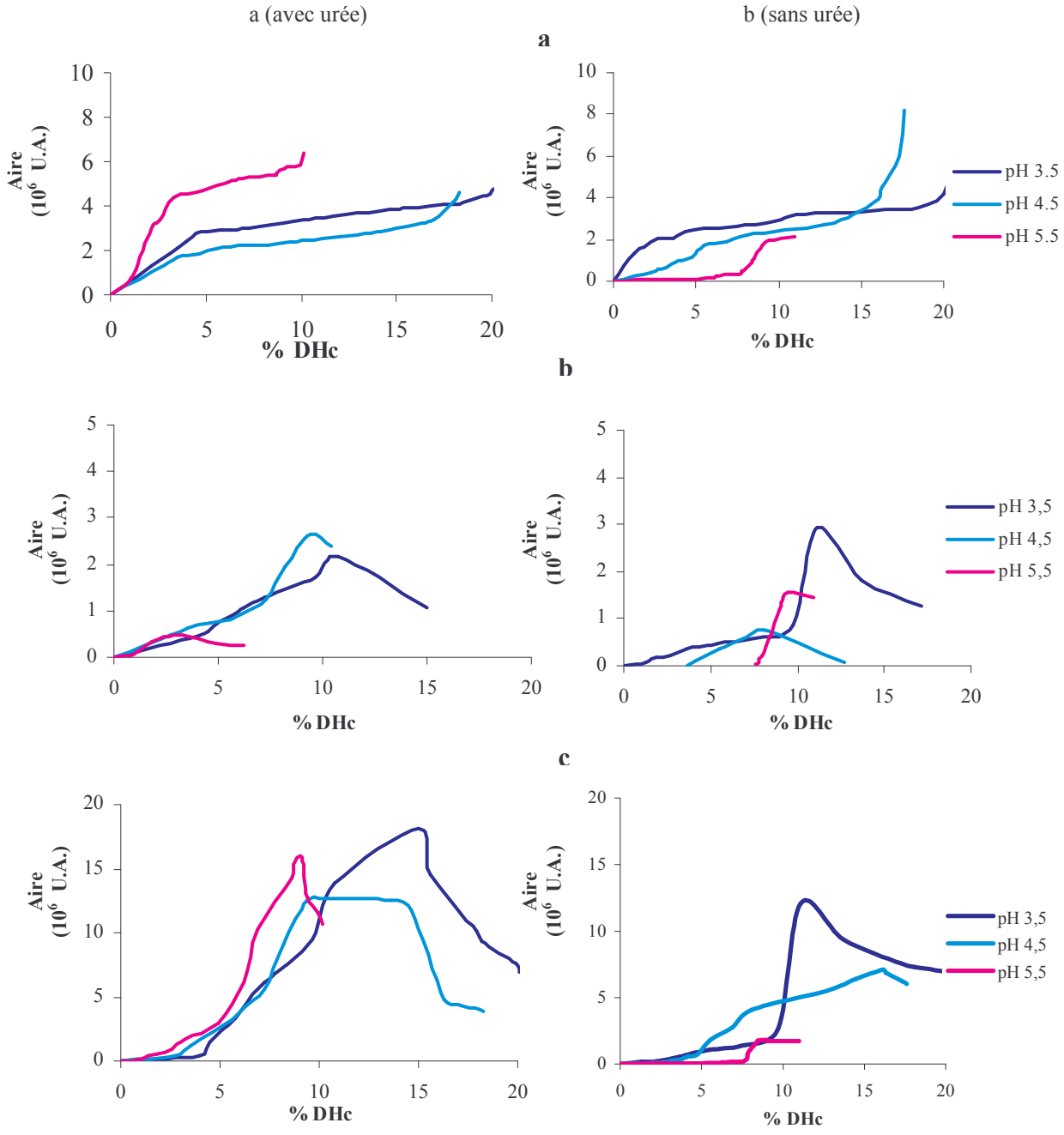


Figure 17. *Evolution des peptides antimicrobiens en fonction du pH et du degré d'hydrolyse. a : peptide α 137–141, b : peptide α 133–141, et c : peptide α 1–23.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

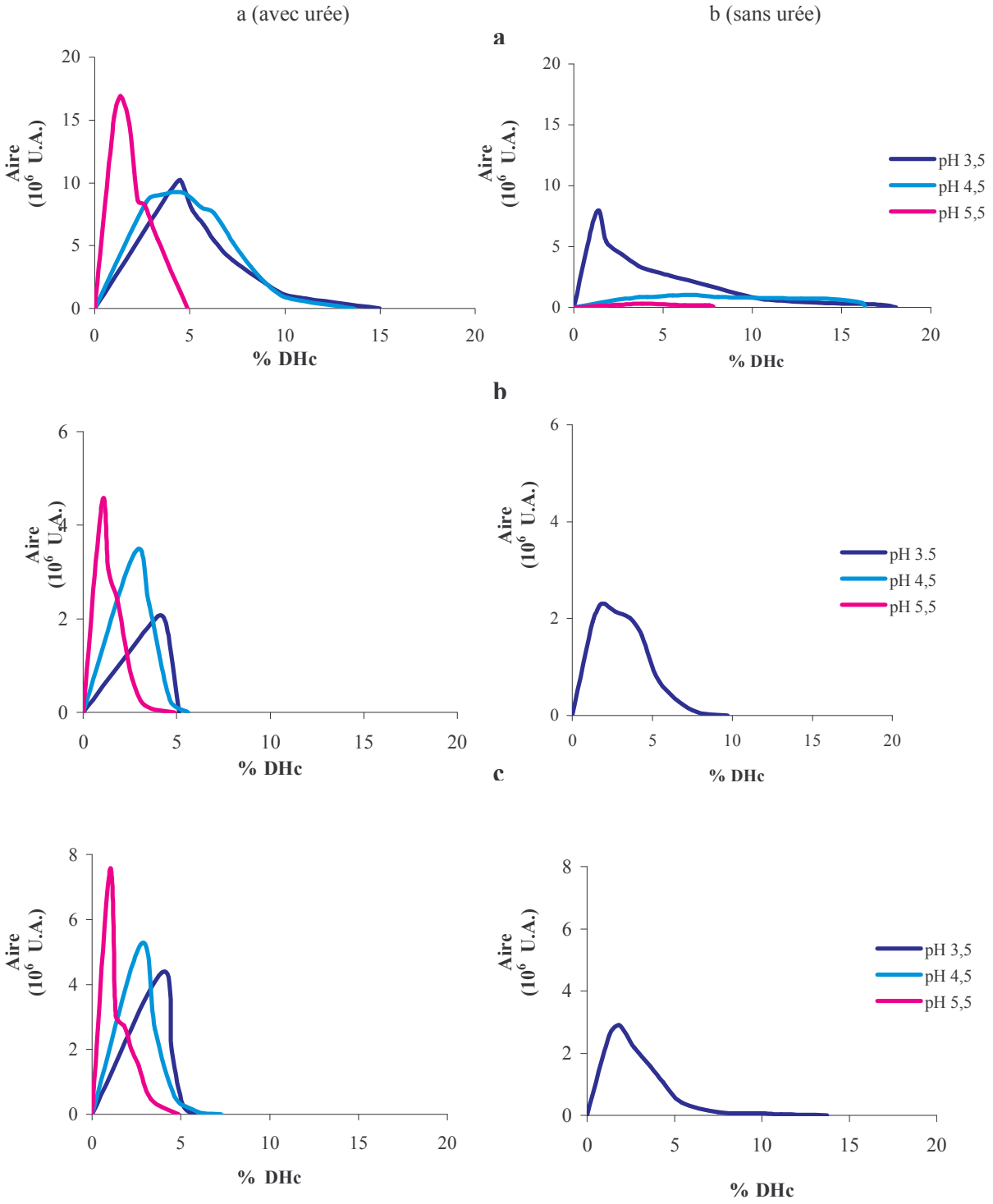


Figure 18. *Evolution des peptides antimicrobiens en fonction du pH et du degré d'hydrolyse. a : peptide β 126–145, b : peptide α 107–136, et c : peptide α 107–141.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Le pH 5,5 joue donc un rôle important en ce qui concerne l'accessibilité de certaines liaisons vis à vis de la pepsine. En se plaçant à un pH donné, certains peptides peuvent ainsi être favorisés. Nous avons observé un effet similaire du pH 5,5 sur la cinétique d'apparition d'un peptide opioïde : la VVH 7 (Dubois *et al.,* 2005). Contrairement aux hydrolyses en conditions natives, le pH 3,5 ne permet pas une augmentation significative de la concentration des peptides par rapport au pH 4,5 pris comme référence.

Le pH joue un rôle très important au niveau de la catalyse : il a un rôle en ce qui concerne la vitesse de catalyse, car les optimums des concentrations en peptides ne sont plus les mêmes en fonction du pH, pour le même degré d'hydrolyse. Ce qui montre un changement de sélectivité de l'enzyme. Enfin, il joue un rôle au niveau de l'accessibilité de certains sites de coupure, permettant de favoriser ou non un peptide par rapport aux autres. En présence d'urée, le pH 3,5 permet de favoriser le peptide α 1–23, le peptide α 133–141 est favorisé à pH 4,5 et le pH 5,5 favorise les peptides β 126–145, α 107–141, α 107–136 et α 137–141. En absence d'urée, à pH 3,5 un effet spectaculaire sur l'obtention de tous ces peptides actifs est observé. Grâce au changement de mécanisme (« zipper »), la quantité de peptides antimicrobiens (β 126–145, α 107–141, α 107–136 et α 133–141) a pu être augmentée. Ceux-ci n'étaient pas présents (ou très peu), lors de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine à 1 % (p/v) en absence d'urée à pH 4,5.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

L'étude de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine a permis de mettre en évidence quinze fractions peptidiques possédant une activité antimicrobienne vis-à-vis de quatre souches bactériennes *Micrococcus luteus* A270, *Listeria innocua*, *Escherichia coli* et *Salmonella enteritidis*. A partir de ces quinze fractions, il a été possible d'obtenir cinq peptides purs en grande quantité, correspondant aux peptides : α 137-141, α 133-141, β 126-145, α 107–136, et α 107–141. La CMI et le mode d'action de ces peptides ont pu être définis sur les quatre souches cibles. Après plusieurs étapes de purifications supplémentaires sur les autres fractions actives contenant plusieurs peptides, il a été possible d'identifier vingt peptides antimicrobiens.

L'étude de l'effet de la température menée sur la cinétique d'apparition des peptides antimicrobiens, a montré que le changement de température a une importance au niveau des optimums des concentrations en peptides qui ne sont plus les mêmes en fonction du degré d'hydrolyse. En conditions natives, il faut se placer à 30°C ou 40°C afin de générer une quantité optimale de peptides. Le mécanisme « One by One » a été conservé quelque soit la température d'hydrolyse. En présence d'urée, c'est à 23°C ou 40°C que les meilleurs résultats sont obtenus.

Enfin, l'hydrolyse de l'hémoglobine menée à différents pH, a montré que le changement de pH, influençait la vitesse de catalyse (± rapide), et que certaines liaisons devenaient plus accessibles à la pepsine, en particulier pour la coupure en C terminal d'une Leucine. En absence d'urée, le pH 3,5 permet le passage d'un mécanisme « one by one » à un mécanisme « zipper », ce qui permet d'augmenter la quantité de ces peptides et d'observer l'apparition de peptides intermédiaires absents à pH 4,5 et 5,5. En présence d'urée, le choix du pH va dépendre du peptide antimicrobien visé. Mais c'est en se plaçant à pH 5,5, que le nombre de peptides antimicrobiens favorisés, est le plus important. Le pH 5,5 permet à la pepsine d'accéder plus aisément à certaines liaisons en particulier en $C_{terminal}$ de la Leucine, et donc de favoriser l'apparition des peptides antimicrobiens issus de ce clivage et d'augmenter ainsi la quantité de ces peptides obtenus.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Une partie des résultats obtenus dans cette étude, a fait l'objet de trois publications et d'un poster :

Dubois V, Nedjar-Arroume N and Guillochon D.
pH influence on the appearance of active peptides in the course of peptic hydrolysis of bovine haemoglobin.
Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2005, vol. 35 (2), p. 85-102.

Daoud R, **Dubois V**, Bors-Dodita L, Nedjar-Arroume N, Krier F, Chihib N-E, Mary P, Kouach M, Briand G, and Guillochon D.
New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin.
Peptides, 2005, vol. 26 (5), p. 713-719.

Nedjar-Arroume N, **Dubois-Delval V**, Miloudi K, Daoud R, Krier F, Kouach M, Briand G, and Guillochon D.
Isolation and Characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin.
Peptides, 2006, article in press.

Delval Dubois V, Nedjar-Arroume N, Krier F, Chihib N-E, Mary P, Kouach M, Briand G, et Guillochon D.
Obtention du peptide antimicrobien α 107-136 à partir de l'hémoglobine bovine.
Poster, XIème CNRIUT, Colloque National de la recherche dans les IUT. Rouen, Mai 2005.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

CHAPITRE II

MISE EN EVIDENCE DE PEPTIDES ANTIMICROBIENS A PARTIR DE L'HYDROLYSE CHYMOTRYPSIQUE DE L'α–LACTALBUMINE

© 2006 Tous droits réservés.

http://www.univ-lille1.fr/bustl

II. Mise en évidence de peptides antimicrobiens à partir de l'hydrolyse chymotrypsique de l'α-Lactalbumine

L'α-Lactalbumine (α-Lac), petite protéine globulaire du lactosérum de 14,2 kDa, forme avec la galactosyltransférase, la lactose synthétase. Elle est constituée d'une chaîne peptidique contenant quatre ponts disulfures (Permyakov *et al.*, 2000). Comme l'hémoglobine bovine, l'hydrolyse par voie enzymatique de l'α-Lactalbumine génère des peptides présentant des activités biologiques telles que : opioïde (Chiba et Yoshikawa, 1986), inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (Pihlanto-Leppälä *et al.,* 1998 et 2000), immunomodulatrice (Kayser et Meisel, 1996 et Meisel, 1997), anti-alopécie (Tsuriki et Yoshikawa, 2005) et antimicrobienne (Pellegrini *et al.*, 1999).

Seuls trois peptides antimicrobiens ont pu être mis en évidence et isolés à partir de l'hydrolyse de l'α-Lactalbumine par Pellegrini *et al.,* en 1999. Parmi ces trois peptides antimicrobiens, deux d'entre eux ont été obtenus par hydrolyse trypsique et un seul par hydrolyse chymotrypsique. Ce peptide est constitué de deux fragments peptidiques reliés par un pont disulfure dont la séquence correspond au fragment 61-68/75-80. La recherche de nouveaux peptides antimicrobiens issus de l'α-Lactalbumine possédant une structure différente de celle des peptides antimicrobiens issus de l'hémoglobine bovine semble donc intéressante.

L'objectif de cette étude était d'une part de mettre au point une cinétique d'hydrolyse de l'α-Lactalbumine par l'α chymotrypsine, permettant l'obtention d'activités antimicrobiennes et d'autre part d'étudier la population peptidique au cours de cette cinétique d'hydrolyse afin d'isoler et d'identifier de nouveaux peptides antimicrobiens. La première étape de ce travail a consisté à mettre au point les conditions d'hydrolyse, puis d'étudier différentes cinétiques d'hydrolyse. Dans un second temps, l'identification et l'évolution de la population peptidique au cours de la cinétique d'hydrolyse ont été établies. Enfin la mise en évidence d'activités antimicrobiennes au sein de sa cinétique d'hydrolyse a été abordée dans une troisième et dernière partie.

Le choix de l'enzyme a été basé sur les travaux de Pellegrini *et al.,* (1999). L'utilisation de la pepsine n'a pas été possible comme pour l'hémoglobine, puisque aucun peptide antimicrobien ne fut découvert lors de l'hydrolyse de l'α-Lactalbumine. Par contre deux enzymes ont permis l'obtention de peptides antimicrobiens, la trypsine et l'α

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

chymotrypsine. La trypsine est connue pour couper en $C_{terminal}$ d'une Lysine ou d'une Arginine tandis que la chymotrypsine coupe préférentiellement en $C_{terminal}$ d'un Tryptophane, d'une Tyrosine ou d'une Phénylalanine. L'α-Lactalbumine possède dans sa séquence en acides aminés, une Arginine et onze Lysines plutôt localisés en $N_{terminal}$ et $C_{terminal}$ de la protéine. Elle contient également quatre Tyrosines, quatre Tryptophanes et quatre Phénylalanines répartis régulièrement sur la séquence de la protéine (Brew *et al.*, 1970 bet Shewale *et al.*, 1984). L'utilisation de la chymotrypsine semble donc plus appropriée pour générer un maximum de peptides pendant la cinétique d'hydrolyse de l'α-Lactalbumine.

II.1. Mise au point des conditions d'hydrolyse de l'α-Lactalbumine par l'α chymotrypsine

La mise au point de l'hydrolyse de l'α-Lactalbumine par la chymotrypsine passe par plusieurs étapes : le milieu réactionnel (pH et température d'incubation), l'arrêt de la réaction, le rapport enzyme/substrat, et la conformation de l'α-Lactalbumine.

L'α-Lactalbumine en présence de calcium, adopte une conformation compacte et stable appelée holoforme. En l'absence de calcium, elle se trouve dans une conformation nommée apoforme, plus sensible à la dénaturation (Chrysina *et al.*, 2000). Dans la littérature (Pellegrini *et al.*, 1999, Wehbi *et al.*, 2006, et Polverino de Laureto *et al.*, 1999), l'hydrolyse de l'α-Lactalbumine se fait autant sur l'apoforme que sur l'holoforme. Le rapport enzyme sur substrat (E/S), le milieu réactionnel, ainsi que la température d'incubation sont très variables. Les travaux effectués par Pellegrini *et al.,* (1999) et Polverino de Laureto *et al.,* (1999) ont été utilisés pour déterminer les conditions d'hydrolyse de l'α-Lactalbumine.

L'hydrolyse est effectuée en conditions non réductrices et non dénaturantes, afin de conserver les ponts disulfures présents dans l'α-Lactalbumine. Pellegrini *et al.,* (1999) ont montré que la réduction des ponts disulfures présents dans les peptides antimicrobiens, entraînaient une perte d'activité totale.

L'hydrolyse de l'α-Lactalbumine a été menée à pH neutre comme celles de Pellegrini *et al.,* (1999) et de Polverino de Laureto *et al.,* (1999) qui ont travaillé respectivement dans du tampon TRA (triethanolaminehydrochloride) 200 mM + $CaCl_2$ 20 mM, pH 7,8 et dans du tampon Tris-HCl 50 mM + 10 mM EDTA pH 8,3, correspondant au pH optimum de l'α chymotrypsine (Stoesz et Lumry, 1978).

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

II.1.1. Détermination du rapport enzyme sur substrat

La détermination du rapport enzyme sur substrat (E/S) a été déterminée sur l'apoforme de l'α-Lactalbumine à 37°C dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4 pendant une durée de 24H. Différents rapports E/S (mole/mole) ont été testés : 1/10, 1/20, 1/50, 1/100, 1/250, 1/500, 1/750, et 1/1000.

L'ensemble des hydrolyses a été analysé par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (CLHP). Pour cela, une mise au point des conditions d'analyse a été nécessaire. La séparation des hydrolysats a été faite sur une colonne C_4 de 0,32×25cm réglée à un débit de 0,6 mL/min. Un gradient d'élution a été établi avec un éluant A composé d'eau milliQ et d'acide trifluoroacétique (TFA) (100/0,5 v/v) et un éluant B composé d'acétonitrile et de TFA (100/0,5 v/v). L'application du gradient se fait en passant de 0 à 100 % de B en 60 minutes.

Les premières analyses par CLHP ont été faîtes sur l'α-Lactalbumine et l'α chymotrypsine, afin de déterminer leur temps de rétention et d'observer leur comportement par rapport au gradient d'élution appliqué. La figure 1 montre que l'α-Lactalbumine est éluée au bout de 36 minutes correspondant à 60% du mélange acétonitrile/TFA (100/0,5 v/v). L'α chymotrypsine est éluée après l'α-Lactalbumine, elle sort à 37 minutes. Ces deux chromatogrammes ont servi de témoins, afin d'identifier la présence des deux protéines sur les profils CLHP des différentes cinétiques d'hydrolyses réalisées.

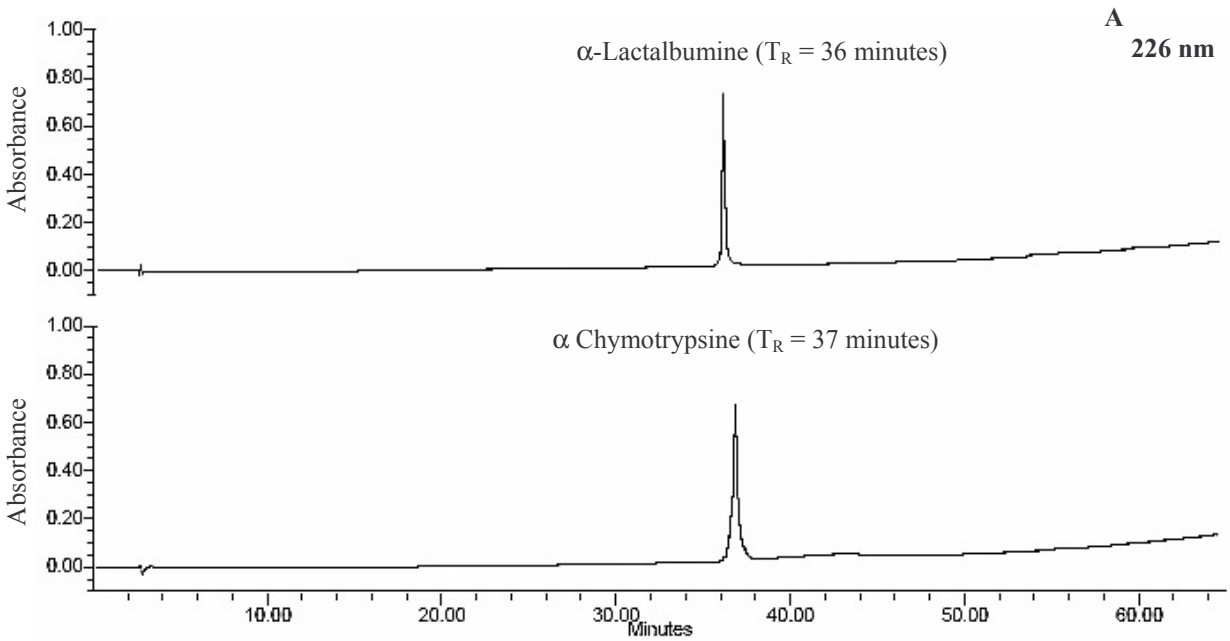


Figure 1. *Profil CLHP de l'α-Lactalbumine (a) et l'α chymotrypsine (b).*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

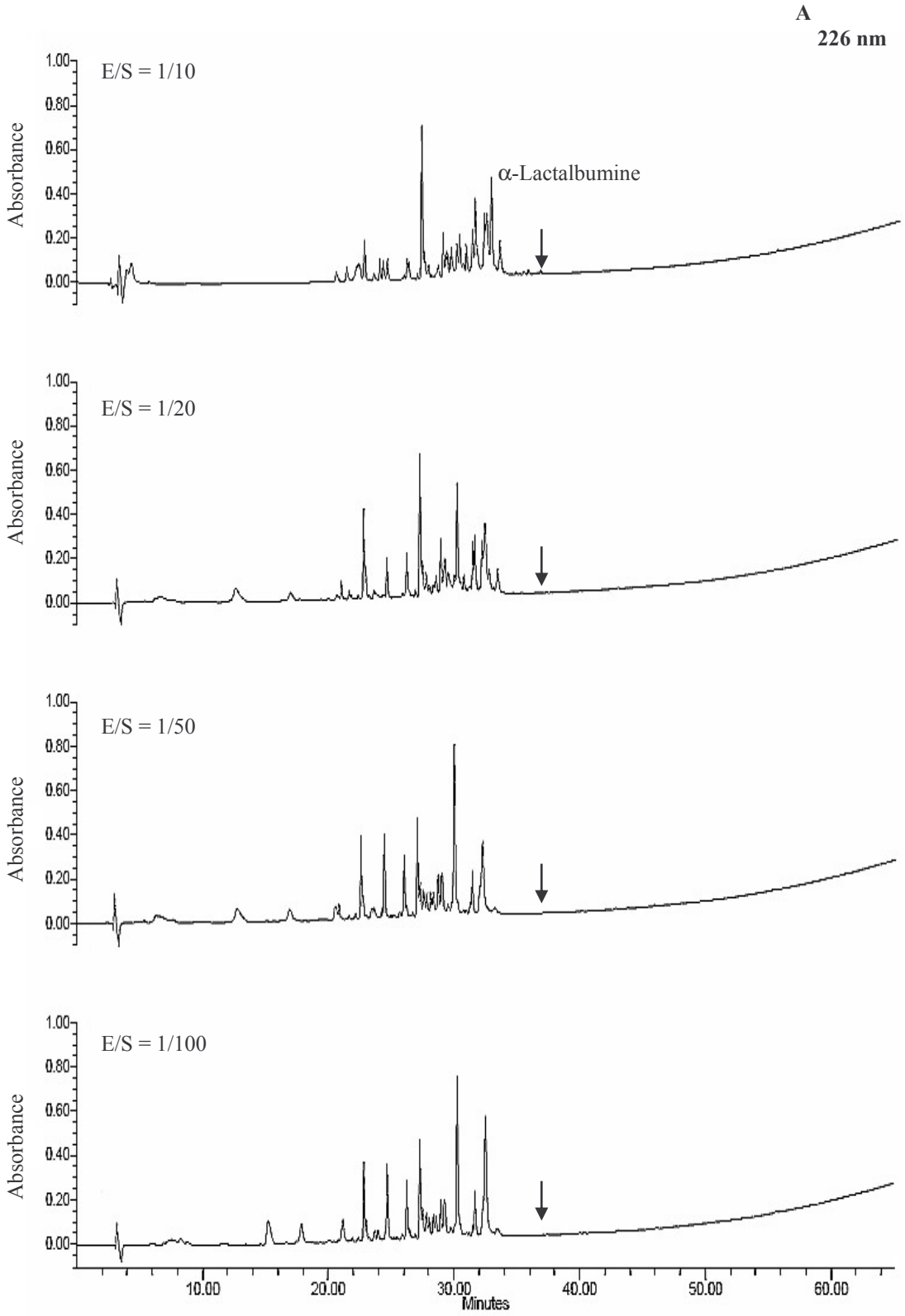
La figure 2 montre les chromatogrammes obtenus pour les différents rapports E/S. Après 24H d'hydrolyse, l'α-Lactalbumine est encore présente pour les rapports de 1/750 et 1/1000, par comparaison avec le chromatogramme témoin. Elle apparaît sous forme de traces pour les rapports 1/250 et 1/500. A partir du rapport 1/100, l'α-Lactalbumine est totalement absente du chromatogramme ce qui montre une hydrolyse totale de l'α-Lactalbumine. Par contre dans ces conditions d'hydrolyse, l'α chymotrypsine n'est pas détectée. Les cinétiques d'hydrolyse de l'α-Lactalbumine ont été réalisées avec le rapport E/S de 1/100 (mole/mole), permettant l'obtention d'une hydrolyse finale en 24H.

II.1.2. L'arrêt de la réaction

L'α chymotrypsine est connue pour exister sous deux conformations : l'une étant active et l'autre inactive, dont les proportions dépendent des conditions du milieu réactionnel, et en particulier du pH (Stoesz et Lumry, 1978). Possédant une activité maximale à pH neutre, il faut se placer à des pH extrêmes pour l'inactiver, c'est-à-dire un pH inférieur à 3 ou supérieur à 10. D'après les travaux de Pellegrini *et al.,* (1999), et de Polverino de Laureto *et al.,* (1999) l'activité de l'α chymotrypsine est stoppée par acidification du milieu par ajout de TFA. L'arrêt de la réaction a été fait par un changement du pH dans le milieu réactionnel, en pratiquant une acidification du milieu par l'utilisation de TFA 10%.

Des essais ont été réalisés sur un substrat synthétique de l'α chymotrypsine, le N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide (Suc-AAPF-pNA Sigma S-7388), afin de vérifier l'activité de l'α chymotrypsine. La variation de densité optique lors de la libération du para-nitroanilide dans le milieu réactionnel à une longueur d'onde de 410 nm, permet le suivi de l'activité enzymatique (Nakajima *et al*., 1979). Afin de déterminer le pH permettant d'inhiber l'activité de l'enzyme, différentes quantités de TFA ont été ajoutées à une solution de Suc-AAPF-pNA 10 mM préparée dans du tampon Tris HCl 0,1 M + NaCl 0,5 M + DMSO 9% pH 7,4. Une mesure du pH est effectuée avant l'ajout de l'α chymotrypsine, ainsi qu'après la réaction. Un test a également été réalisé à pH basique par ajout de soude (NaOH) 5 M. L'activité enzymatique de la chymotrypsine a pu ainsi être suivi sur une gamme de pH comprise entre pH 2,07 et pH 11,41.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl



© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

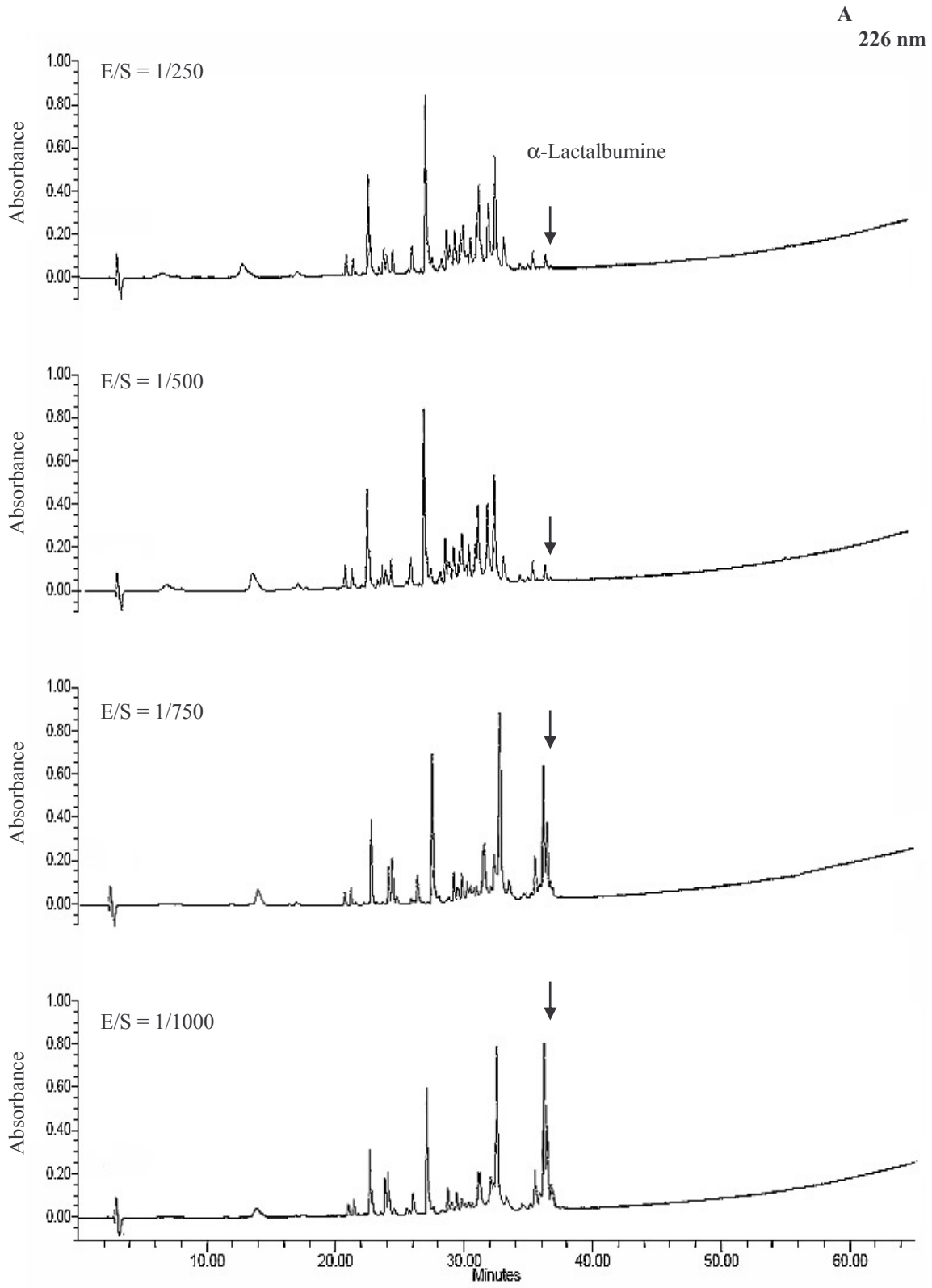


Figure 2. *Profil CLHP de l'hydrolyse de l'α-Lactalbumine menée à différents rapports E/S.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 3. Le dosage d'activité de l'α chymotrypsine, se faisant à pH 7,43, celui-ci a servi de pH de référence. A pH 11,41 l'enzyme est moins active qu'au pH de référence, mais elle n'est pas inactivée. Au fur et à mesure de l'acidification du milieu d'incubation, l'enzyme perd de son activité. A partir de pH 3,33, l'enzyme est inhibée. L'hydrolyse de l'α-Lactalbumine peut donc être arrêtée en amenant le pH d'incubation à une valeur inférieure ou égale à pH 3,33.

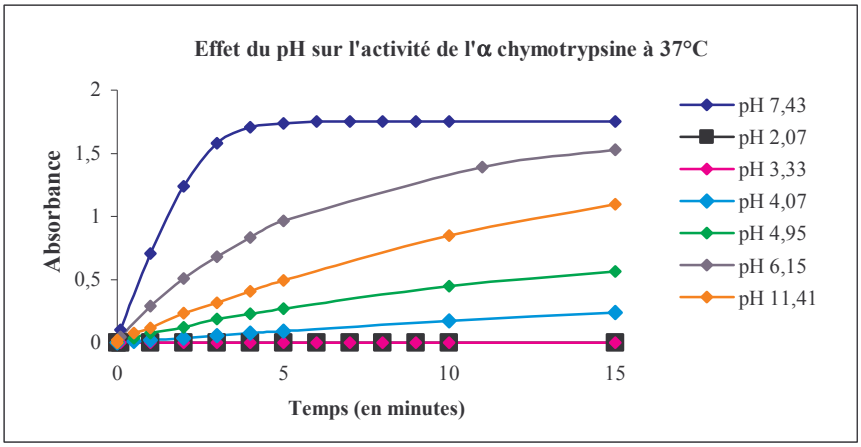


Figure 3. *Représentation graphique de l'effet du pH sur l'activité de l'α chymotrypsine.*

L'arrêt de la réaction a ensuite été étudié sur l'hydrolyse de l'α-Lactalbumine. Pour cela des hydrolyses chymotrypsiques ont été menées sur l'apoforme de l'α-Lactalbumine pendant 24H avec un rapport E/S de 1/100 à 37°C dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4. Différentes quantités de TFA ont été testées pour que le pH du milieu réactionnel soit inférieur à pH 3, puis chaque hydrolysat a été analysé par CLHP pour observer la stabilité des échantillons. L'utilisation de TFA sur les hydrolysats d'α-Lactalbumine a entraîné la formation de précipités. Après centrifugation, le surnageant et le culot, ont été analysés par CLHP (Figure 4). Dans le culot, des peptides sont retrouvés, il y a donc précipitation de certains peptides lors de l'arrêt de l'hydrolyse par du TFA. La perte de peptides, est un inconvénient majeur, pour l'étude de la population peptidique au cours de la cinétique d'hydrolyse, ainsi que pour la découverte de nouveaux peptides antimicrobiens. L'utilisation de TFA a donc été abandonnée.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

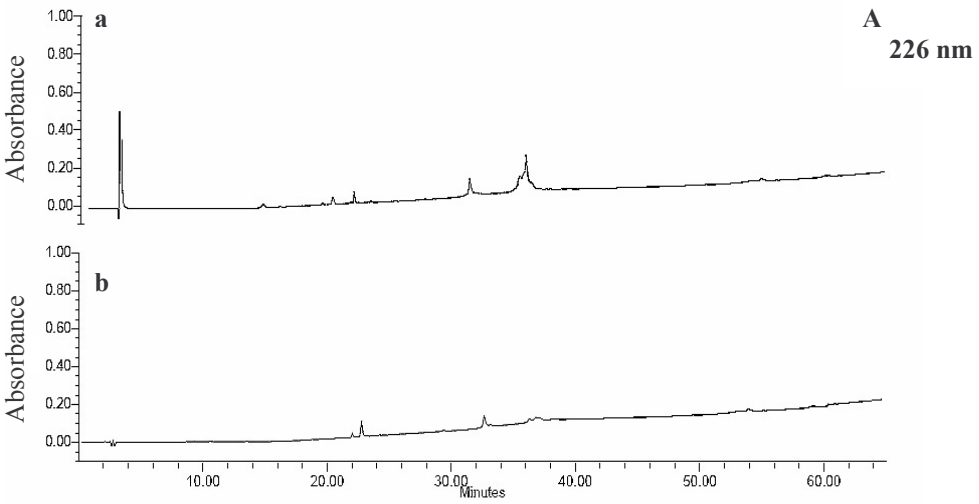


Figure 4. *Profil CLHP de l'hydrolysat d'α-Lactalbumine en présence de TFA. a : surnageant et b : culot.*

L'α chymotrypsine est inhibée à pH acide, des tests ont alors été effectués avec de l'acide chlorhydrique 2 M (pour amener le pH en dessous de 3). L'acide chlorhydrique n'a pas entraîné la formation de précipités au sein des hydrolysats, permettant une analyse par CLHP. Différentes quantités d'acide chlorhydrique 2 M ont été testées afin d'arrêter la réaction enzymatique. Pour 1 mL d'hydrolysat, il faut ajouter 46µL d'acide chlorhydrique 2 M permettant l'obtention d'un pH compris entre 2,5 et 3 unités pH. Afin de vérifier ce résultat, une hydrolyse de 1H a été menée et arrêtée par de l'acide chlorhydrique 2 M. Plusieurs injections de cet hydrolysat par CLHP ont été effectuées afin d'observer sa stabilité (Figure 5).

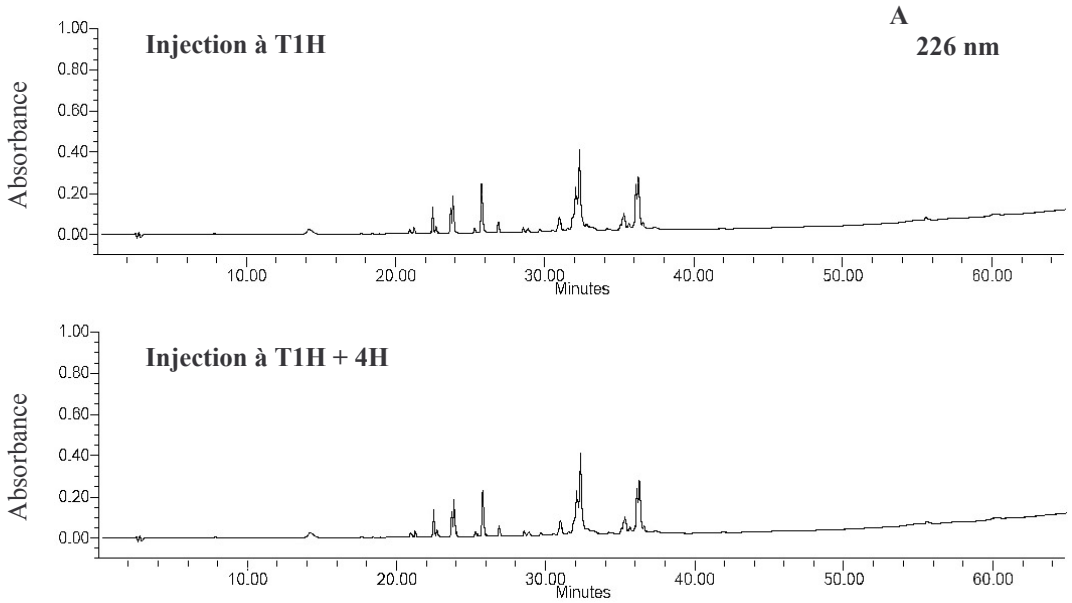


Figure 5. *Profils CLHP d'une hydrolyse de 1H de l'α-Lactalbumine arrêtée par de l'acide chlorhydrique 2 M.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Les profils CLHP de cette hydrolyse de 1H montrent d'une part la stabilité de l'échantillon et d'autre part que la réaction enzymatique est bien arrêtée. L'arrêt de la réaction lors des cinétiques d'hydrolyse de l'α-Lactalbumine a été effectué par ajout d'acide chlorhydrique 2 M.

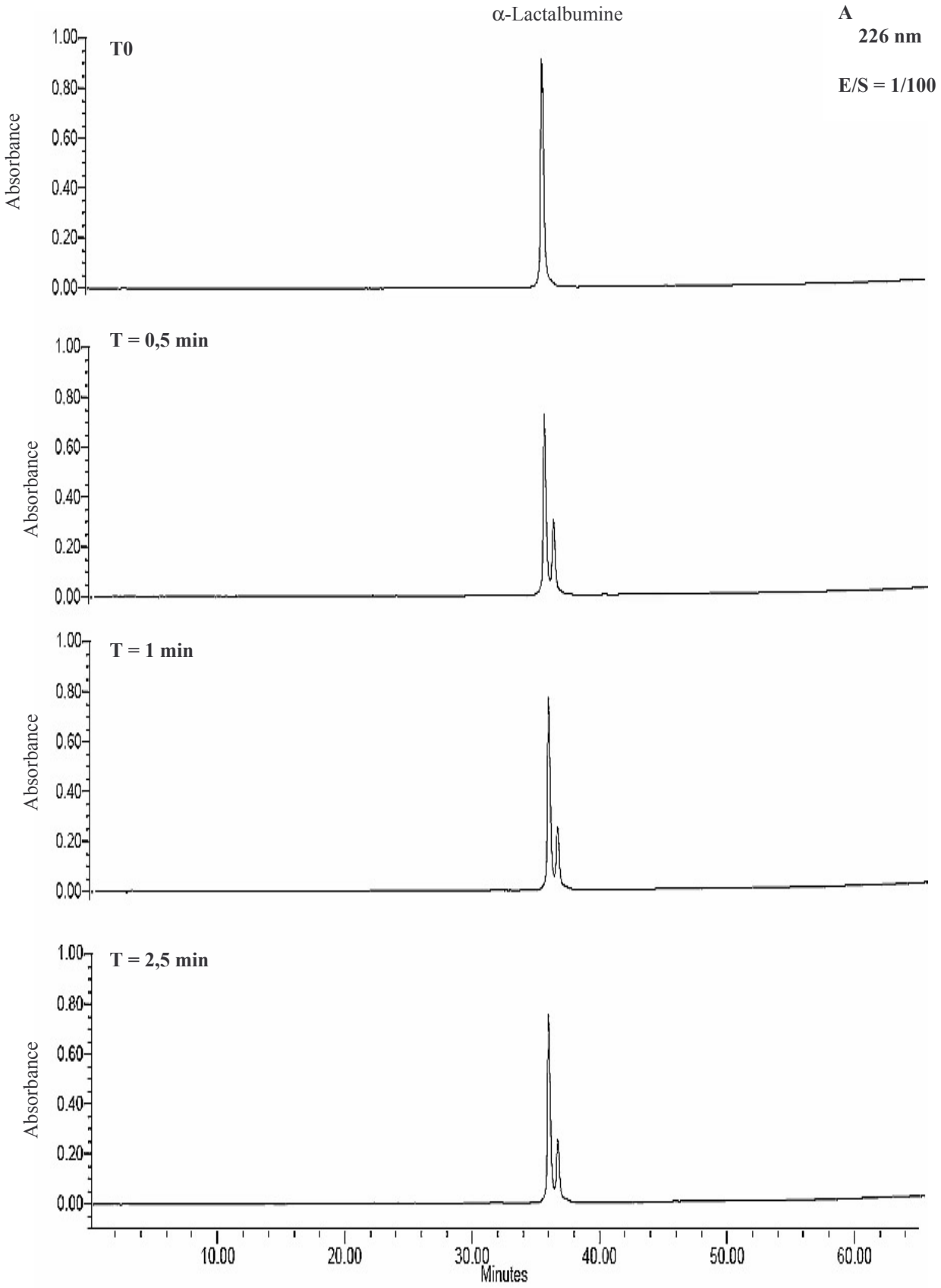
II.2. Etude de cinétiques d'hydrolyse de l'α-Lactalbumine par l'α chymotrypsine

Après l'établissement du rapport E/S et de l'arrêt de la réaction, différentes cinétiques d'hydrolyse ont été réalisées, en faisant varier plusieurs paramètres : la conformation de l'α-Lactalbumine, apoforme ou holoforme, la température d'incubation 25°C ou 37°C, et le milieu d'incubation : tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4 ou tampon TRA 200 mM + $CaCl_2$ 20mM, pH 7,8. Les premières cinétiques ont été effectuées sur l'apoforme de l'α-Lactalbumine dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4, à 25°C (Figure 6) ou à 37°C (Figure 7).

La figure 6 montre que l'hydrolyse de l'apoforme de l'α-Lactalbumine à 25°C, est lente, puisque même à 24H d'hydrolyse l'α-Lactalbumine est encore détectée. A 10 minutes d'hydrolyse les premières fractions peptidiques commencent à apparaître. Après 24H d'hydrolyse, les fractions peptidiques obtenues sont identiques à celles présentes au sein de l'hydrolysat de 10 minutes, elles se sont juste accumulées au cours du temps. Cette accumulation de peptides au cours du temps est caractéristique d'un mécanisme du type « one by one » (Linderstrom-Lang, 1952). L'apoforme de l'α-Lactalbumine à 25°C, est donc directement hydrolysée en peptides finaux, comme l'hémoglobine bovine native à pH 4,5.

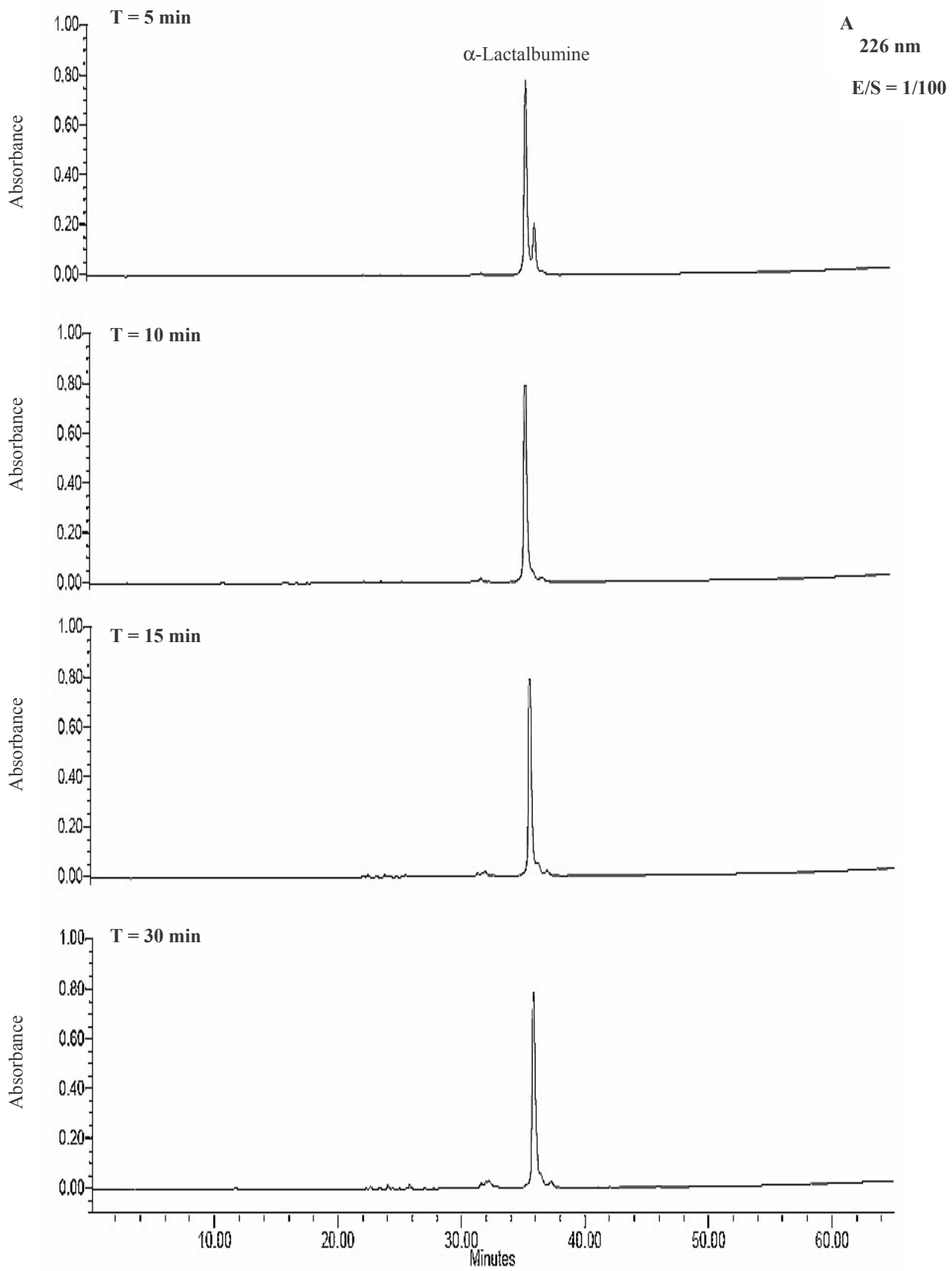
Par contre à 37°C (Figure 7), les premières fractions peptidiques sont détectées après 0,5 minute d'hydrolyse, la catalyse enzymatique est donc beaucoup plus rapide que celle menée à 25°C. En début d'hydrolyse, apparaît vers 31 minutes un massif de peptides qui s'accumule jusque 30 minutes d'hydrolyse. Puis, au fur et à mesure de l'avancée de l'hydrolyse il disparaît, tandis que d'autres fractions apparaissent à des temps d'élution plus petits. Ce profil chromatographique se situe entre un mécanisme du type « one by one » et un mécanisme d'hydrolyse du type « zipper » (Linderstrom-Lang, 1952), qui permet de générer des peptides intermédiaires de grande taille, eux même clivés en peptides de petite taille au cours de l'hydrolyse. Ce mécanisme d'hydrolyse peut donc être considéré comme un mécanisme du type « semi-zipper ».

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl



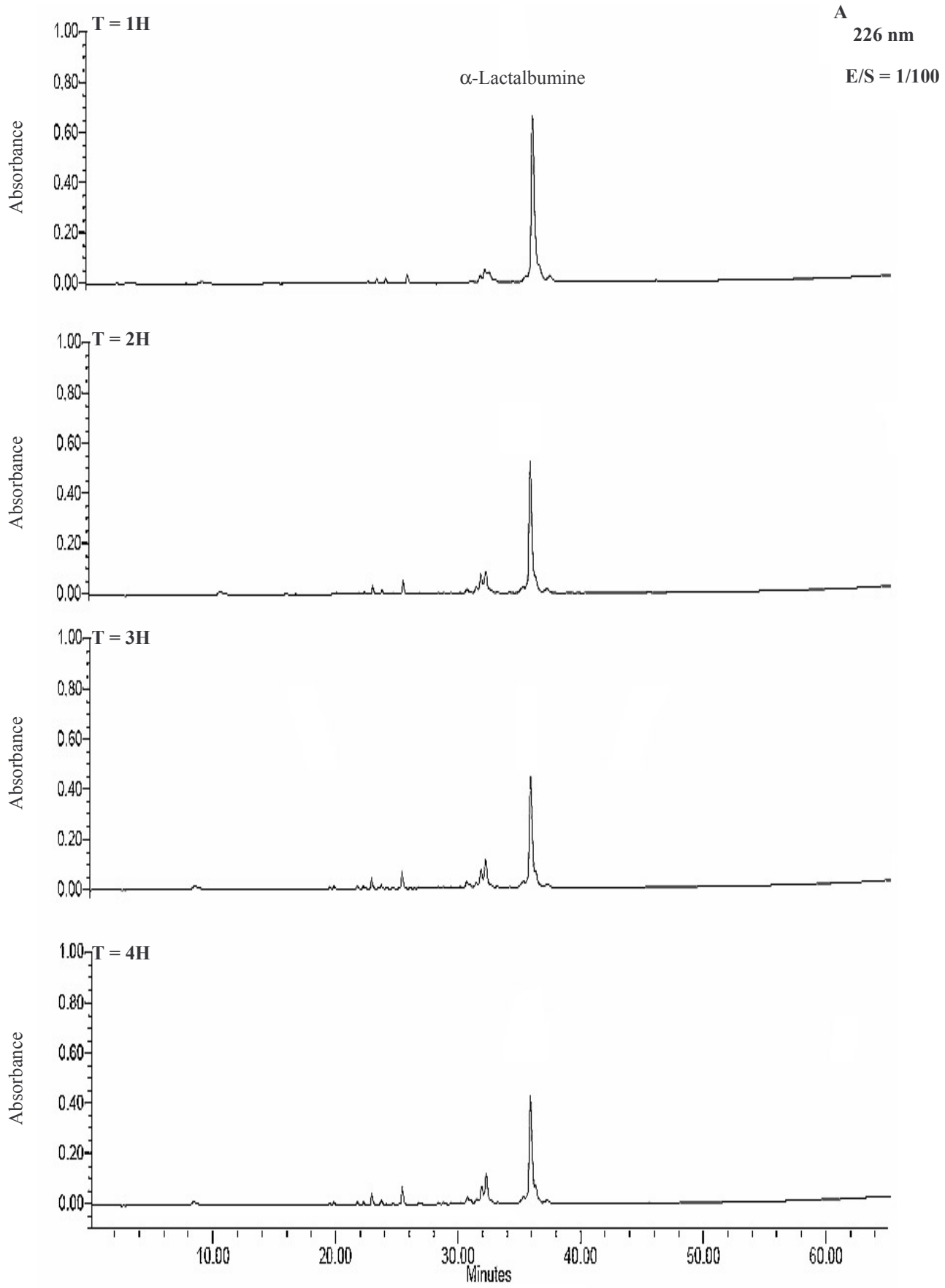
a

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl



b

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl



c

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

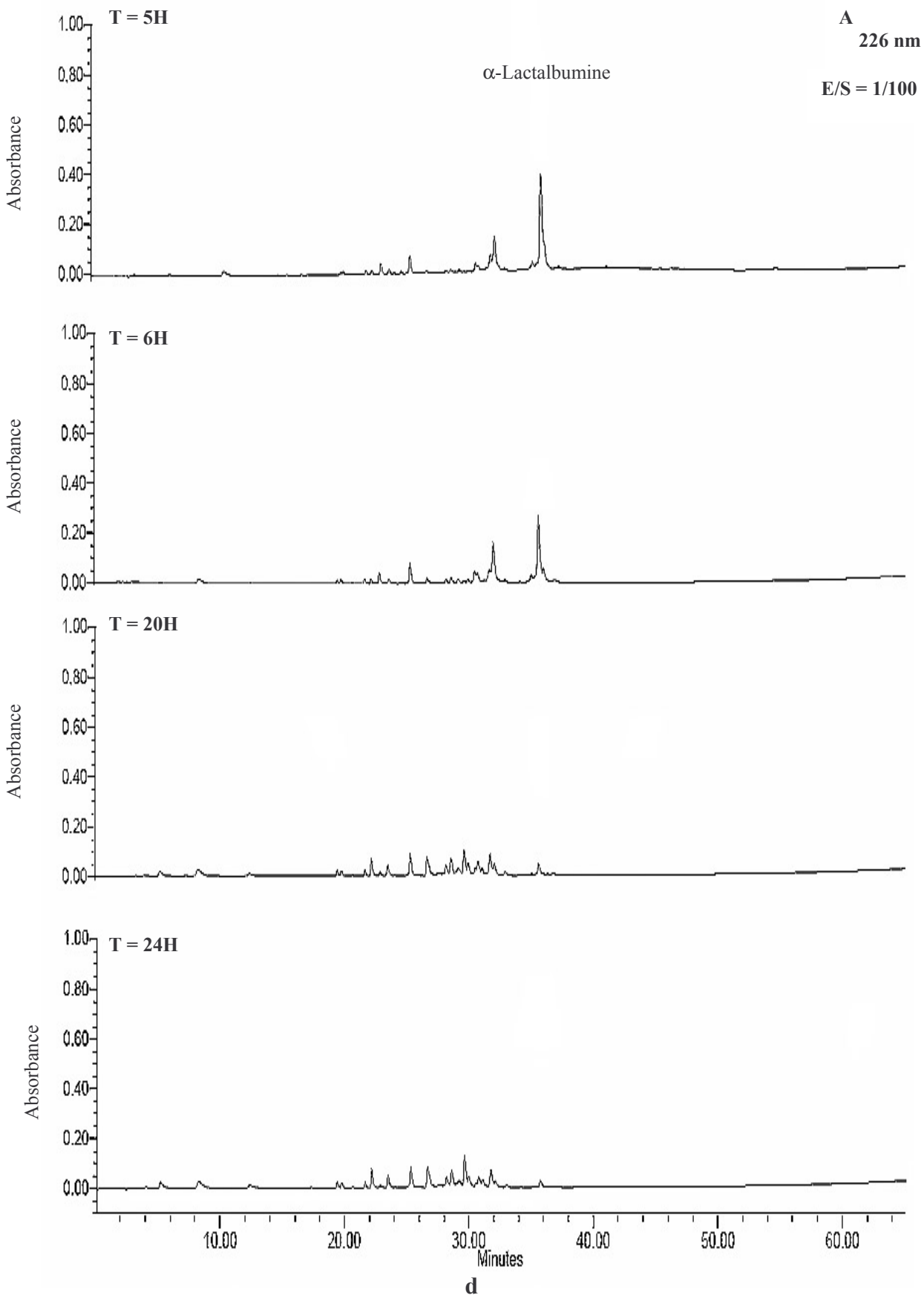
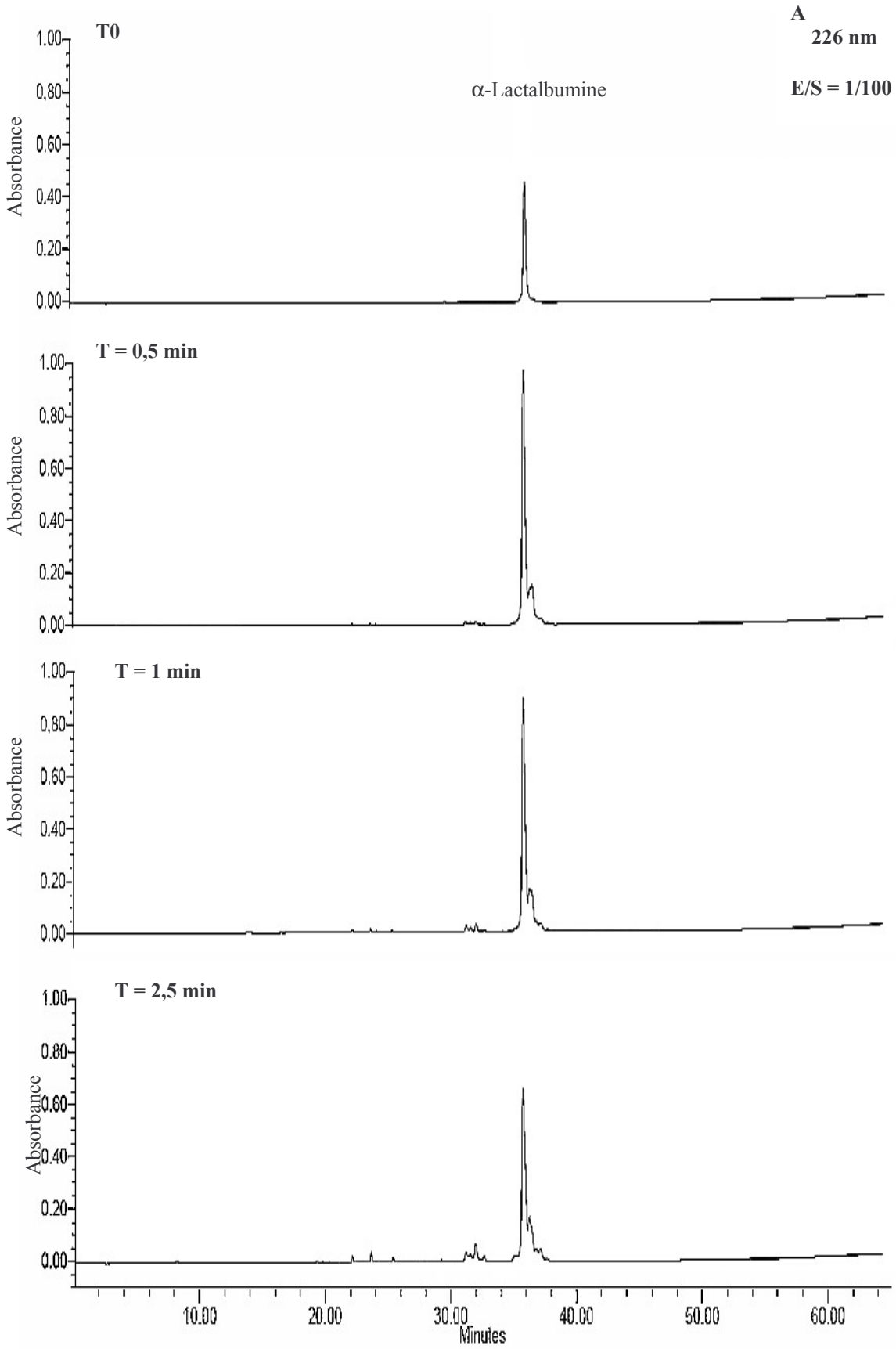


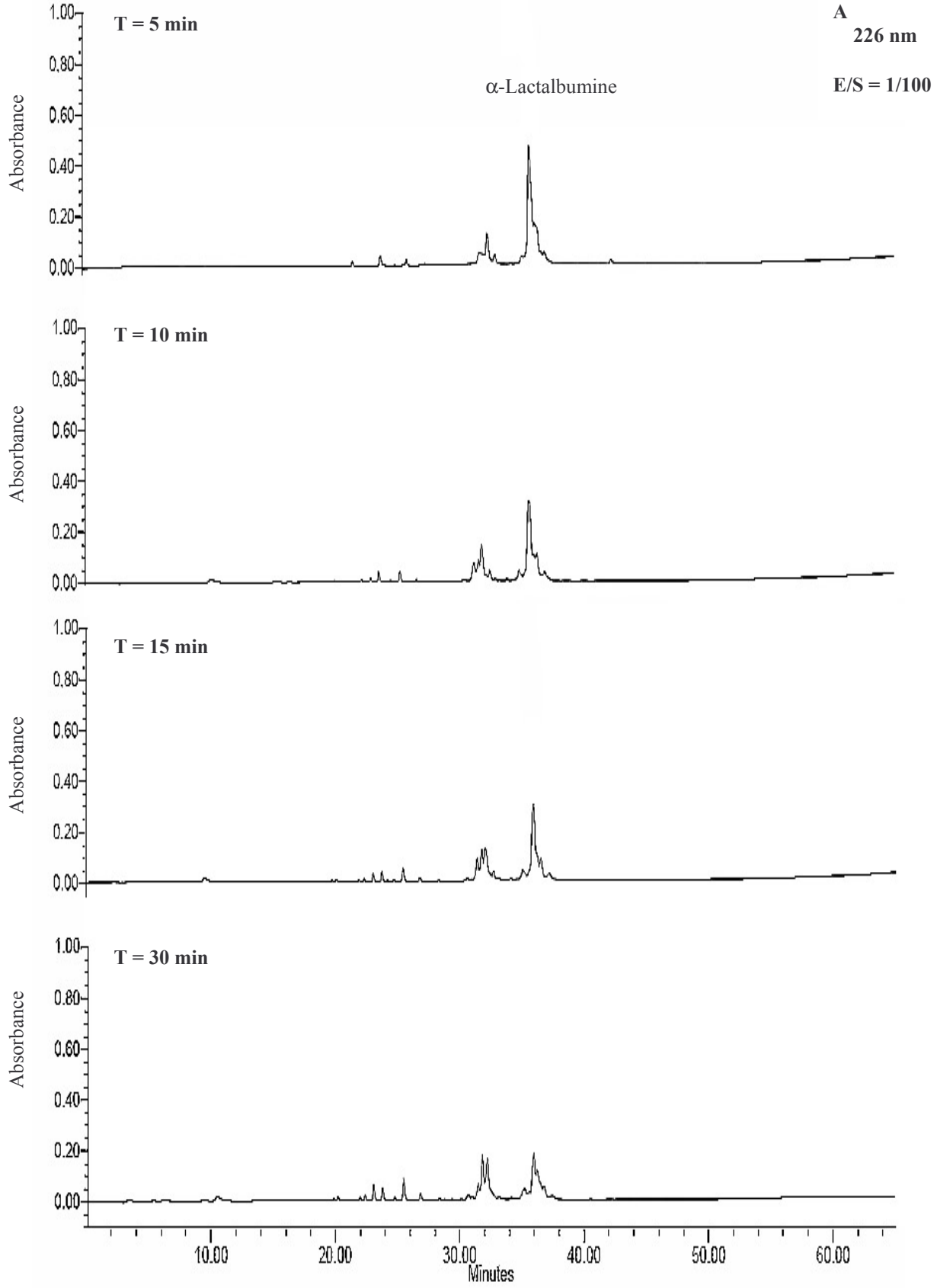
Figure 6. *Profils CLHP (a, b, c, d) de la cinétique d'hydrolyse de l'apoforme de l'α-Lactalbumine menée à 25°C dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl



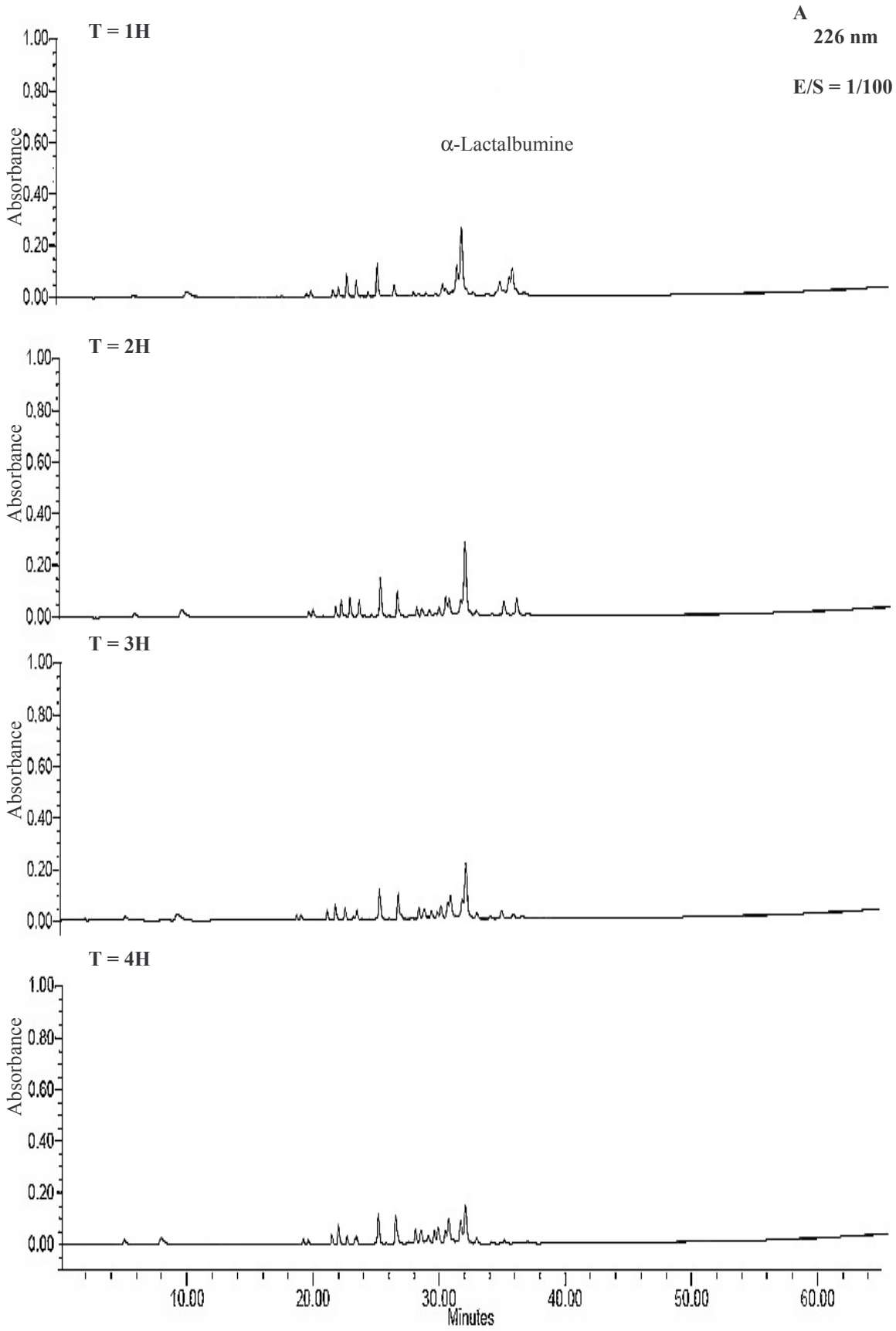
a

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl



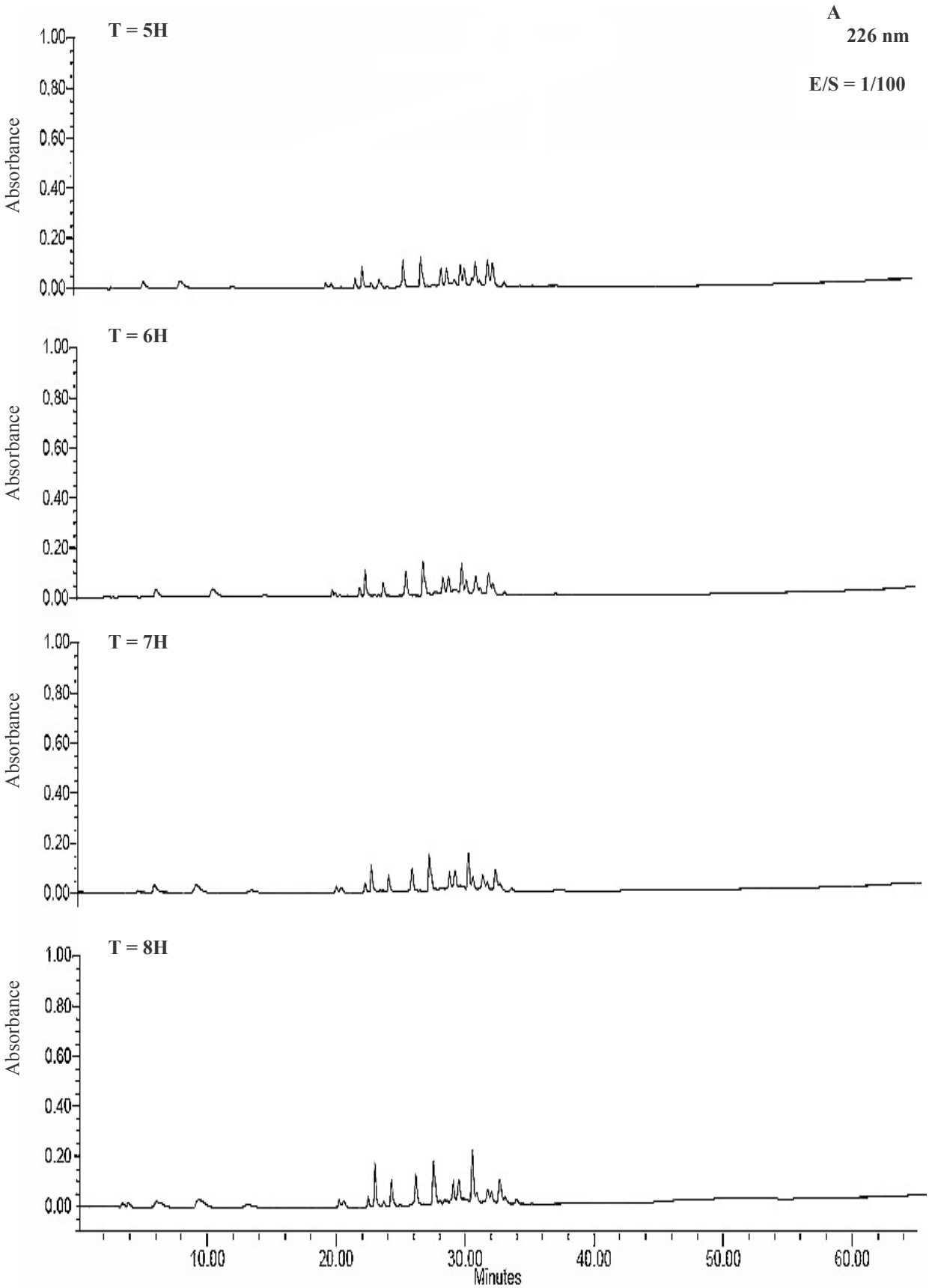
b

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl



c

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl



d

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

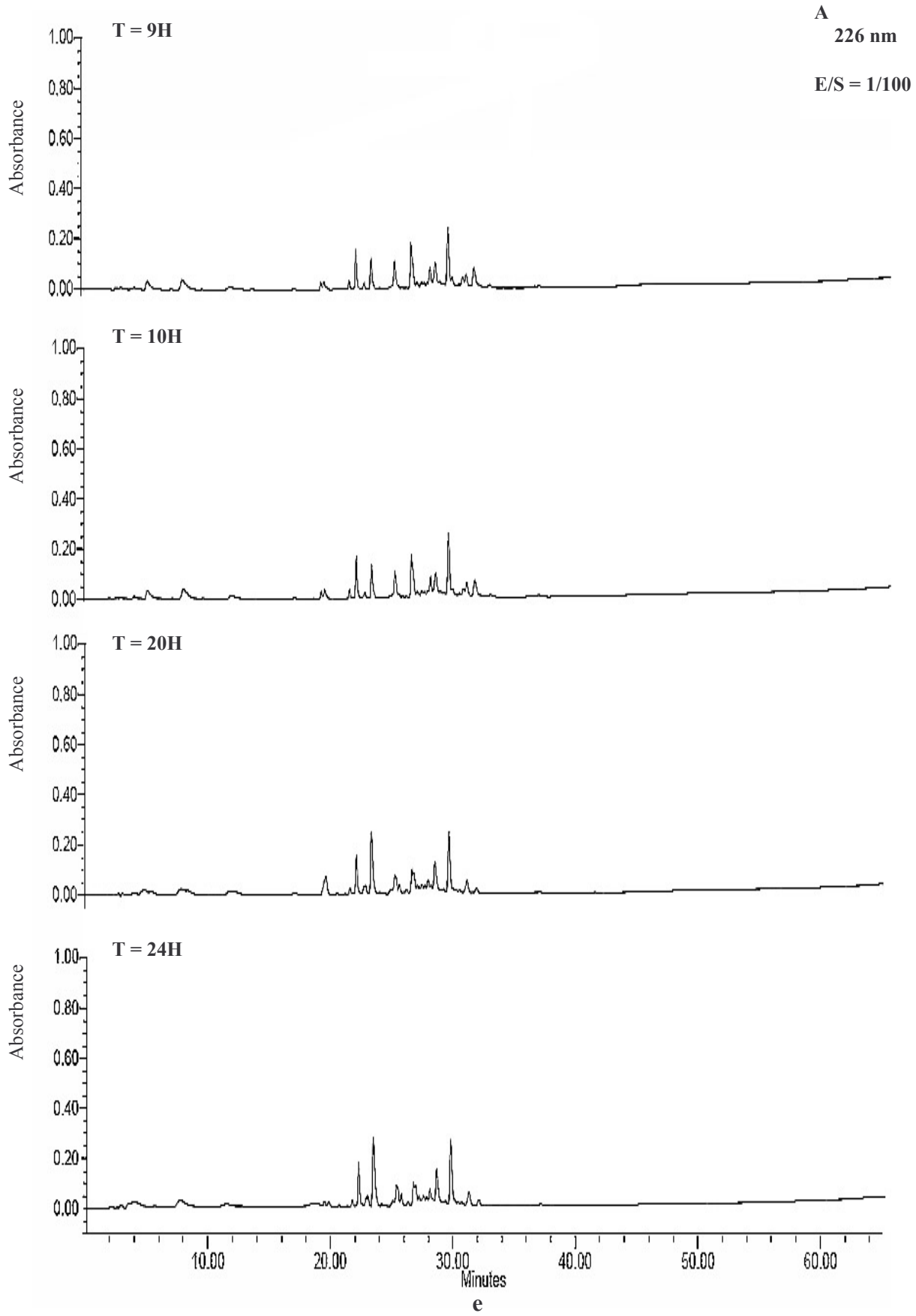


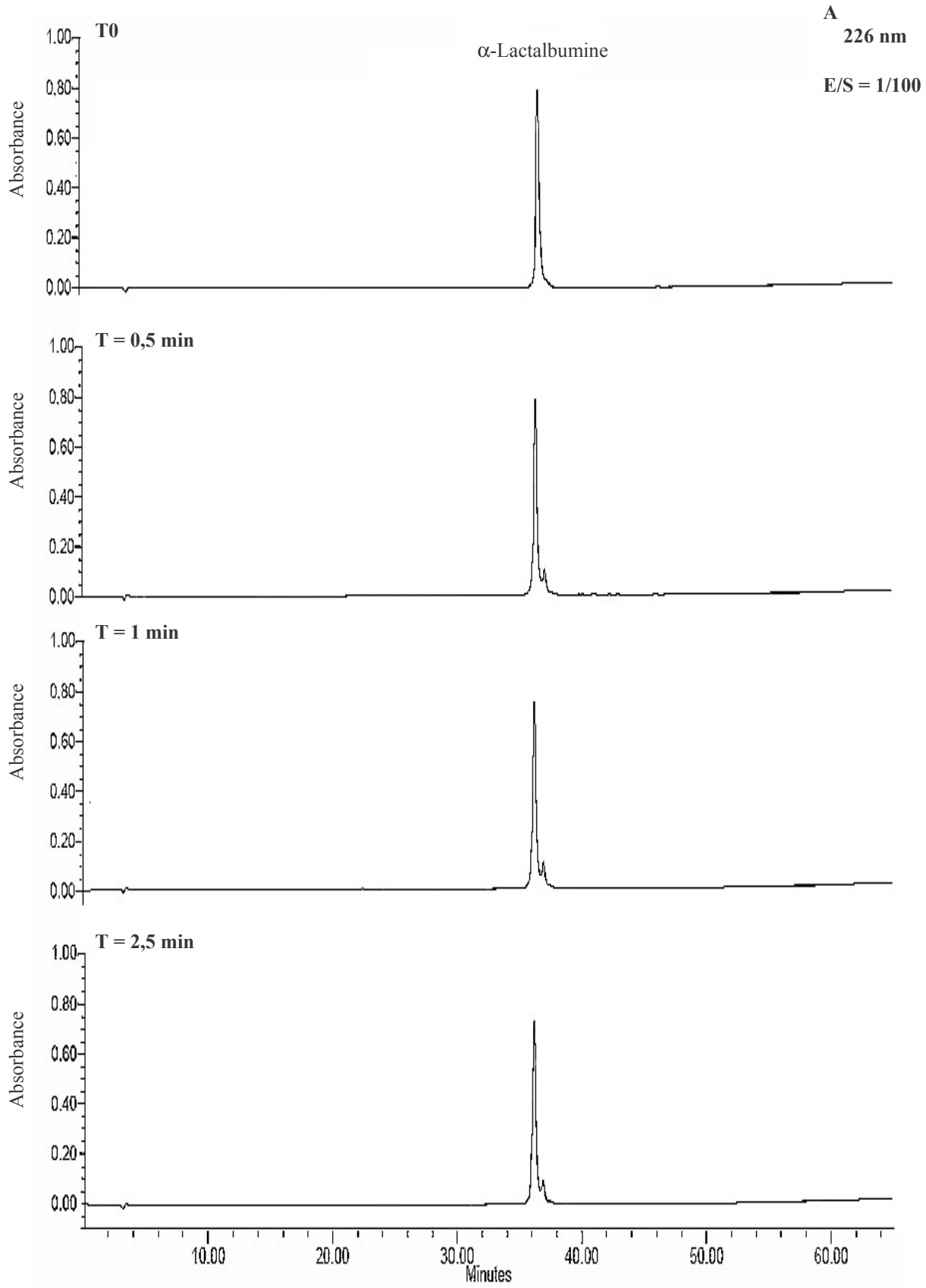
Figure 7. *Profils CLHP (a, b, c, d, et e) de la cinétique d'hydrolyse de l'apoforme de l'α-Lactalbumine menée à 37°C dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Griko et Remeta (1999), et Polverino de Laureto *et al.,* (2002b) ont montré que la température d'incubation ainsi que le milieu réactionnel (en particulier la force ionique) avaient un rôle très important sur la conformation de la protéine. A 4°C et à pH neutre, l'apo-α Lac adopte une conformation native, comme l'holo-α Lac. A 20°C, il est assez difficile de la distinguer de l'holoforme, mais dès que la température augmente la conformation de l'apoforme change, elle perd progressivement sa structure tertiaire. A 45°C, sa conformation est comparable à celle obtenue à pH acide (« A-State »), c'est-à-dire une conformation dénaturée. Un T*m* (température où 50% de l'α-Lactalbumine est sous une forme dénaturée) a également été établi. Il est situé autour de 34°C et confirme les résultas obtenus par Owusu Apenten en 1995. L'apoforme de l'α-Lactalbumine est très sensible à la force ionique à pH neutre, contrairement à l'holoforme. Elle existe en équilibre sous plusieurs conformations : native, « Molten Globule », et dénaturée. A 25°C, l'apoforme se rapproche de la conformation native tandis qu'à 37°C, elle commence à perdre sa structure tertiaire, la concentration de la forme semi dénaturée appelée « Molten Globule » augmente, ce qui explique qu'elle soit plus facilement hydrolysée par l'α chymotrypsine, et que le mécanisme d'hydrolyse soit du type « semi-zipper ».

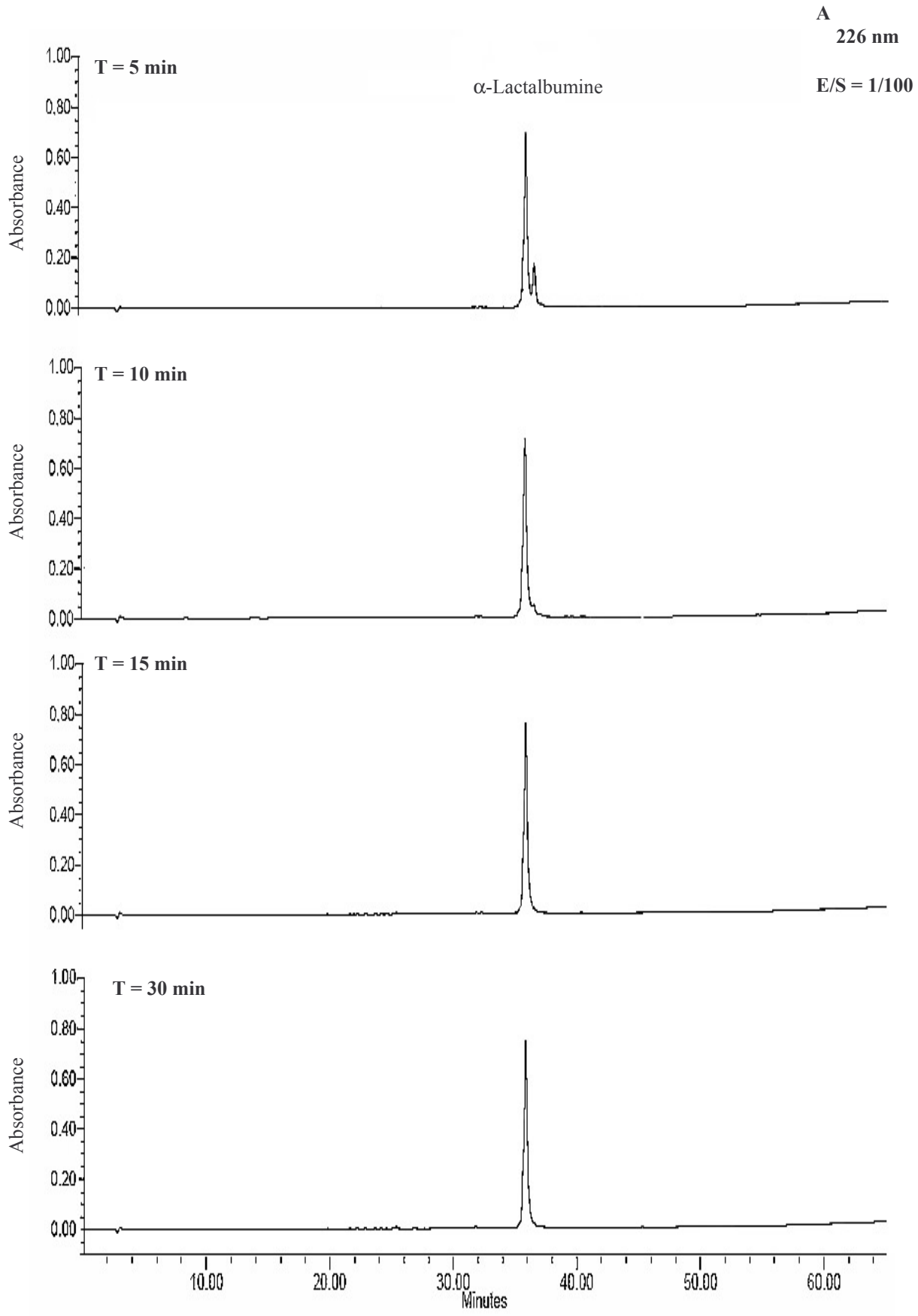
Pellegrini *et al*., (1999) ont effectué l'hydrolyse sur l'apoforme de l'α-Lactalbumine dans du tampon TRA 200 mM + $CaCl_2$ 20 mM, pH 7,8. Afin de comparer les mécanismes d'hydrolyse, ce tampon a été utilisé pour réaliser une cinétique d'hydrolyse (Figure 8). La cinétique d'hydrolyse menée à 37°C dans le tampon TRA 200 mM + $CaCl_2$ 20 mM, pH 7,8, est plus lente que celle menée à la même température mais dans le tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4. Comme pour l'hydrolyse menée à 25°C, un mécanisme du type « one by one » est observé. L'α-Lactalbumine est plus résistante à l'hydrolyse dans le tampon TRA 200 mM + $CaCl_2$ 20 mM, pH 7,8 à 37°C que celle menée à 25°C dans le tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4, puisque l'apparition des peptides n'est détectée qu'à partir de 10 minutes d'hydrolyse. Par contre, même si l'hydrolyse est effectuée selon un mécanisme « one by one » dans les deux cas, la comparaison des profils CLHP de la cinétique menée dans le tampon TRA 200 mM + $CaCl_2$ 20 mM, pH 7,8 à 37°C et avec ceux de la cinétique menée à 25°C dans le tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4 a montré que les populations peptidiques générées étaient différentes.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl



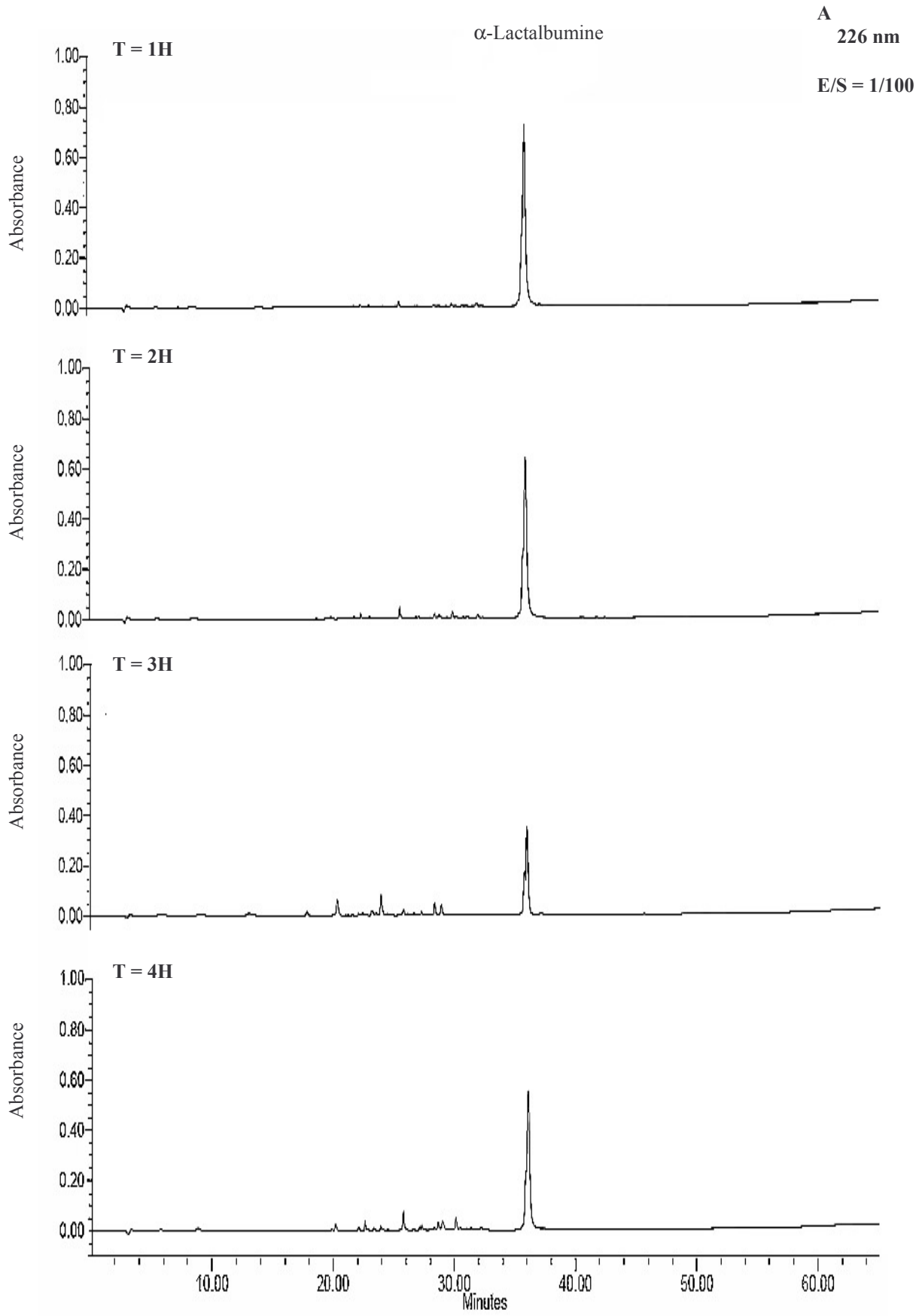
a

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl



b

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl



c

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

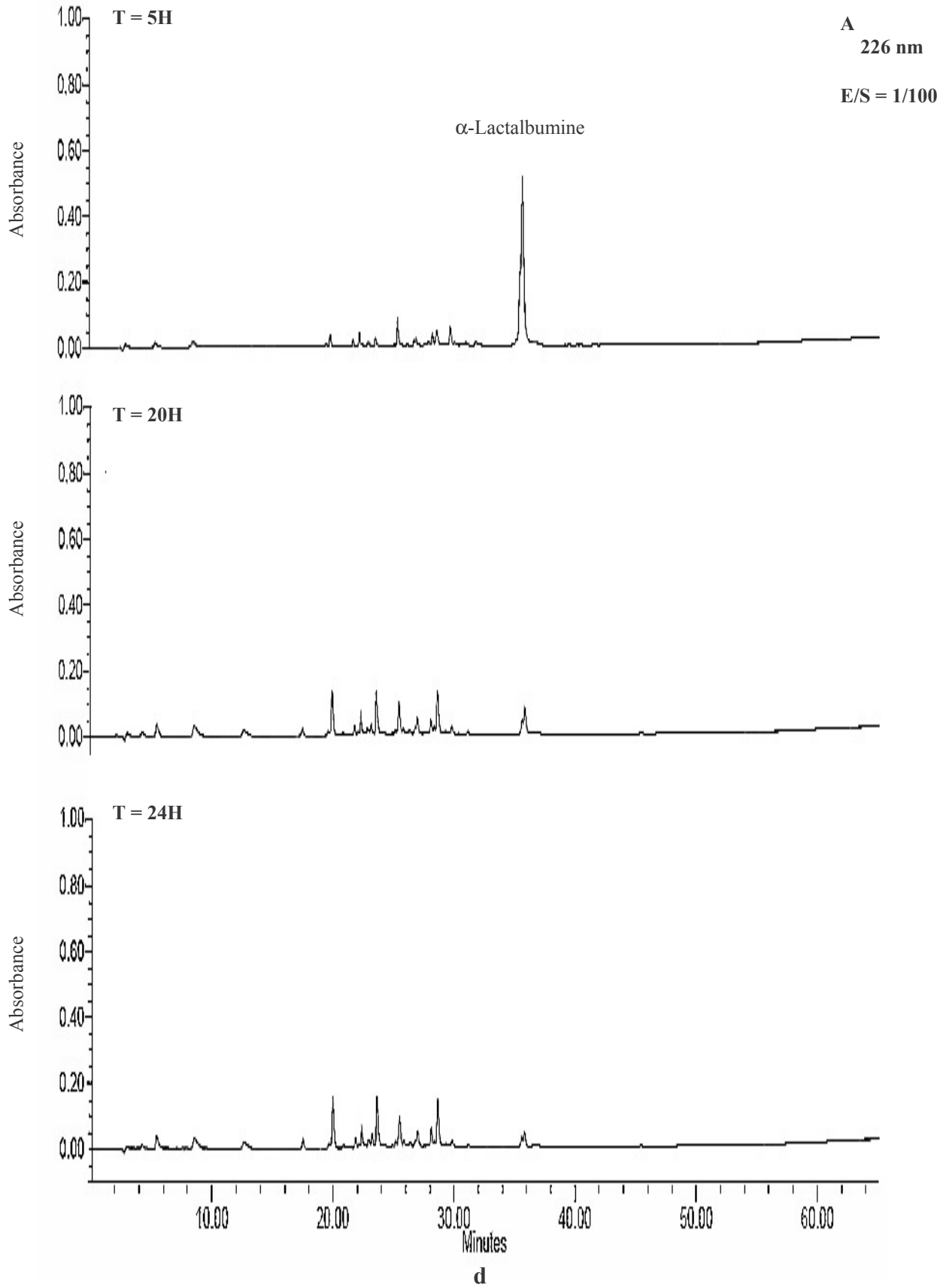
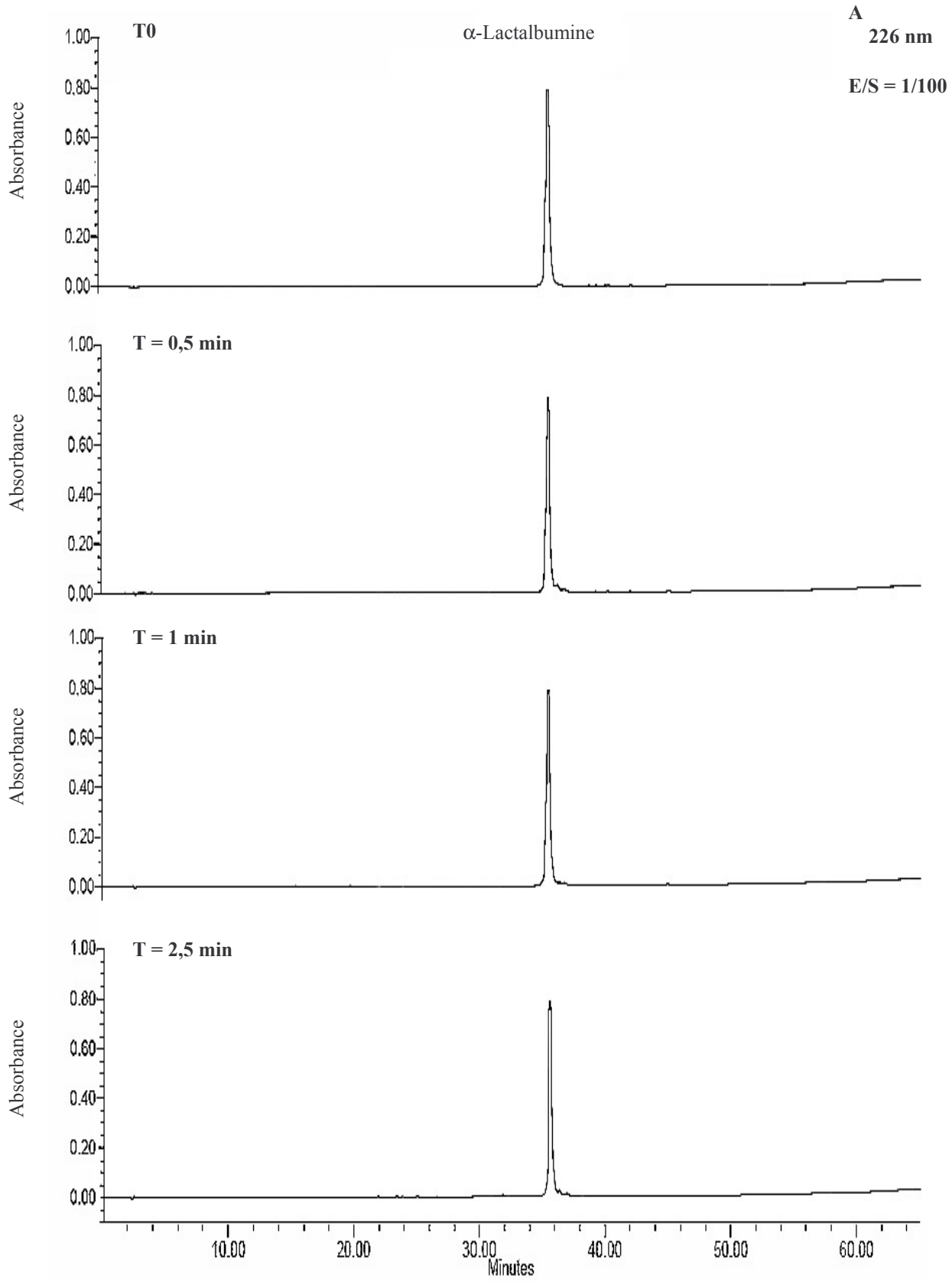


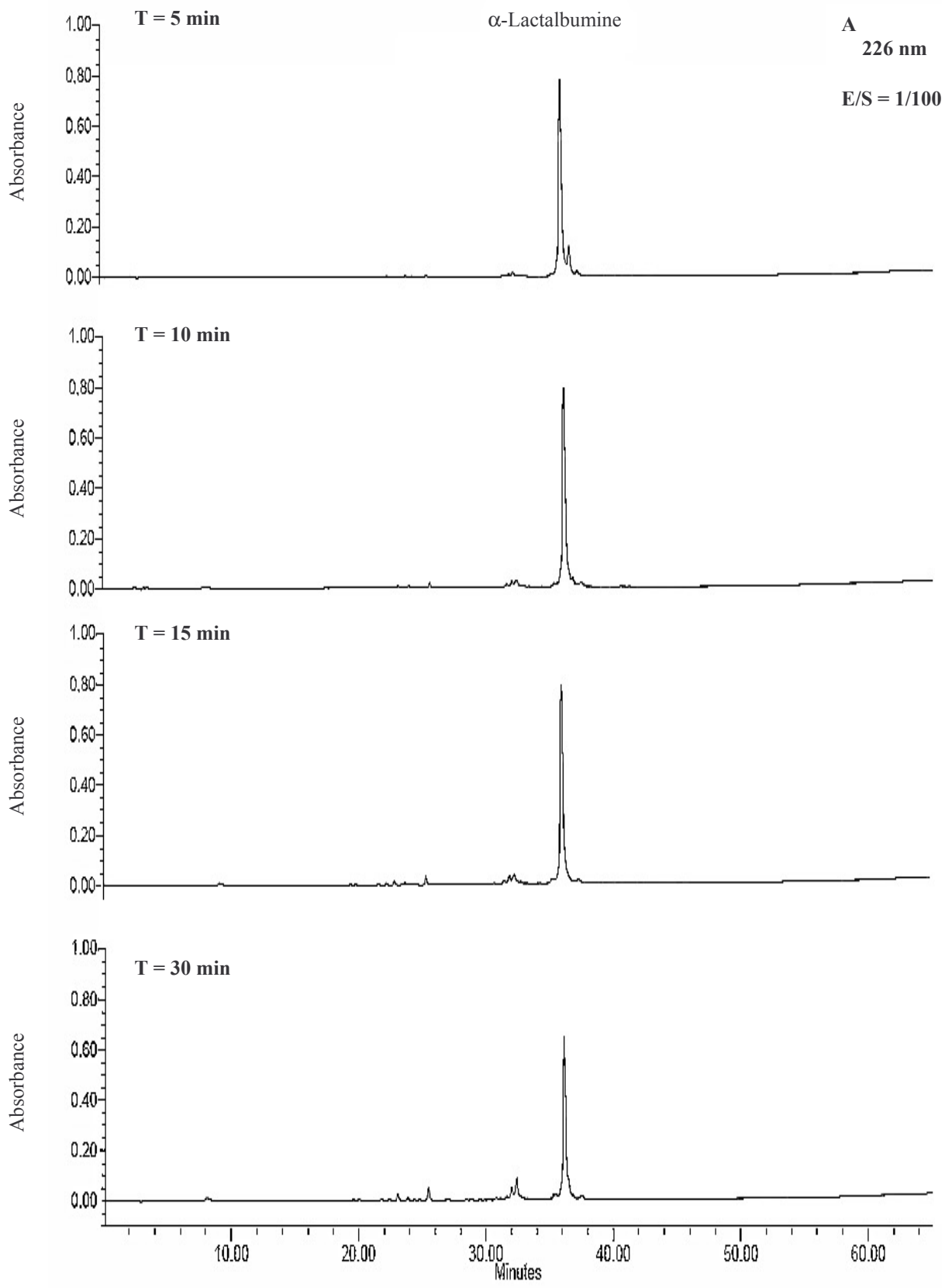
Figure 8. *Profils CLHP (a, b, c, et d) de la cinétique d'hydrolyse de l'apoforme de l'α-Lactalbumine menée à 37°C dans du tampon TRA 200 mM + $CaCl_2$ 20 mM, pH 7,8.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl



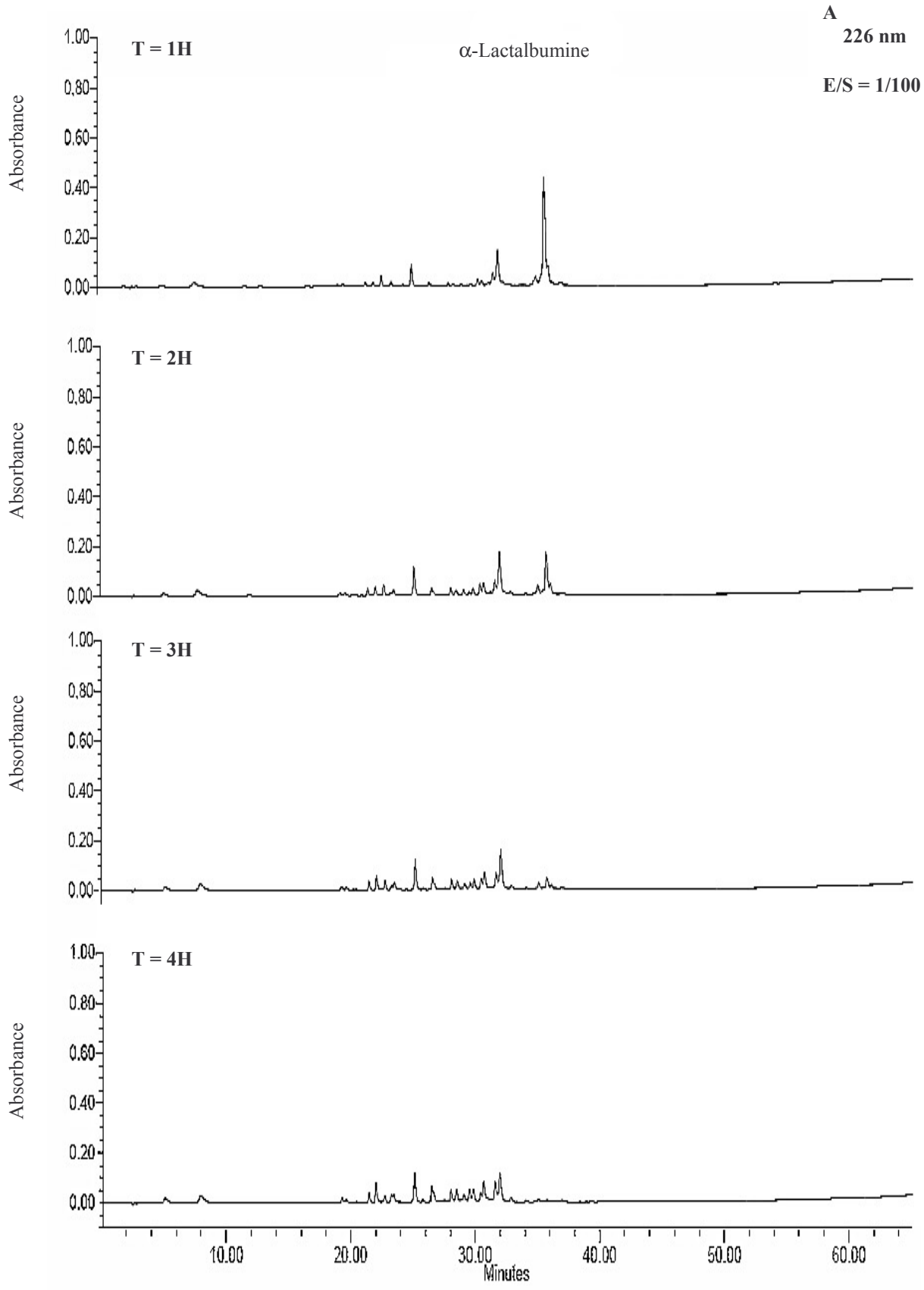
a

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl



b

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl



c

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

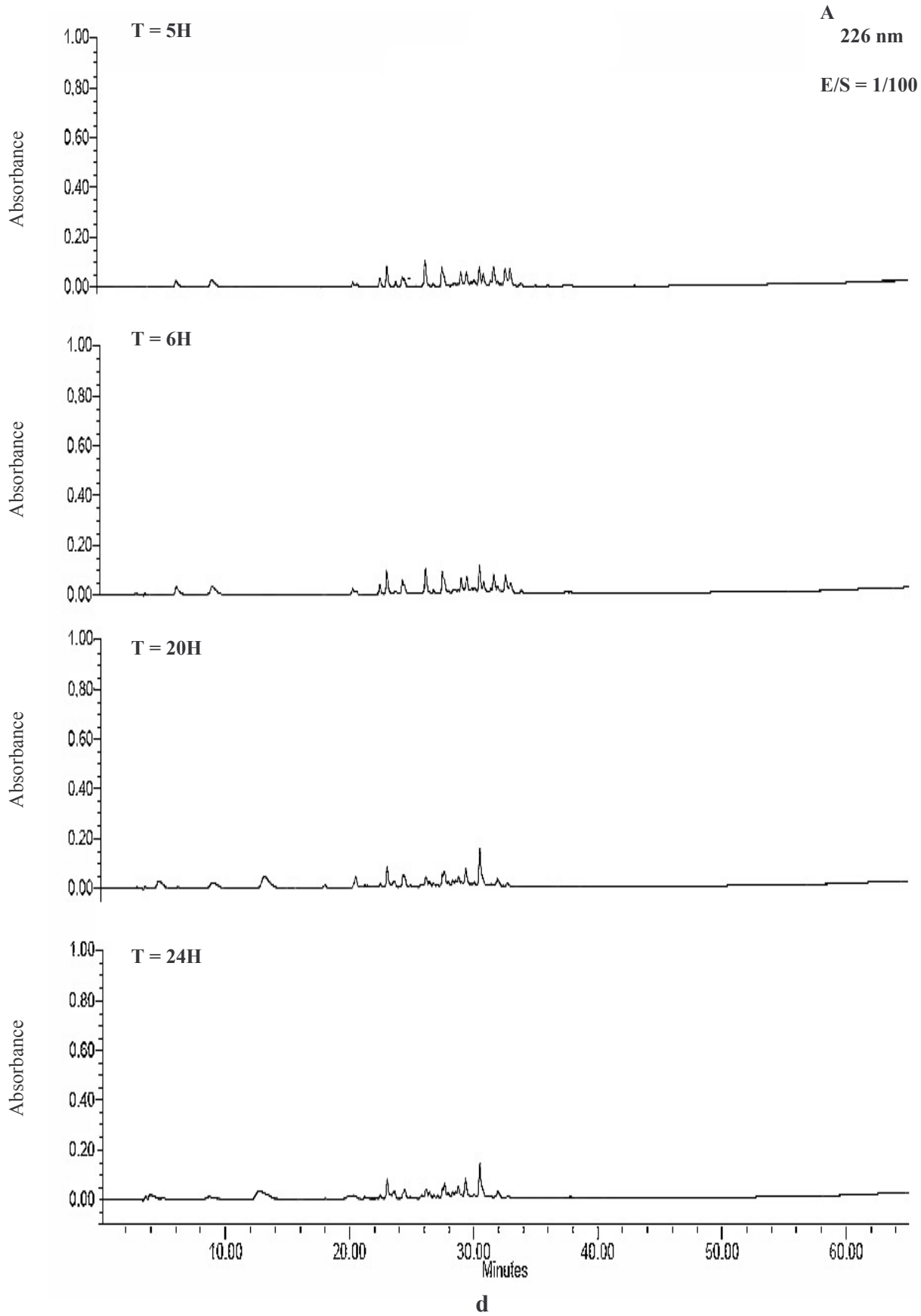


Figure 9. *Profils CLHP (a, b, c, et d) de la cinétique d'hydrolyse de l'holoforme de l'α-Lactalbumine menée à 37°C dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Le calcium présent chez l'holo-α Lac permet de stabiliser la structure de la protéine, et de la rendre plus résistante aux attaques enzymatiques (Chrysina *et al.,* 2000). Lorsque dans le milieu réactionnel est ajouté du calcium, celui-ci peut se lier à l'apo-α Lac et lui permettre de revenir vers une conformation native (Griko et Remeta, 1999). La concentration de la forme native augmente, les sites de coupure pour l'α chymotrypsine deviennent moins accessibles, et très peu de peptides sont obtenus.

Afin de comparer les deux formes, une hydrolyse de l'holoforme dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4 a été réalisée (Figure 9). L'hydrolyse de l'holoforme à 37°C est plus lente celle effectuée sur l'apoforme à 37°C (Figure 7). Chrysina *et al.,* (2000) ont montré que le calcium fixé sur l'holo-α Lac permettait de stabiliser sa structure en la rendant plus compacte et plus résistante aux attaques enzymatiques. De plus l'holo-α Lac possèdant un T*m* (température à laquelle 50% de la protéine se trouve dénaturée) autour de 64,5°C, adopte plus une conformation native à 37°C que l'apo-α Lac dont le T*m* est situé autour de 34°C.

L'hydrolyse de l'apoforme de l'α-Lactalbumine à 37°C dans le tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4, a permis d'une part d'obtenir une hydrolyse totale en 24H, et d'autre part d'obtenir un mécanisme d'hydrolyse situé entre un mécanisme d'hydrolyse du type « one by one » et « zipper », permettant de générer des peptides intermédiaires. Cette cinétique d'hydrolyse a donc été choisie afin d'étudier et d'identifier la population peptidique, mais également afin d'identifier des peptides antimicrobiens.

II.3. Etude et identification de la population peptidique au cours de la cinétique d'hydrolyse de l'α-Lactalbumine par spectrométrie de masse

L'identification de la population peptidique a été établie à partir de la cinétique d'hydrolyse de l'apoforme de l'α-Lactalbumine, à 37°C dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4, avec un rapport E/S de 1/100 (mole/mole).

Depuis quelques années, la spectrométrie de masse est devenue un outil essentiel pour l'étude de protéines et de peptides (Mann et Wilm, 1995, et Andersen *et al.*, 1996), cette technique permet à la fois l'obtention d'une grande précision et d'une rapidité de l'analyse.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Dans un premier temps, un couplage de la CLHP avec la spectrométrie de masse (LC/MS) est apparu comme une technique rapide permettant à la fois d'analyser un hydrolysat complexe par CLHP et d'identifier en même temps sa composition en peptides. Une mise au point des conditions d'analyse a été nécessaire en étudiant trois paramètres : la colonne C_4 ou C_{18}, le diamètre de la colonne : 1mm ou 2,1mm, et le contre ion : TFA ou acide formique. L'étude a été effectuée sur l'α-Lactalbumine en solution dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4.

Cette étude a montré que les meilleurs résultats pour l'analyse de l'α-Lactalbumine par couplage LC/MS, étaient obtenus avec la colonne C_{18} de 2,1 mm de diamètre en présence de TFA, ou la colonne C_4 de 1 mm de diamètre en présence d'acide formique. Comme l'analyse des hydrolysats de l'α-Lactalbumine par CLHP a été effectuée sur une colonne C_4, le couplage LC/MS a été également réalisé sur la colonne C_4, sur un spectromètre de masse simple quadripôle de type Applied Biosystems modèle API I ESI/MS (PE Sciex, Toronto, Canada).

Lors du couplage LC/MS, un problème a été rencontré : l'absence de spectre U.V. reproductible et similaire à ceux obtenus par CLHP. Il a quand même été possible d'identifier certains peptides à partir des spectres MS, et grâce au logiciel de traitement logiciel Mac Spec 3.3 avec lequel il est possible d'obtenir un « show contour » permettant une représentation des masses en fonction de leur intensité et de leur temps de rétention,. La présence de sels a tendance à inhiber le signal lors d'une analyse en électrospray. Malgré l'intérêt du couplage et l'utilité du logiciel Mac Spec 3.3, l'identification de certains peptides n'a pas été possible, due à la présence de ponts disulfures et de peptides de haut poids moléculaires au début de la cinétique d'hydrolyse.

Pour déterminer la séquence en acides aminés des peptides, le passage à la spectrométrie de masse en tandem (ESI/MS/MS) permettant la fragmentation de peptides, s'est avérée nécessaire. Les spectres de masse ont été réalisés avec un spectromètre de masse triple quadripôlaire de type Applied Biosystems modèle API 3000 LC/MS/MS (PE Sciex, Toronto, Canada). Pour cela plusieurs temps d'hydrolyse représentant l'ensemble de la population peptidique, ont été choisis : T_0, T0,5', T1', T2,5', T5', T10', T15' T30', T1H, T2H, T3H, T12H et T24H. Ces hydrolysats ont été analysés par CLHP semi-préparative, afin de récupérer chaque pic présent sur le chromatogramme, d'éliminer les sels présents, et d'obtenir une quantité suffisante de chaque fraction peptidique pour l'analyse en ESI/MS/MS.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Le passage par ESI/MS/MS a permis d'élucider en grande partie la séquence en acides aminés de la population peptidique présente, de montrer que certains peptides contenaient des ponts disulfures. Mais certains peptides, par leur faible concentration, mais également par la présence de ponts disulfures n'ont pas réussi à être fragmentés.

Afin d'éliminer les doutes présents sur certaines séquences, une concentration de certaines fractions peptidiques ainsi qu'un protocole de réduction se sont avérés nécessaires. Le premier protocole consistait à ajouter sur les échantillons évaporés à sec, 100µL d'un tampon de réduction (tampon Tris/HCl 0,5 M pH 8 + guanidine-HCl 6 M + dithiotreitol (DTT) 10 mM), puis une incubation à 37°C pendant 2H à l'abri de la lumière était effectuée. L'utilisation de ce protocole s'est avérée impossible, par la présence de sels qui inhibent totalement le signal en ESI. Un deuxième protocole de réduction a donc été établi d'après les travaux de Legros *et al.,* (2004b). Après évaporation de 500 µL d'échantillons, 200µL du tampon de réduction (tampon bicarbonate d'ammonium 25 mM + dithiotreitol (DTT) 5 mM) sont ajoutés puis incubés 30 minutes à 55°C. Après incubation, l'ensemble des échantillons est évaporé à sec.

La technique d'analyse en masse a également été changée. La nano-électrospray est une technique permettant d'utiliser très peu d'échantillon ce qui permet de concentrer les échantillons, et donc d'augmenter la sensibilité de l'appareil. En travaillant à des débits plus faibles, cette technique permet de travailler plus longtemps avec très peu d'échantillons. Avant l'analyse en nanospray, les échantillons ont été purifiés sur Ziptip C18, pour éliminer les sels et concentrer les peptides. L'utilisation de la nano-electrospray a permis d'identifier la séquence en acides aminés de plusieurs peptides.

Cependant, certains peptides possédant une masse moléculaire élevée, ont résisté à la fragmentation. Quelques fractions peptidiques ont donc été analysées en MALDI-TOF, sur un spectromètre de masse Voyager-DE STR Applied Biosystems de résolution de masse 2000 Da, en mode réflecteur. Celui-ci permet de travailler sur une gamme de masse assez large, et de plus il possède une bonne tolérance vis à vis des sels. Sur les peptides réduits, il a permis de confirmer la séquence obtenue par ESI/MS/MS et nanoESI/MS/MS sur lesquels il y avait des doutes, et d'identifier les séquences manquantes par combinaison des masses obtenues.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

La combinaison de ces 4 techniques a permis d'élucider la population peptidique de l'α-Lactalbumine au cours de sa cinétique d'hydrolyse par l'α chymotrypsine. Les résultats exposés proviennent de la synthèse des 4 techniques. L'identification de la population peptidique a été faite à plusieurs temps de l'hydrolyse. En raison d'une grande quantité de spectres de masse, ceux-ci ne sont pas présentés.

Au cours de l'identification de la population peptidique, chaque peptide a été représenté par une couleur spécifique, qui est identique sur le profil CLHP, dans le tableau d'identification et la cartographie peptidique. La représentation des acides aminés, a été effectuée en utilisant le code à une lettre ainsi que le code à trois lettres.

II.3.1. Analyse du T_0

L'α-Lactalbumine est incubée à 37°C dans le tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4, 1mL est prélevé et ajouté à 46 µL de HCl 2 M formant le T_0.

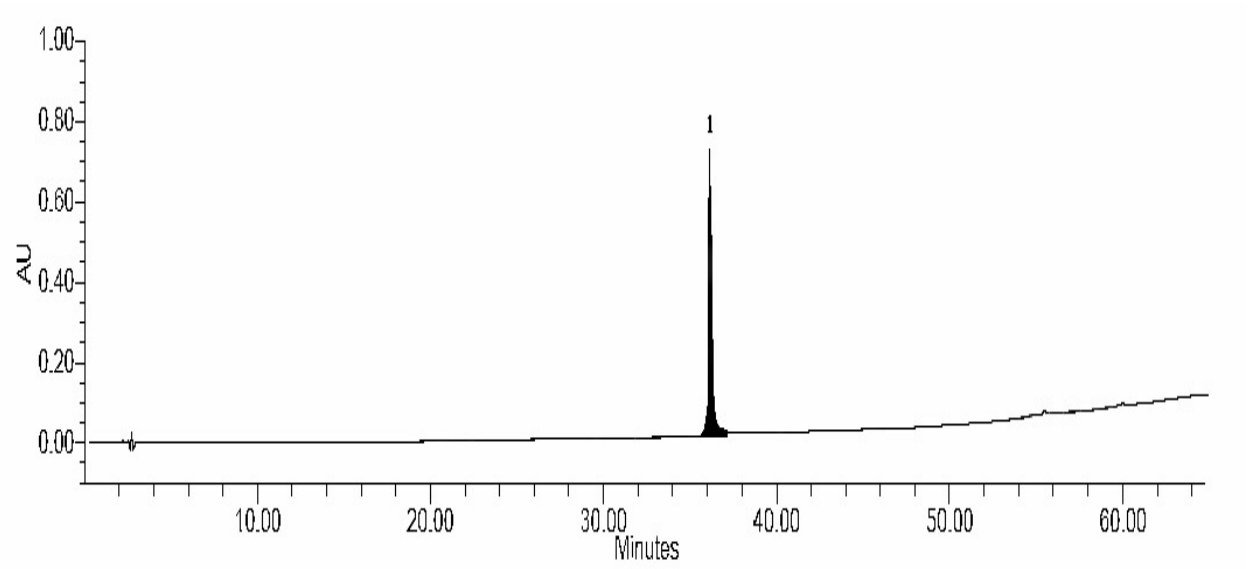


Figure 10. *Profil CLHP de l'hydrolysat chymotrypsique à T_0 de l'α-Lactalbumine menée à 37°C dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4.*

A T_0, le profil CLHP (Figure 10) montre une seule fraction (fraction 1). Après analyse, le spectre de masse (Figure 11) montre la présence d'espèces multichargées correspondant à une seule masse de 14 183 Da, qui correspond à la masse de l'α-Lactalbumine. Seule l'α-Lactalbumine est détectée, ce qui prouve qu'elle n'est pas hydrolysée dans le milieu d'arrêt.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

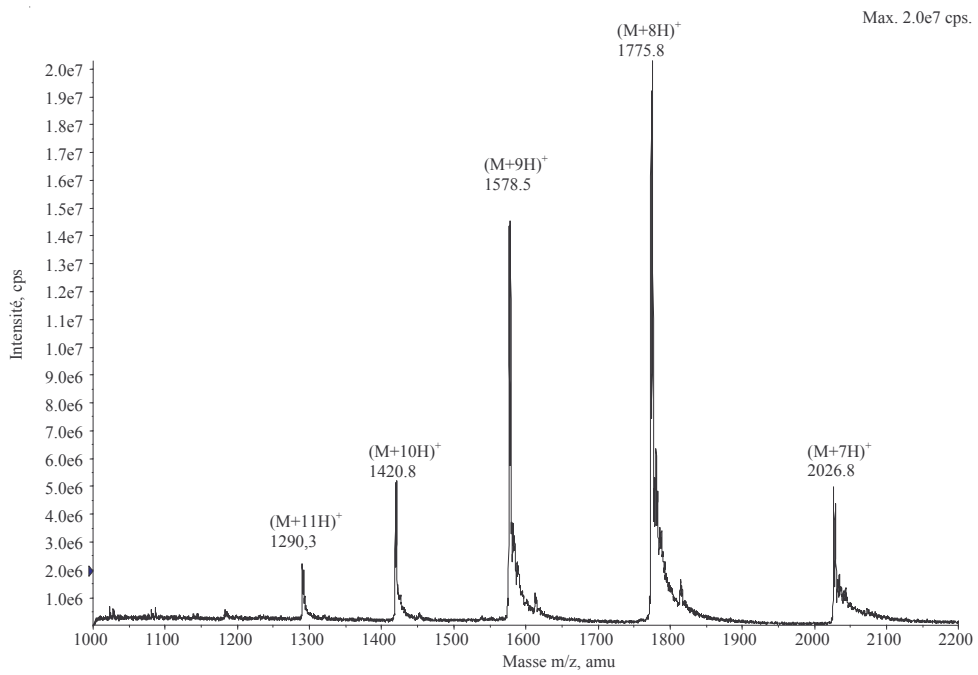


Figure 11. *Spectre ESI/MS de l'α-Lactalbumine à T0.*

II.3.2. Analyse de l'hydrolysat de 0,5 minute

A 0,5 minute d'hydrolyse, huit fractions peptidiques font leur apparition sur le profil CLHP (Figure 12).

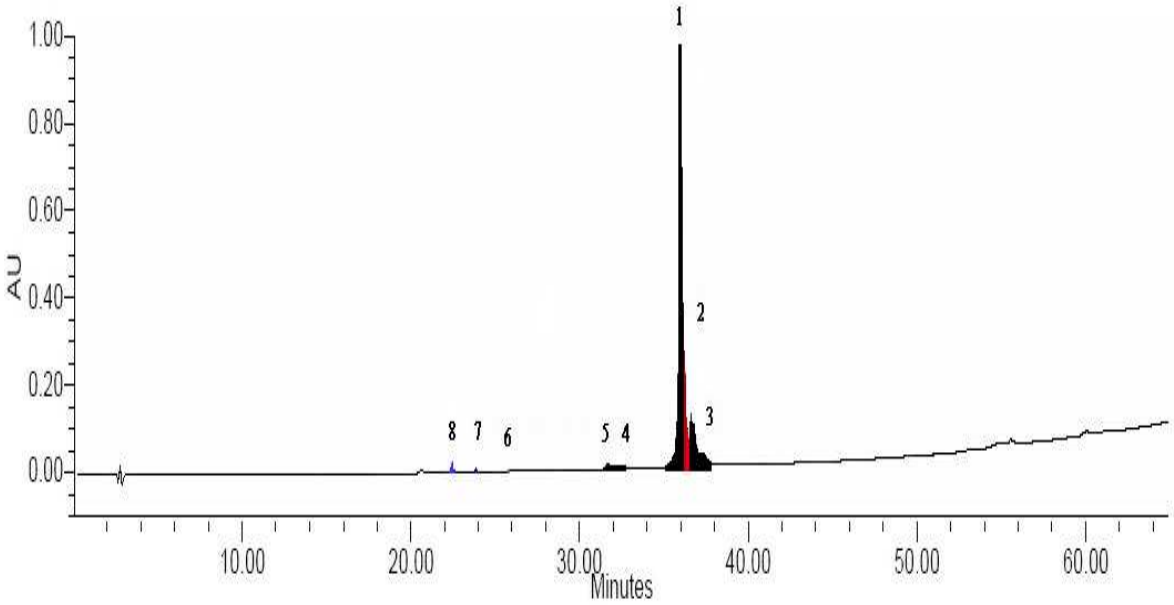


Figure 12. *Profil CLHP de l'hydrolysat chymotrypsique de 0,5 minute de l'α–Lactalbumine menée à 37°C dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Le tableau I montre que parmi ces 8 fractions, six sont pures. Les six fractions pures : 2, 3, 4, 5, 7, et 8, contiennent respectivement les peptides α 1-50 / 54-123 de 13 865 Da, α 1-36 / 51-123 de 12 606 Da, α 1-31 / 105-123 de 5800 Da, α 1-50 / 105-123 de 7920 Da, α 32-50 de 2142 Da, et α 37-50 avec une masse de 1597 Da. Le peptide α 1-31 / 105-123 de 5800 Da présent dans la fraction 4, avait également été identifié par Polverino de Laureto *et al*., (1999) lors de l'hydrolyse de l'apo–α Lactalbumine par l'α chymotrypsine menée à 22°C et avec un rapport E/S de 1/500 (w/w) pendant 3H.

La fraction 1 contenant l'α-Lactalbumine, présente deux peptides supplémentaires de 5972 Da et de 5074 Da dont les séquences en acides aminés correspondent aux fragments α 54-104 et α 61-104.

Quant à la fraction 6, elle contient deux petits peptides de 914 Da et de 336 Da identifiés respectivement comme les peptides α 54-60, et α 51-53. Le peptide α 51-53 posséde des propriétés immunomodulatrices (Fiat *et al.,* 1991) et anti-alopécie (Tsuruki et Yoshikawa, 2005).

L'α-Lactalbumine génère en même temps les peptides α 1-50 / 54-123 et α 1-36 / 51-123, il est donc fort probable que ces deux peptides proviennent d'un même peptide précurseur, dont la séquence correspondrait au fragment α 1-50 / 51-123. Celui-ci n'a pas été identifié aux temps d'hydrolyse étudiés, il faudrait mener l'hydrolyse à des temps inférieurs à 30 secondes.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Localisation sur le profil CLHP	*Masse (en Da)*	*Peptide*
8	1597	α 37-50
7	2142	α 32-50
6	914 336	α 54-60 α 51-53
5	7920	α 1-50 / 105-123
4	5800	α 1-31 / 105-123
1	14 183 5972 5074	α 1-123 α 54-104 α 61-104
2	13 865	α 1-50 / 54-123
3	12 606	α 1-36 / 51-123

Tableau I. *Masses et Séquences des Peptides obtenus à 0,5 minute d'hydrolyse.*

Une cartographie de la population peptidique a été établie à partir de ces résultats (Figure 13), ce qui a permis de localiser la position des coupures effectuées. Les premières coupures sont effectuées en $C_{terminal}$ de la Tyrosine^{36}, Tyrosine^{50}, Phénylalanine^{53}, et Tryptophane^{104}. Puis dans un second temps, la Phe^{31} et le Trp^{60} sont clivés. La Tyrosine, la Phénylalanine et le Tryptophane sont des acides aminés aromatiques que l'α chymotrypsine clive préférentiellement (Keil, 1987).

Polverino de Laureto *et al.,* (2002), ont montré que lorsque l'apo–α Lactalbumine se retrouve sous la conformation « Molten Globule », une petite région du domaine β, localisée entre les résidus 34 et 57, est déstructurée et plus flexible, ce qui rend l'α-Lactalbumine beaucoup plus accessible à l'enzyme. Ils ont également montré, lors de l'hydrolyse de l'α-Lactalbumine par la protéinase K ou l'α chymotrypsine, que les premières coupures se faisaient au sein de cette région (Polverino de Laureto *et al.*, 1999 et 2002). La cartographie peptidique (Figure 13) montre que la majorité des coupures effectuées est localisée au sein de cette région destructurée.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

© 2006 Tous droits réservés.

Figure 13. *Représentation de la population peptidique à 0,5 minute d'hydrolyse. Les flèches noires représentent les sites de coupure.*

II.3.3. Analyse de l'hydrolysat de 1 minute

Une fraction peptidique supplémentaire (fraction 9) apparaît sur le profil CLHP (Figure 14). Cette fraction 9 contient le peptide α 32-36, petit peptide de 564 Da (Tableau II).

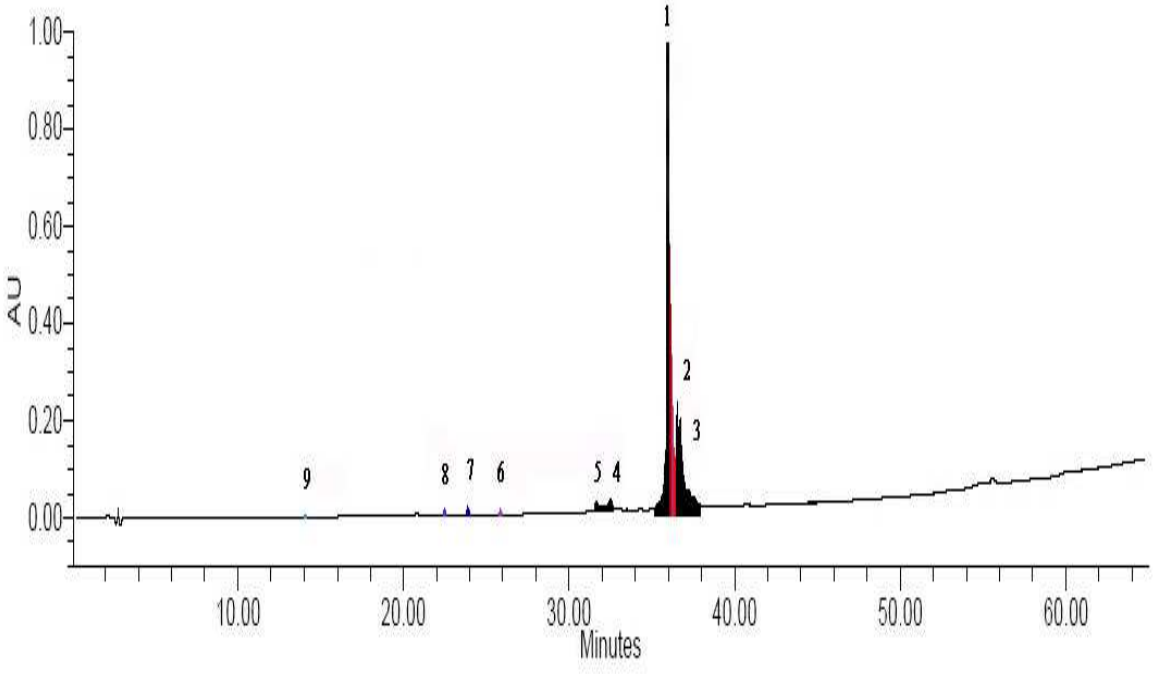


Figure 14. *Profil CLHP de l'hydrolysat chymotrypsique de 1 minute de l'α-Lactalbumine menée à 37°C dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4.*

Le tableau II montre que trois autres peptides sont également apparus au sein des autres fractions. Ces peptides de masse 5778 Da, 12 290 Da, et 11 743 Da ont été identifiés respectivement dans les fractions 1, 2, et 3, et leurs séquences en acides aminés correspondent respectivement aux fragments α 54-103, α 1-36 / 54-123, et α 1-31 / 54-123.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Localisation sur le profil CLHP	*Masse (en Da)*	*Peptide*
9	564	α 32-36
8	1597	α 37-50
7	2142	α 32-50
6	914 336	α 54-60 α 51-53
5	7920	α 1-50 / 105-123
4	5800	α 1-31 / 105-123
1	14 183 5972 5778 5074	α 1-123 α 54-104 α 54-103 α 61-104
2	13 865 12 290	α 1-50 / 54-123 α 1-36 / 54-123
3	12 606 11 743	α 1-36 / 51-123 α 1-31 / 54-123

Tableau II. *Masses et Séquences des Peptides obtenus à 1 minute d'hydrolyse.*

La cartographie peptidique (Figure 15) montre que les coupures effectuées, sont localisées en $C_{terminal}$ de la Tyrosine[36], Phénylalanine[31], et Tyrosine[103]. Ces coupures correspondent comme à T0,5' aux coupures primaires de l'α chymotrypsine.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

© 2006 Tous droits réservés.

Figure 15. *Représentation de la population peptidique à 1 minute d'hydrolyse. Les flèches noires représentent les sites de coupure.*

II.3.4. Analyse de l'hydrolysat de 2,5 minutes

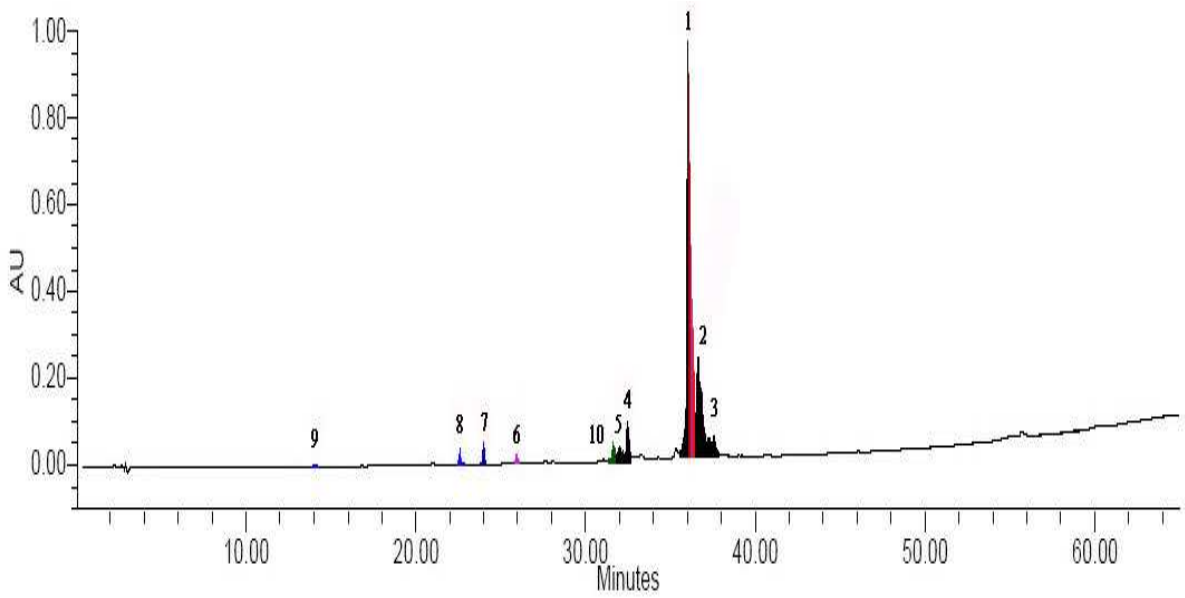


Figure 16. *Profil CLHP de l'hydrolysat chymotrypsique de 2,5 minutes de l'α-Lactalbumine menée à 37°C dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4.*

Le profil CLHP correspondant à l'hydrolysat de 2,5 minutes présenté dans la figure 16, contient une nouvelle fraction peptidique intitulée fraction 10. Dans cette fraction se trouve un peptide de grande taille, 5820 Da dont la séquence en acides aminés a été identifiée comme le fragment α 1-9 / 10-31 / 105-123 (Tableau III). Ce peptide constitué de trois fragments peptidiques reliés par deux ponts disulfures Cys^{6}-Cys^{120} et Cys^{28}-Cys^{111}, est le premier peptide de ce type a avoir été généré au cours de l'hydrolyse.

La cartographie de la population peptidique à 2,5 minutes (Figure 17) montre que le peptide α 1-9 / 10-31 / 105-123 vient du clivage du peptide α 1-31 / 105-123 au niveau de la liaison Phe^{9}-Glu^{10}.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Localisation sur le profil CLHP	*Masse (en Da)*	*Peptide*
9	564	α 32-36
8	1597	α 37-50
7	2142	α 32-50
6	914 336	α 54-60 α 51-53
10	5820	α 1-9 / 10-31 / 105-123
5	7920	α 1-50 / 105-123
4	5800	α 1-31 / 105-123
1	14 183 5972 5778 5074	α 1-123 α 54-104 α 54-103 α 61-104
2	13 865 12 290	α 1-50 / 54-123 α 1-36 / 54-123
3	12 606 11 743	α 1-36 / 51-123 α 1-31 / 54-123

Tableau III. *Masses et Séquences des Peptides obtenus à 2,5 minutes d'hydrolyse.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

© 2006 Tous droits réservés.

Figure 17. *Représentation de la population peptidique à 2,5 minutes d'hydrolyse. Les flèches noires représentent les sites de coupure.*

II.3.5. Analyse de l'hydrolysat de 5 minutes

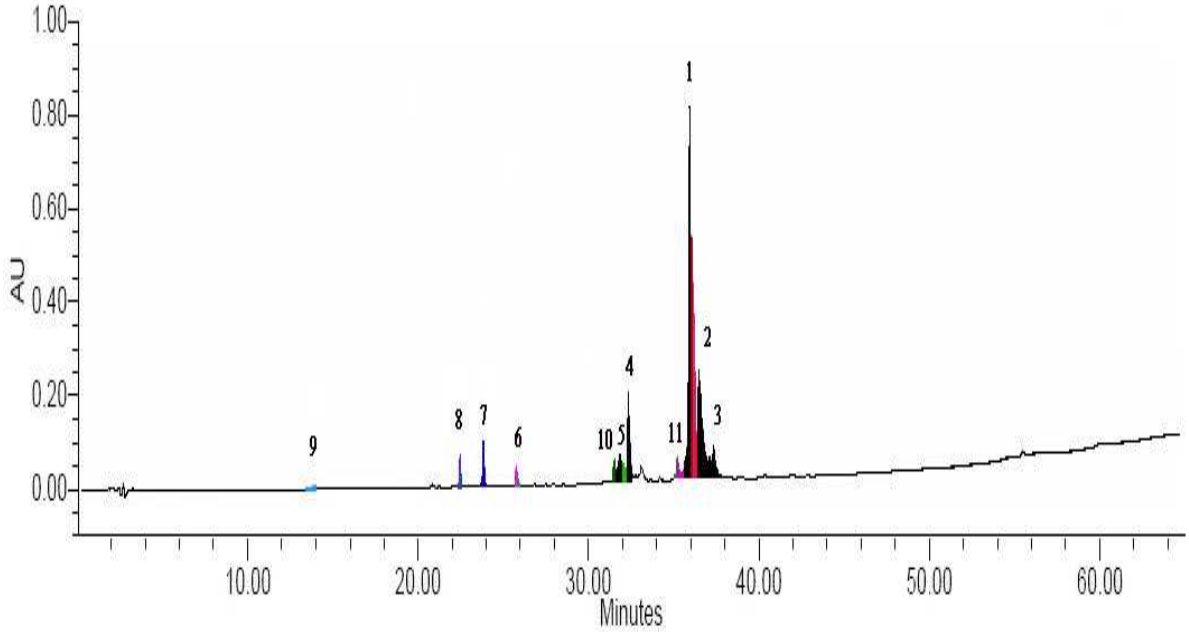


Figure 18. *Profil CLHP de l'hydrolysat chymotrypsique de 5 minutes de l'α-Lactalbumine menée à 37°C dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4.*

Le profil chromatographique (Figure 18) présente une seule fraction supplémentaire, tandis que le tableau IV montre l'apparition de quatre nouveaux peptides. Cette nouvelle fraction, répertoriée comme la fraction 11, contient deux peptides de 5984 Da et 4883 Da, identifiés respectivement comme les fragments α 1-31 / 104-123 et α 61-103. Les deux autres peptides sont localisés dans les fractions 8 et 5. Celui de la fraction 8 correspond au peptide α 10-18 de 1121 Da, et celui de la fraction 5 correspond au peptide α 1-9 / 19-31 / 105-123, de 4717 Da de masse molaire.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Localisation sur le profil CLHP	*Masse (en Da)*	*Peptide*
9	564	α 32-36
8	1597	α 37-50
	1121	α 10-18
7	2142	α 32-50
6	914	α 54-60
	336	α 51-53
10	5820	α 1-9 / 10-31 / 105-123
5	7920	α 1-50 / 105-123
	4717	α 1-9 / 19-31 / 105-123
4	5800	α 1-31 / 105-123
11	5984	α 1-31 / 104-123
	4883	α 61-103
1	14 183	α 1-123
	5972	α 54-104
	5778	α 54-103
	5074	α 61-104
2	13 865	α 1-50 / 54-123
	12 290	α 1-36 / 54-123
3	12 606	α 1-36 / 51-123
	11 743	α 1-31 / 54-123

Tableau IV. *Masses et Séquences des Peptides obtenus à 5 minutes d'hydrolyse.*

La figure 19 représentant la cartographie peptidique, montre que la coupure de la Tyr^{18} au sein du peptide α 1-9 / 10-31 / 105-123, permet la libération des peptides α 10-18 et α 1-9 / 19-31 / 105-123. La seconde coupure est effectuée en $C_{terminal}$ de la Tyr^{103} au sein du peptide α 1-31 / 54-123, libérant le peptide α 1-31 / 104-123. Quant au peptide α 61-103, il provient soit du clivage du peptide α 61-104 au niveau de la Tyr^{103}, soit de la coupure du Trp^{60} au sein du peptide α 54-103.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

© 2006 Tous droits réservés.

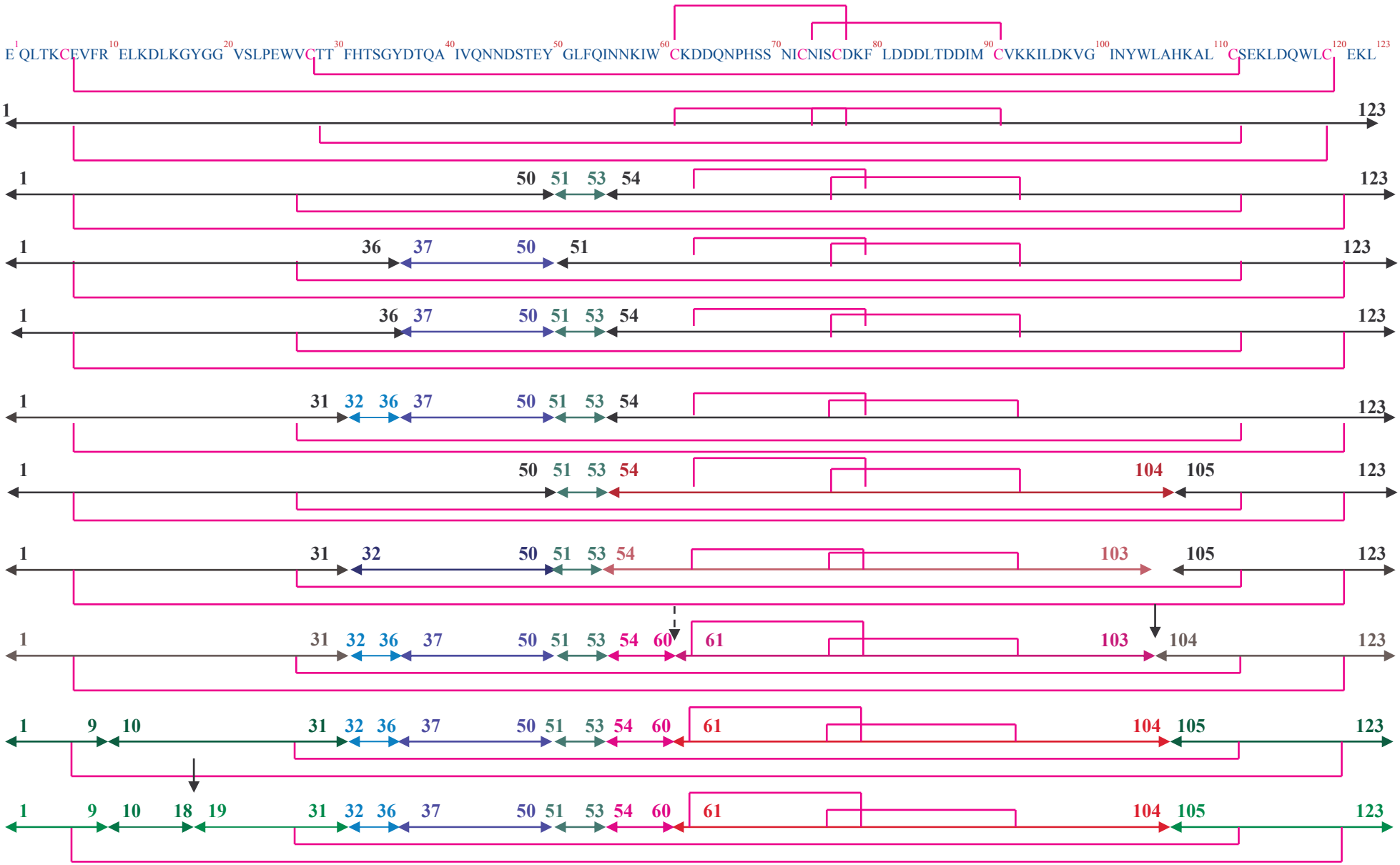


Figure 19. *Représentation de la population peptidique à 5 minutes d'hydrolyse. Les flèches noires représentent les sites de coupure. Les flèches représentées par des traits discontinus localisent des sites de coupure éventuels.*

http://www.univ-lille1.fr/bustl

Thèse de Véronique Dubois-Delval, Lille 1, 2006

II.3.6. Analyse de l'hydrolysat de 10 minutes

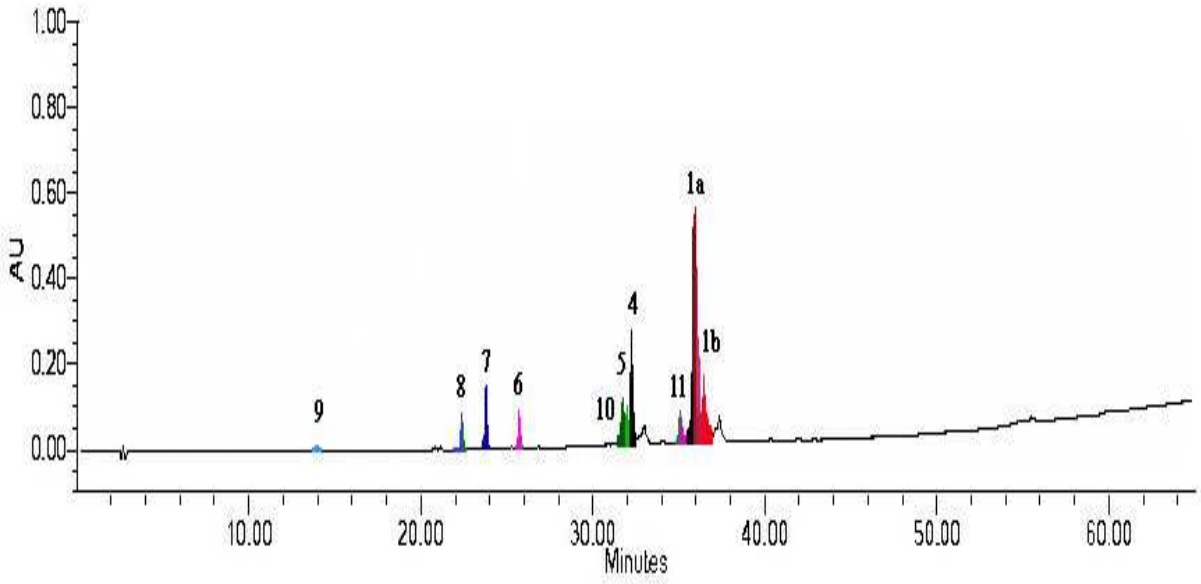


Figure 20. *Profil CLHP de l'hydrolysat chymotrypsique de 10 minutes de l'α-Lactalbumine menée à 37°C dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4.*

Le profil CLHP (Figure 20) ne présente pas de fraction supplémentaire, mais il montre une séparation de la fraction 1 en deux fractions nommées 1a et 1b. Le tableau V ne présente pas de nouveaux peptides.

Par contre plusieurs peptides possédant une masse molaire élevée, ont disparu. Il s'agit des peptides α 1-50 / 54-123, α 1-36 / 54-123 localisés dans la fraction 2, des peptides α 1-36 / 51-123, et α 1-31 / 54-123 situés dans la fraction 3, et du peptide α 1-50 / 105-123 dans la fraction 5. Ces peptides étaient présents depuis le début de l'hydrolyse, ce sont donc des peptides intermédiaires.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Localisation sur le profil CLHP	*Masse (en Da)*	*Peptide*
9	564	α 32-36
8	1597 1121	α 37-50 α 10-18
7	2142	α 32-50
6	914 336	α 54-60 α 51-53
10	5820	α 1-9 / 10-31 / 105-123
5	4717	α 1-9 / 19-31 / 105-123
4	5800	α 1-31 / 105-123
11	5984 4883	α 1-31 / 104-123 α 61-103
1a	14 183 5972 5778	α 1-123 α 54-104 α 54-103
1b	5074	α 61-104

Tableau V. *Masses et Séquence des Peptides obtenus à 10 minutes d'hydrolyse.*

© 2006 Tous droits réservés.

http://www.univ-lille1.fr/bustl

II.3.7. Analyse de l'hydrolysat de 15 minutes

Après 15 minutes d'hydrolyse, une nouvelle fraction peptidique fait son apparition sur le profil CLHP (Figure 21). Il s'agit de la fraction 12 sur le profil CLHP.

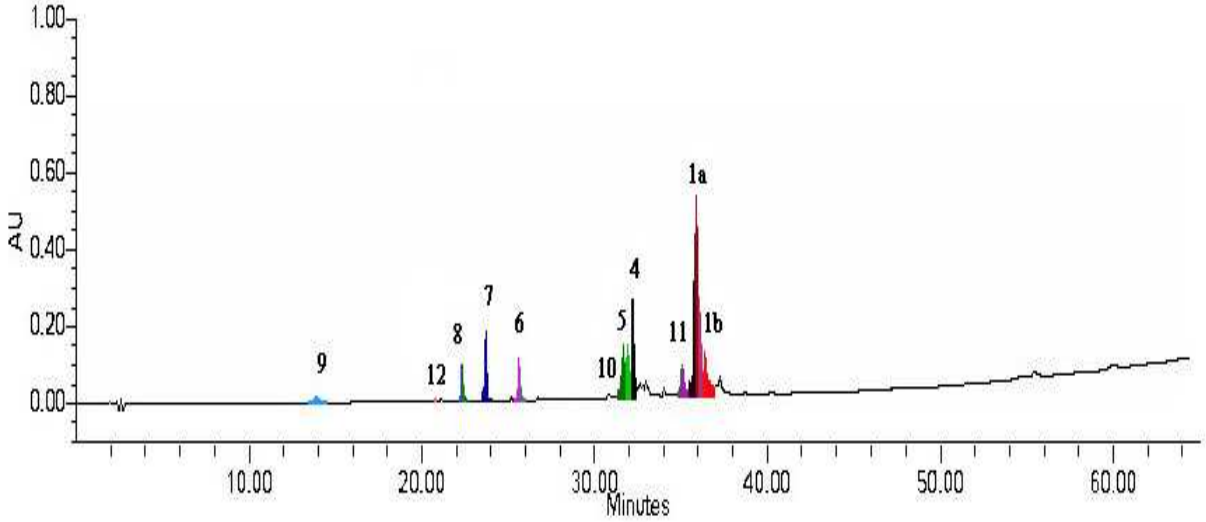


Figure 21. *Profil CLHP de l'hydrolysat chymotrypsique de 15 minutes de l'α-Lactalbumine menée à 37°C dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4.*

Le tableau VI montre que deux peptides sont générés en plus de la fraction 12. Ces deux peptides correspondent aux fragments α 1-9 / 10-31 / 111-123, et α 1-9 / 19-31 / 111-123 situés respectivement dans les fractions 10 et 5.

La fraction 12, contient quant à elle, un peptide de 652 Da, identifié comme étant le peptide α 105-110. Ce peptide α 105-110 est connu pour ses propriétés inhibitrices de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (Pihlanto-Leppälä *et al.*, 1998). C'est le deuxième peptide actif identifié au cours de cette hydrolyse de l'α-Lactalbumine par l'α chymotrypsine.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Localisation sur le profil CLHP	*Masse (en Da)*	*Peptide*
9	564	α 32-36
12	652	α 105-110
8	1597 1121	α 37-50 α 10-18
7	2142	α 32-50
6	914 336	α 54-60 α 51-53
10	5820 5186	α 1-9 / 10-31 / 105-123 α 1-9 / 10-31 / 111-123
5	4717 4083	α 1-9 / 19-31 / 105-123 α 1-9 / 19-31 / 111-123
4	5800	α 1-31 / 105-123
11	5984 4883	α 1-31 / 104-123 α 61-103
1a	14 183 5972 5778	α 1-123 α 54-104 α 54-103
1b	5074	α 61-104

Tableau VI. *Masses et Séquences des Peptides obtenus à 15 minutes d'hydrolyse.*

La cartographie peptidique (Figure 22) montre que l'obtention de ces trois peptides s'effectue par le clivage de la liaison Leu^{110}-Cys^{111} au sein des peptides α 1-9 / 10-31 / 105-123, et α 1-9 / 19-31 / 105-123. Cette coupure a lieu en $C_{terminal}$ de la Leu^{110}. La Leucine fait partie des acides aminés clivés secondairement par la chymotrypsine (Keil, 1987). La région 54-104 est assez résistante aux coupures de la chymotrypsine. En effet ce fragment ne donne pour l'instant que deux coupures : la première est située entre les résidus Trp^{60} et Cys^{61} générant les peptides α 54-60, α 61-104 et α 61-103. Tandis que la seconde s'effectue en $C_{terminal}$ de la Tyr^{103} permettant la libération des peptides α 54-103, et α 61-103. Cette région comprend deux ponts disulfures Cys^{61}-Cys^{77} et Cys^{73}-Cys^{91}, et de plus, elle se trouve à la jonction des domaines α et β de la protéine, ce qui limite l'accessibilité des sites de coupure.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

© 2006 Tous droits réservés.

Figure 22. *Représentation de la population peptidique à 15 minutes d'hydrolyse. Les flèches noires représentent les sites de coupure.*

http://www.univ-lille1.fr/bustl

Thèse de Véronique Dubois-Delval, Lille 1, 2006

II.3.8. Analyse de l'hydrolysat de 30 minutes

L'étude du profil CLHP de l'hydrolysat de 30 minutes (Figure 23), montre qu'il n'y a pas de nouvelles fractions peptidiques. Par contre, parmi ces 11 fractions apparaissent 3 nouveaux peptides (Tableau VII).

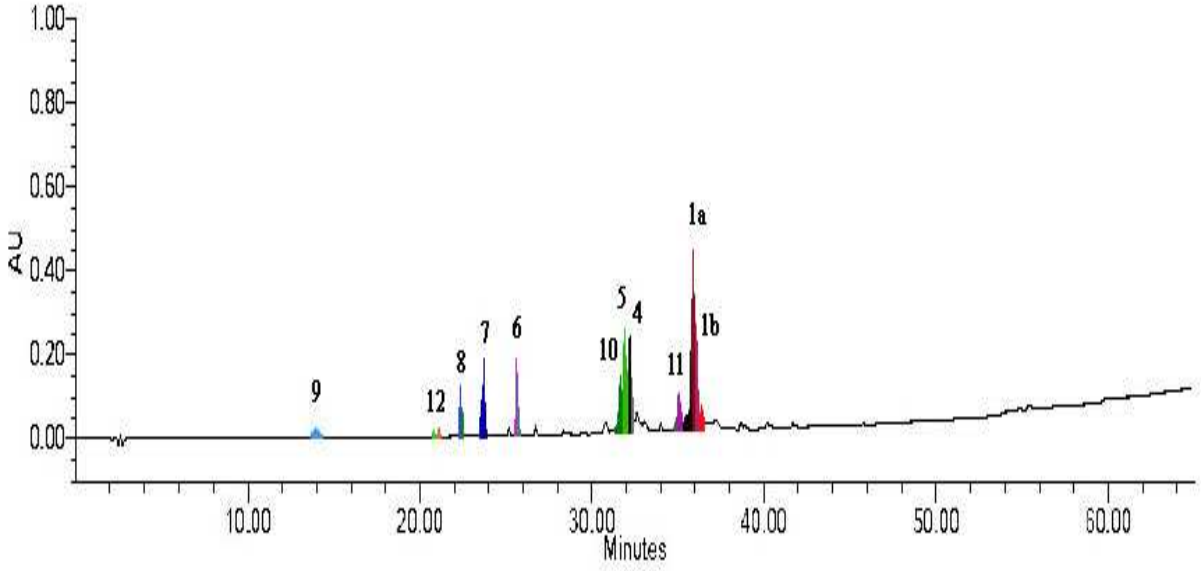


Figure 23. *Profil CLHP de l'hydrolysat chymotrypsique de 30 minutes de l'α-Lactalbumine menée à 37°C dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4.*

Le premier des trois peptides est situé au sein de la fraction 4. Ce peptide de 4904 Da de masse molaire, a été identifié comme étant le peptide 1–9 / 19–31 / 104–123. Le deuxième peptide possédant une masse de 4395 Da, a été localisé dans la fraction 5, et correspond au peptide α 1–9 / 19–31 / 108–131. La fraction 12, contient le dernier peptide apparu, il s'agit d'un peptide de 723 Da, dont la séquence en acides aminés correspond au fragment α 13-18.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Localisation sur le profil CLHP	*Masse (en Da)*	*Peptide*
9	564	α 32-36
12	652	α 105-110
	723	α 13-18
8	1597	α 37-50
	1121	α 10-18
7	2142	α 32-50
6	914	α 54-60
	336	α 51-53
10	5820	α 1-9 / 10-31 / 105-123
	5186	α 1-9 / 10-31 / 111-123
5	4717	α 1-9 / 19-31 / 105-123
	4395	α 1-9 / 19-31 / 108-123
	4083	α 1-9 / 19-31 / 111-123
4	5800	α 1-31 / 105-123
	4904	α 1-9 / 19-31 / 104-123
11	5984	α 1-31 / 104-123
	4883	α 61-103
1a	14 183	α 1-123
	5972	α 54-104
	5778	α 54-103
1b	5074	α 61-104

Tableau VII. *Masses et Séquences des Peptides obtenus à 30 minutes d'hydrolyse.*

La cartographie peptidique (Figure 24) montre que trois coupures ont été effectuées par la chymotrypsine en $C_{teminal}$ de la Leucine^{12}, de la Tyrosine^{18}, et de l'Histidine^{107}. L'Histidine comme la Leucine fait partie des acides aminés que la chymotrypsine coupe secondairement. La cartographie peptidique montre également que tous les acides aminés aromatiques n'ont pas été clivés. En effet, jusqu'à présent, aucune coupure n'a été observée en $C_{terminal}$ du Trp^{26}, de la Phe^{80}, et du Trp^{118}. Ces trois acides aminés sont localisés à côté des ponts disulfures, qui empêchent la chymotrypsine d'accéder aux sites de coupure.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

© 2006 Tous droits réservés.

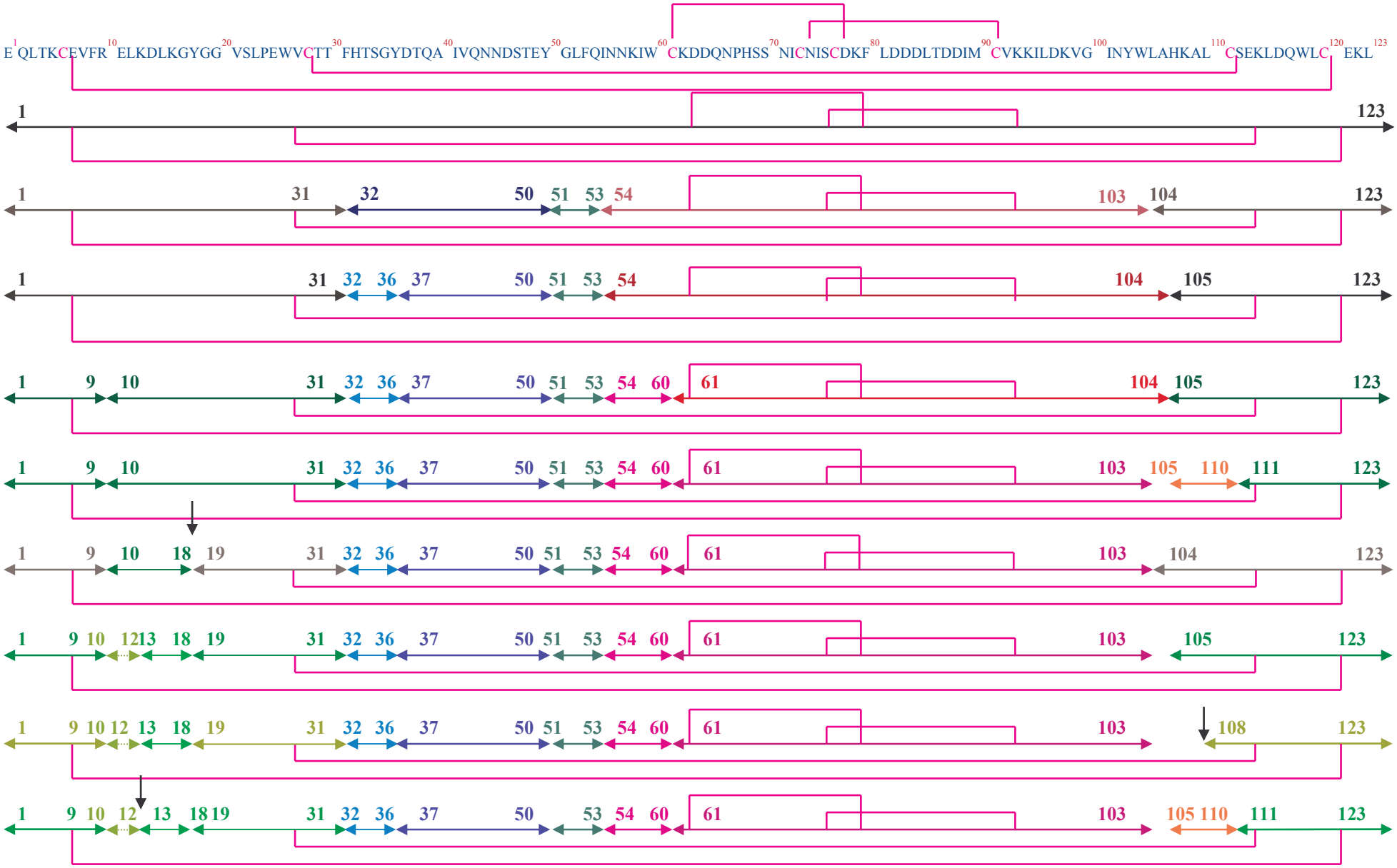


Figure 24. *Représentation de la population peptidique à 30 minutes d'hydrolyse. Les flèches noires représentent les sites de coupure.*

http://www.univ-lille1.fr/bustl

Thèse de Véronique Dubois-Delval, Lille 1, 2006

II.3.9. Analyse de l'hydrolysat de 1 H

Après 1H d'hydrolyse, la population peptidique évolue, trois fractions peptidiques supplémentaires sont apparues sur le profil chromatographique de l'hydrolysat obtenu par CLHP (Figure 25).

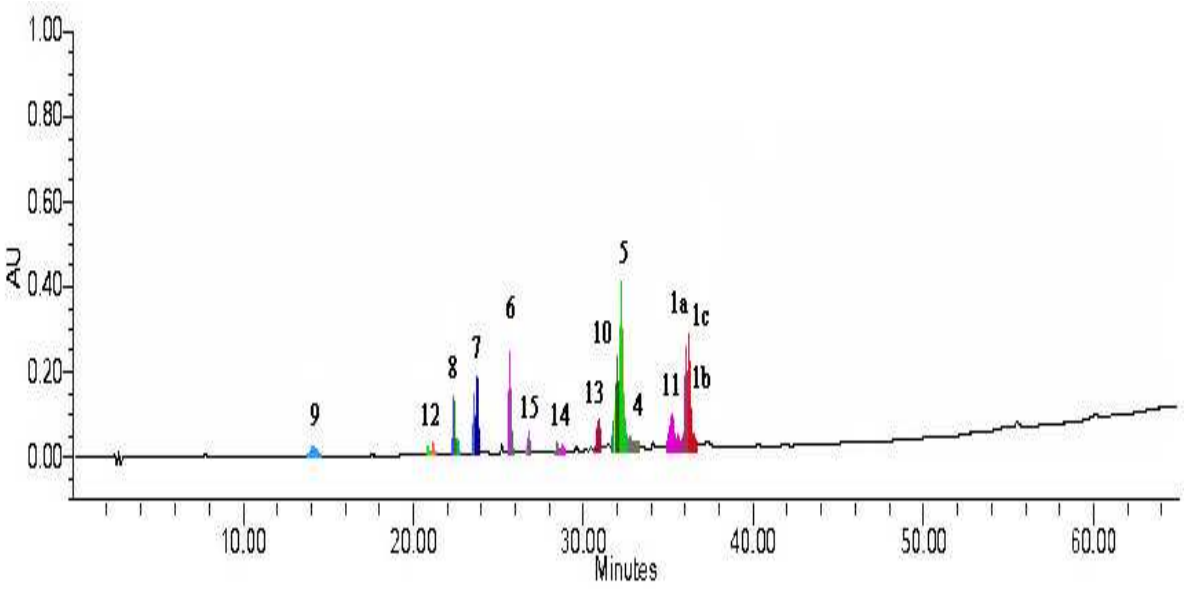


Figure 25. *Profil CLHP de l'hydrolysat chymotrypsique de 1H de l'α-Lactalbumine menée à 37°C dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4.*

L'hydrolysat de 1H constitue un état de transition : d'un côté, l'α-Lactalbumine ainsi que les peptides α 1–31 / 105–123 (Fraction 4) et α 1–31 / 104–123 (Fraction 11) ont disparus (Tableau VIII) et des coupures au sein de la région 61-104 sont observées pour la première fois. Tandis que de l'autre côté, 14 peptides font leur apparition, certains dans des fractions déjà existantes et d'autres au sein des nouvelles fractions. Le tableau VIII montre également que la fraction 1a qui contenait l'α-Lactalbumine, se subdivise en sous fractions 1a et 1c qui contiennent respectivement les peptides α 54–103 et α 54–104.

Les fractions 5 et 10, présentent trois nouveaux peptides de 2401 Da, 3834 Da et 1972 Da, dont la séquence en acides aminés correspond respectivement aux fragments α 19-31 / 111-118, α 1-9 / 19-29 / 111-123, et α 19-31 / 111-115. Au sein des fractions 7 et 8, sont apparus respectivement les peptides α 37–45 de 1003 Da, et α 10-15 de 773 Da.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Localisation sur le profil CLHP	*Masse (en Da)*	*Peptide*
9	564	α 32-36
12	652	α 105-110
	723	α 13-18
8	1597	α 37-50
	1121	α 10-18
	773	α 10-15
7	2142	α 32-50
	1003	α 37-45
6	914	α 54-60
	336	α 51-53
15	994	α 97-104
	1160	α 94-103
	1584	α 1-9 / 120-123
	1700	α 1-9 / 119-123
14	1348	α 94-104
	2128	α 1-9 / 116-123
13	5091	α 61-90 / 91-104
	3742	α 61-93
	3762	α 61-90 / 91-93
10	5820	α 1-9 / 10-31 / 105-123
	5186	α 1-9 / 10-31 / 111-123
	3834	α 1-9 / 19-29 / 111-123
	1972	α 19-31 / 111-115
5	4717	α 1-9 / 19-31 / 105-123
	4395	α 1-9 / 19-31 / 108-123
	4083	α 1-9 / 19-31 / 111-123
	2401	α 19-31 / 111-118
4	4904	α 1-9 / 19-31 / 104-123
11	4883	α 61-103
1a	5778	α 54-103
1c	5972	α 54-104
1b	5074	α 61-104

Tableau VIII. *Masses et Séquences des Peptides obtenus à 1H d'hydrolyse.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Les trois nouvelles fractions nommées 13, 14 et 15 se partagent les 9 peptides restant qui viennent de faire leur apparition. La fraction 13 contient trois peptides de masse molaire 5091 Da, 3742 Da et 3762 Da. Ces peptides ont pour séquence en acides aminés les fragments α 61–90 / 91–104, α 61-93, et α 61-90 / 91-93. Dans la fraction 14, ont été identifiés les peptides α 94-104, et α 1-9 / 116-123, de 1348 Da et 2128 Da de masse molaire respective. La dernière fraction, correspondant à la fraction 15, contient quatre peptides. Ceux-ci ont été identifiés comme les fragments α 97-104 (994 Da), α 94-103 (1160 Da), α 1-9 / 120-123 (1584 Da), et α 1-9 / 119-123 (1700 Da).

La cartographie peptidique représentée sur la figure 26, montre que 9 coupures supplémentaires ont été effectuées à 1H d'hydrolyse. Ces coupures sont localisées en $C_{terminal}$ de la Leucine^{15}, la Thréonine^{29}, l'Asparagine^{45}, la Méthionine^{90}, la Lysine^{93}, la Leucine^{96}, la Leucine^{115}, le Tryptophane^{118}, et la Leucine^{119}. Les coupures situées en $C_{terminal}$ de la Leucine^{119} et de la Leucine^{96}, apparaissent après que la chymotrypsine ait clivé la liaison en $C_{terminal}$ du Tryptophane^{118} et de la Lysine^{93}. Parmi l'ensemble des acides aminés clivés, quatre apparaissent purs la première fois, il s'agit des coupures effectuées au niveau de la Thréonine^{29}, l'Asparagine^{45}, la Méthionine^{90}, et de la Lysine^{93}. L'Asparagine ainsi que la Méthionine font partis comme la Leucine et l'Histidine des acides aminés clivés en seconde position, tandis que la Thréonine est plus rarement coupée. Par contre, une coupure en $C_{terminal}$ d'une Lysine ne devait pas être observée, puisqu'il s'agit d'une coupure effectuée par la trypsine. L'α chymotrypsine commercialisée, contient un faible pourcentage de trypsine ce qui peut expliquer l'apparition de cette coupure. Or celle-ci est également commercialisée avec un inhibiteur de la trypsine, ces coupures ne devaient donc pas apparaître pendant l'hydrolyse.

Un récapitulatif des coupures effectuées par la chymotrypsine est présenté dans le tableau IX. Celui-ci montre que les coupures primaires sont effectuées en $C_{terminal}$ des acides aminés aromatiques (Y, F, et W), puis apparaissent des coupures secondaires avec un ordre de préférence pour certains acides aminés comme la Leucine. Les coupures atypiques sont également représentées.

Coupure	***Acide (s) Aminé (s)***
Primaire	Y, F, W
Secondaire	L, H, M, N, T
Atypique	K

Tableau IX. *.Site de coupure de l'α chymotrypsine.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

© 2006 Tous droits réservés.

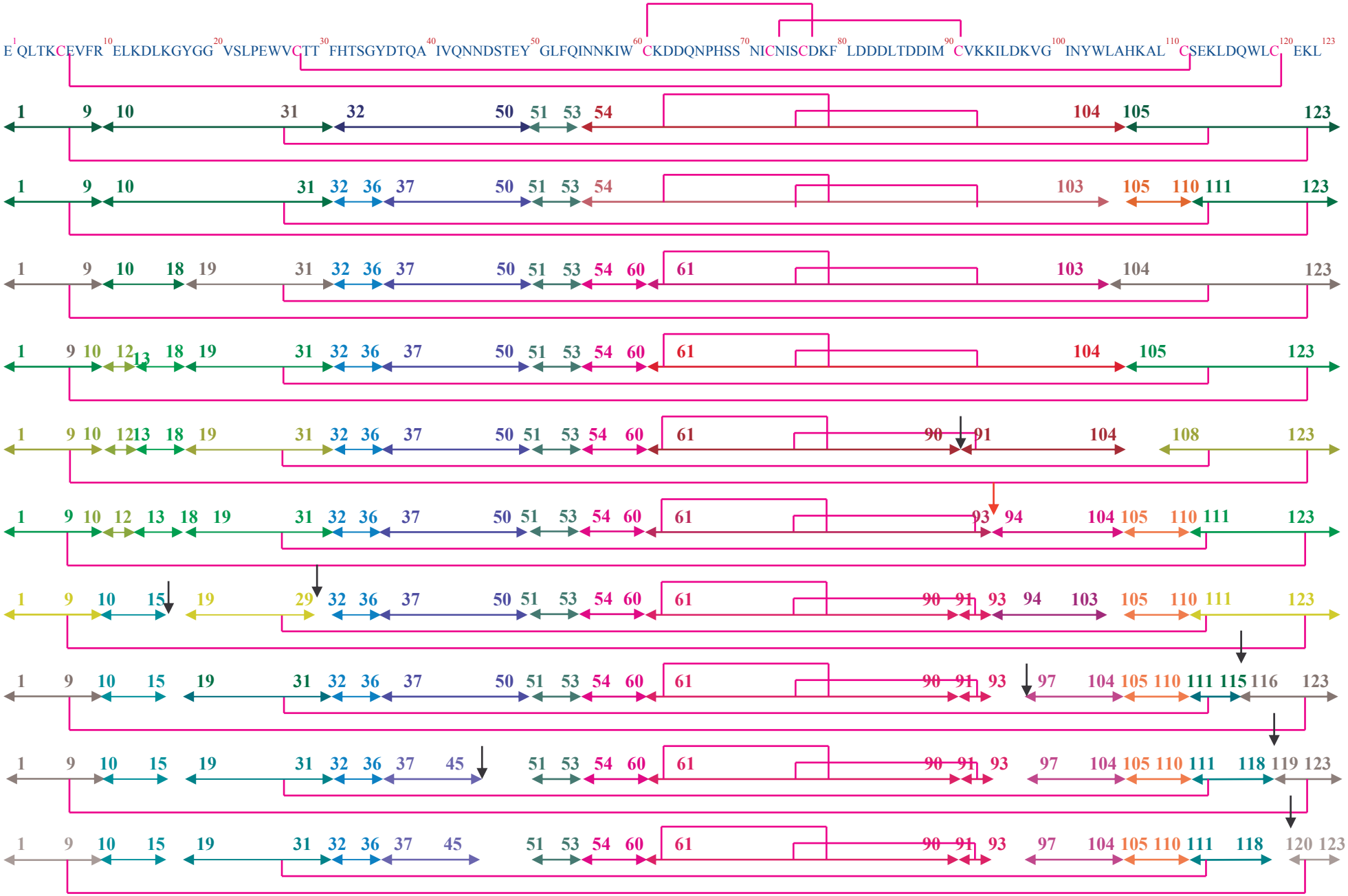


Figure 26. *Représentation de la population peptidique à 1H d'hydrolyse. Les flèches noires représentent les coupures primaires et secondaires, et les flèches rouges les coupures atypiques.*

II.3.10. Analyse de l'hydrolysat de 2 H

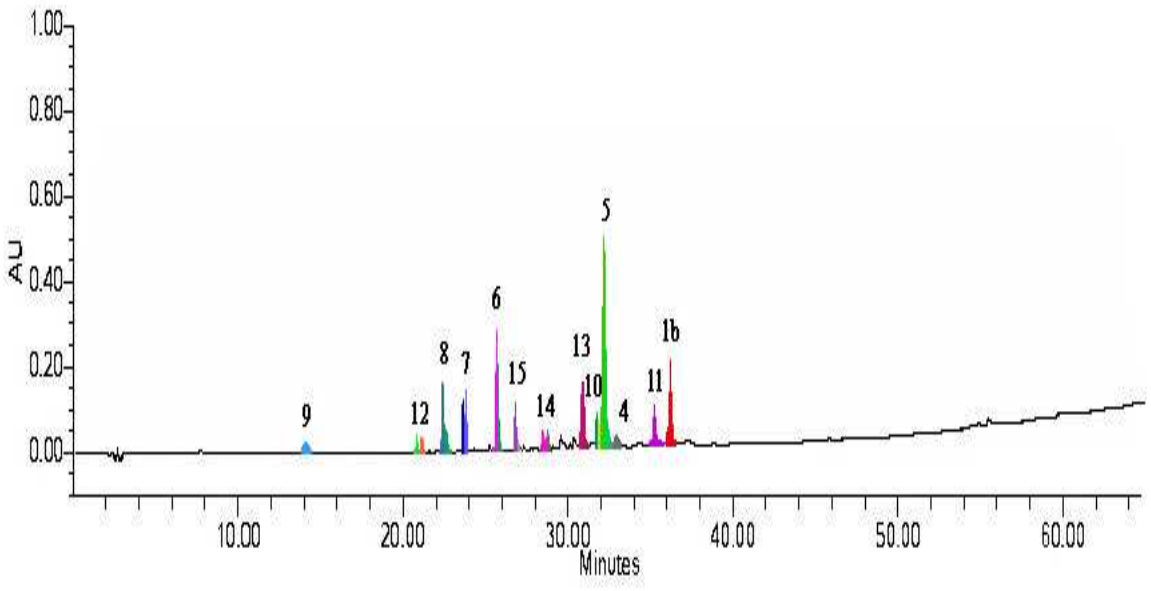


Figure 27. *Profil CLHP de l'hydrolysat chymotrypsique de 2H de l'α-Lactalbumine menée à 37°C dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4.*

Les fractions 1a et 1c ont disparu du profil CLHP (Figure 27), ce qui entraîne la perte des peptides α 54–103 et α 54–104 qui ne sont plus observés dans le tableau X. Deux autres peptides α 1–9 / 10–31 / 105–123 et α 1–9 / 10–31 / 111–123 présents au sein de la fraction 10 sont également hydrolysés.

L'hydrolysat de 2H génère trois nouveaux peptides de 1219 Da, 3870 Da, et 4903 Da de masse molaire, correspondent respectivement aux fragments α 95–104, α 61–94, et α 61-90 / 91-103. Le peptide α 95–104 est situé dans la fraction 14, tandis que les deux autres peptides sont localisés dans la fraction 13.

La cartographie peptidique (Figure 28) montre que les peptides α 61–94 et α 95–104, sont obtenus par la coupure en $C_{terminal}$ de la Lysine^{94} au sein du peptide α 61-104. C'est la deuxième fois que la chymotrypsine coupe en $C_{terminal}$ d'une Lysine. Le peptide α 61-90 / 91-103 provient soit de la coupure de la Tyrosine^{103} au sein du peptide α 61-90 / 91-104, soit de la coupure de la Méthionine^{90} située sur le peptide α 61-103, soit des deux peptides.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Localisation sur le profil CLHP	*Masse (en Da)*	*Peptide*
9	564	α 32-36
12	652 723	α 105-110 α 13-18
8	1597 1121 773	α 37-50 α 10-18 α 10-15
7	2142 1003	α 32-50 α 37-45
6	914 336	α 54-60 α 51-53
15	994 1160 1584 1700	α 97-104 α 94-103 α 1-9 / 120-123 α 1-9 / 119-123
14	1219 1348 2128	α 95-104 α 94-104 α 1-9 / 116-123
13	5091 4903 3870 3742 3762	α 61-90 / 91-104 α 61-90 / 91-103 α 61-94 α 61-93 α 61-90 / 91-93
10	3834 1972	α 1-9 / 19-29 / 111-123 α 19-31 / 111-115
5	4717 4395 4083 2401	α 1-9 / 19-31 / 105-123 α 1-9 / 19-31 / 108-123 α 1-9 / 19-31 / 111-123 α 19-31 / 111-118
4	4904	α 1-9 / 19-31 / 104-123
11	4883	α 61-103
1b	5074	α 61-104

Tableau X. *Masses et Séquences des Peptides obtenus à 2H d'hydrolyse.*

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

© 2006 Tous droits réservés.

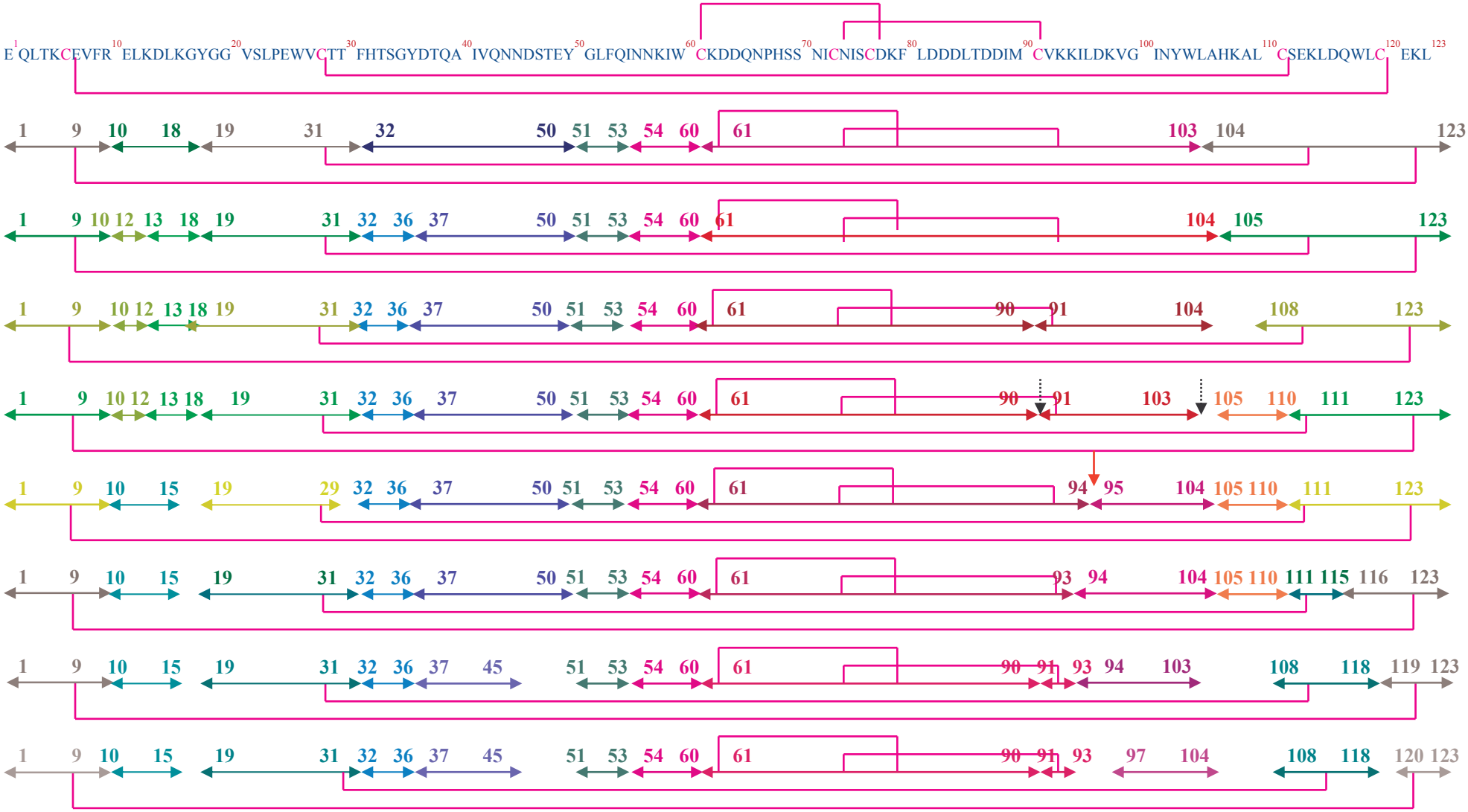


Figure 28. *Représentation de la population peptidique à 2H d'hydrolyse. Les flèches noires représentent les coupures primaires et secondaires, les flèches rouges les coupures atypiques, et les flèches représentées par des traits discontinus localisent des sites de coupure éventuels.*

II.3.11. Analyse de l'hydrolysat de 3 H

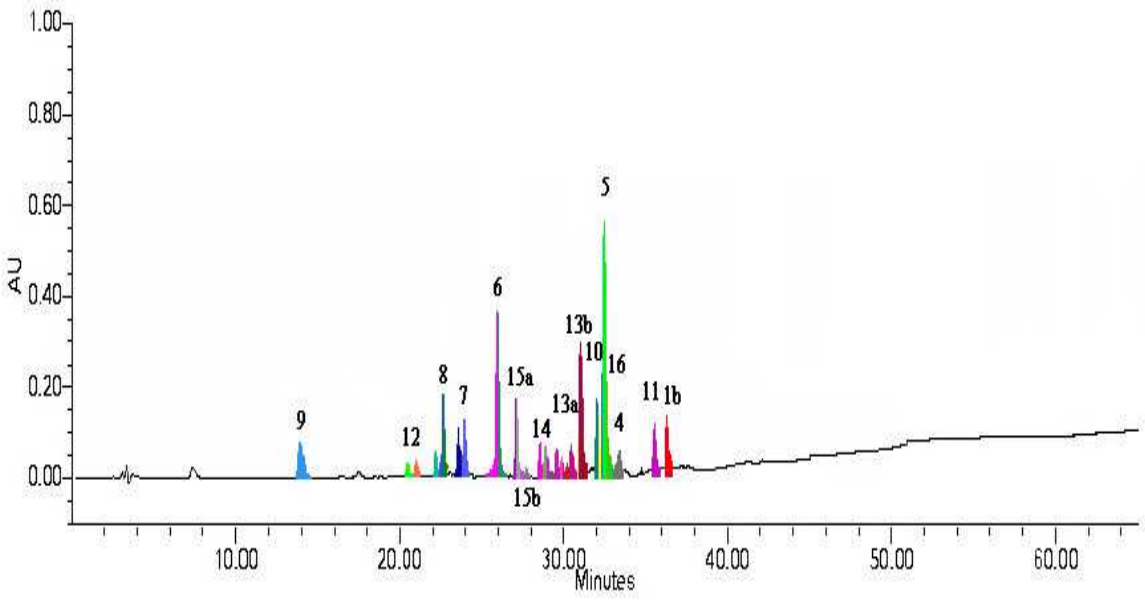


Figure 29. *Profil CLHP de l'hydrolysat chymotrypsique de 3H de l'α-Lactalbumine menée à 37°C dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4.*

Le profil CLHP de l'hydrolysat de 3H présente une nouvelle fraction qui a été nommée fraction 16 (Figure 29). Il montre également la division des fractions 13 et 15, en fractions 13a, 13b, 15a, et 15b. Le tableau XI montre qu'aucune disparition de peptides n'a été observée par comparaison avec l'hydrolysat de 2H. Par contre 12 peptides ont fait leur apparition.

Parmi les 12 nouveaux peptides, six d'entre eux sont localisés au sein de la fraction 14, et possèdent une masse molaire de 1107 Da, 844 Da, 3904 Da et 3776 Da. Les peptides de 1107 Da et 844 Da correspondent respectivement aux peptides α 96-104 et α 19–26. Les quatre peptides restant, correspondent deux à deux aux masses de 3904 Da et 3776 Da. Ces peptides ont été identifiés comme les fragments α 61–71 / 72–90 / 91–94, et α 61–68 / 69–90 / 91–94 pour la masse de 3904 Da et α 61–71 / 72–90 / 91–93, et α 61–68 / 69–90 / 91–93 en ce qui concerne la masse de 3776 Da.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Localisation sur le profil CLHP	*Masse (en Da)*	*Peptide*
9	564	α 32-36
12	652 723	α 105-110 α 13-18
8	1597 1121 773	α 37-50 α 10-18 α 10-15
7	2142 1003	α 32-50 α 37-45
6	914 336	α 54-60 α 51-53
15a	1160 1584	α 94-103 α 1-9 / 120-123
15b	994 1700	α 97-104 α 1-9 / 119-123
14	1219 1348 2128	α 95-104 α 94-104 α 1-9 / 116-123
	1107 844 3904 3904 3776 3776	α 96-104 α 19-26 α 61-71 / 72-90 / 91-94 α 61-68 / 69-90 / 91-94 α 61-71 / 72-90 / 91-93 α 61-68 / 69-90 / 91-93
13a	4903 3870 3762	α 61-90 / 91-103 α 61-94 α 61-90 / 91-93
13b	5091 3742	α 61-90 / 91-104 α 61-93
	2152	α 19-29 / 111-118

© 2006 Tous droits réservés.

http://www.univ-lille1.fr/bustl

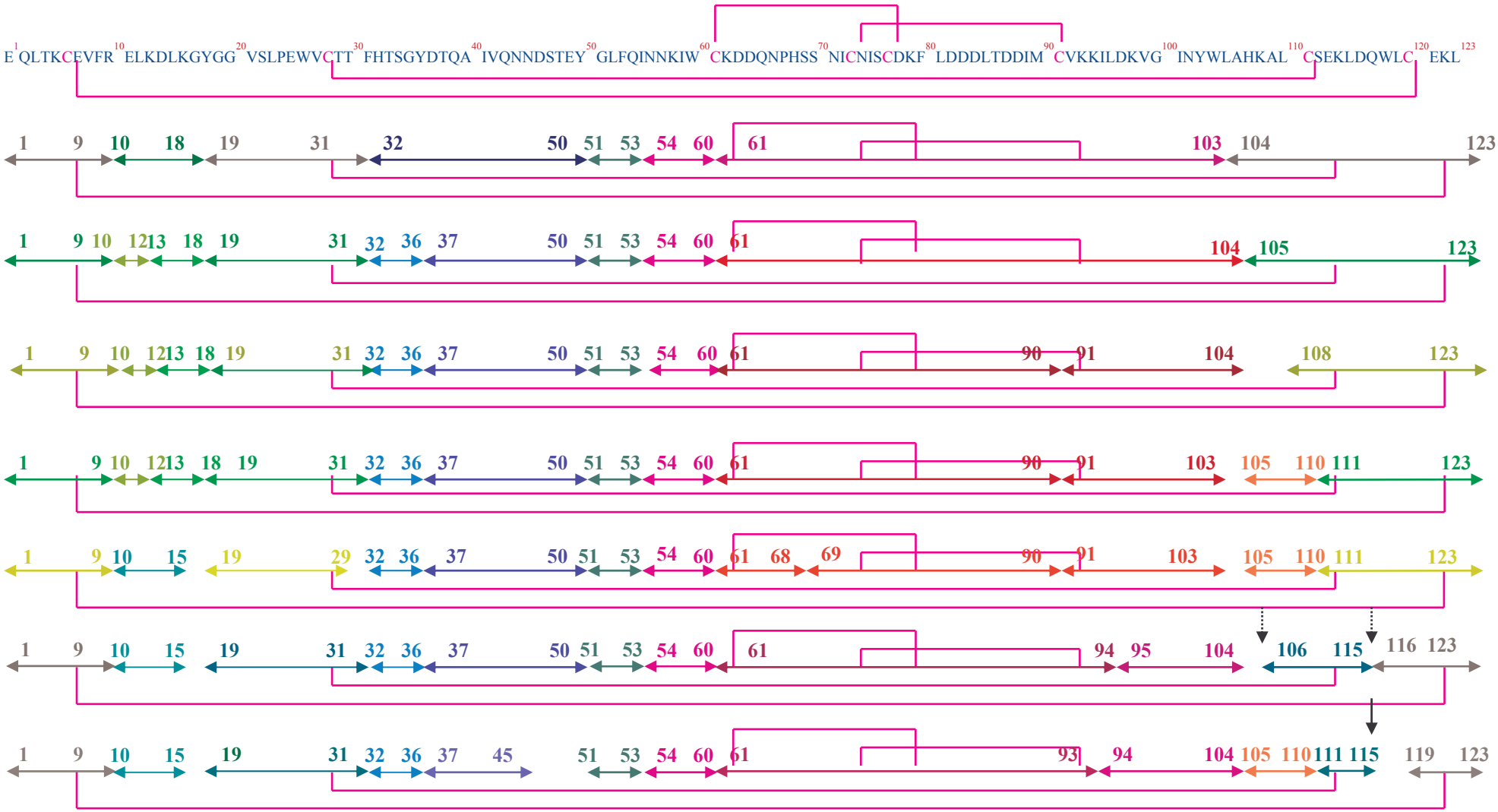
Localisation sur le profil CLHP	*Masse (en Da)*	*Peptide*
10	3834	α 1-9 / 19-29 / 111-123
	1972	α 19-31 / 111-115
	2713	α 19-31 / 108-118
	2266	α 19-29 / 110-118
5	4717	α 1-9 / 19-31 / 105-123
	4395	α 1-9 / 19-31 / 108-123
	4083	α 1-9 / 19-31 / 111-123
	2401	α 19-31 / 111-118
	2490	α 19-31 / 105-114 ou α 19-31 / 106-115
16	4921	α 61-68/ 69-90 / 91-103
4	4904	α 1-9 / 19-31 / 104-123
11	4883	α 61-103
1b	5074	α 61-104

Tableau XI. *Masses et Séquences des Peptides obtenus à 3H d'hydrolyse.*

Les fractions 13b, 10, et 5 contiennent respectivement des peptides de 2152 Da, 2713 Da, 2266 Da, et 2490 Da de masse molaire. La séquence de ces peptides a été identifiée comme les fragments α 19-29 / 111-118 (2152 Da), α 19-31 / 108-118 (2713 Da), α 19-29 / 110-118 (2266 Da), et α 19-31 / 105-114 ou α 19-31 / 106-115 (2490 Da). La fraction 16 contient un peptide de 4921 Da, dont la séquence en acides aminés correspond au fragment 61-68 / 69-90 / 91-103.

La cartographie peptidique présentée dans la figure 30, montre que les coupures par la chymotrypsine ont été faites en $C_{terminal}$ de : Trp^{26}, His^{68}, Asn^{71}, Ile^{95}, Lys^{108}, Leu^{115}, le Trp^{118}. La coupure en $C_{terminal}$ de la $Lysine^{108}$ fait partie des coupures atypiques de l'enzyme, ainsi que celle effectuée en $C_{terminal}$ de l'$Isoleucine^{95}$. Le peptide α 19-31 / 105-114 ou α 19-31 / 106-115 (Fraction 5), provient soit du clivage de la $Leucine^{105}$, soit du clivage de la $Lysine^{114}$. Il en est de même pour le peptide α 19-29 / 111-118 (Fraction 13b). Celui-ci peut provenir du clivage du peptide α 19-31 / 111-118 en $C_{terminal}$ de la $Thréonine^{29}$, ou de la coupure de la $Leucine^{110}$ au sein du peptide α 19-31 / 110-118, ou encore du clivage du peptide α 1-9 / 19-29 / 111-123 en $C_{terminal}$ du $Tryptophane^{118}$.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl



© 2006 Tous droits réservés.

http://www.univ-lille1.fr/bustl

© 2006 Tous droits réservés.

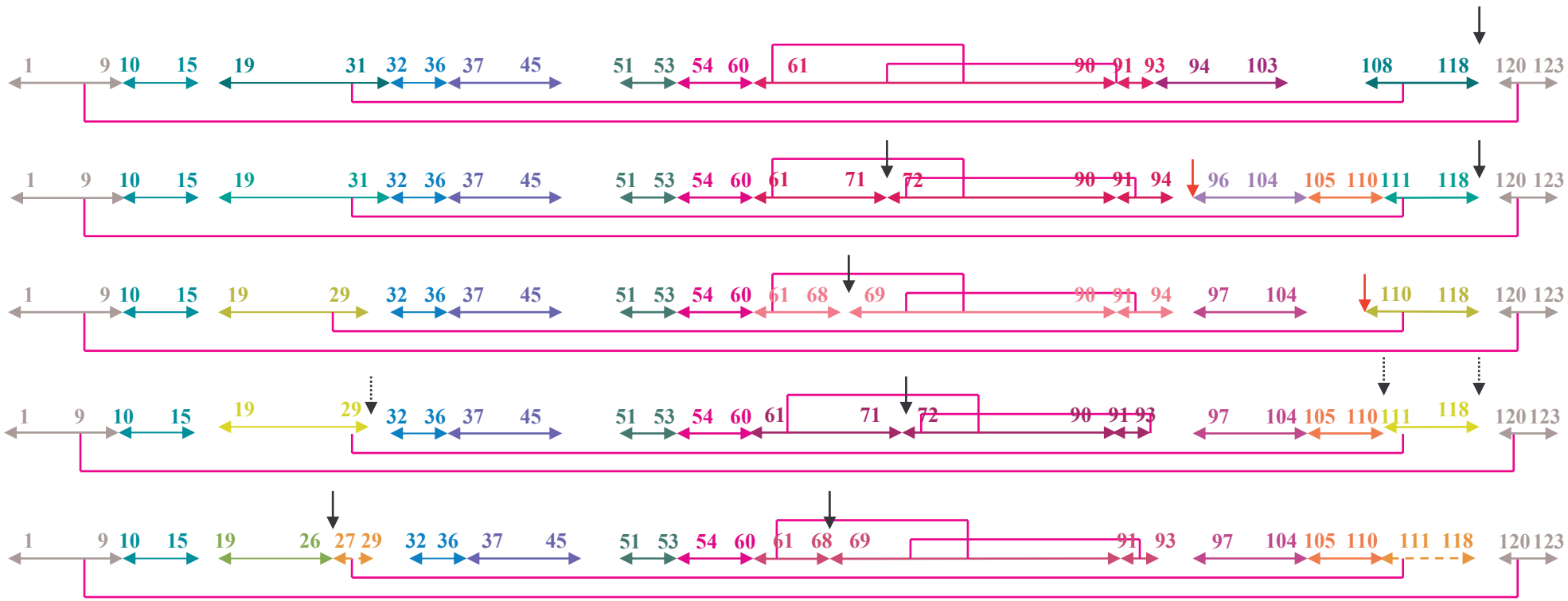


Figure 30. *Représentation de la population peptidique à 3H d'hydrolyse. Les flèches noires représentent les coupures primaires et secondaires, les flèches rouges les coupures atypiques, et les flèches représentées par des traits discontinus localisent des sites de coupure éventuels.*

http://www.univ-lille1.fr/bustl

Thèse de Véronique Dubois-Delval, Lille 1, 2006

Les peptides possèdant le pont disulfure Cys^{28}-Cys^{111} commencent à être clivés en $C_{terminal}$ du Trp^{26}, faisant apparaître le peptide α 19–26 (Fraction 14). Cependant le reste du peptide comprenant le pont disulfure n'a pas été retrouvé. Il est donc difficile d'identifier le peptide précurseur, mais il est possible de donner la séquence en acides aminés de ces peptides représentés dans le tableau XII. A partir de 3H d'hydrolyse, un ou plusieurs de ces peptides sont présents, mais par leur faible concentration au sein de l'hydrolysat, ils n'ont pas été détectés.

Séquence	***Masse (Da)***
α 27–31 / 108–118	1886
α 27–31 / 111–118	1576
α 27–31 / 111–115	1147
α 27–29 / 108–118	1640
α 27–29 / 111–118	1328
α 27–29 / 111–115	899

Tableau XII. *Séquences des Peptides contenant le pont disulfure Cys^{28}-Cys^{111}.*

Lors de l'étude de Polverino de Laureto *et al.,* (1999), l'hydrolyse de l'apo–α Lac par l'α chymotrypsine menée à 22°C et avec un rapport E/S de 1/500 (w/w) pendant 3H, a généré le peptide α 1–31 / 105–123 de 5800 Da de masse moléculaire. Ce peptide absent de l'hydrolysat de 3H, n'est présent que jusque 30 minutes d'hydrolyse, ceci montre que l'hydrolyse de l'α Lactalbumine menée à 37°C avec un rapport E/S de 1/100, est plus rapide que celle menée par Polverino de Laureto *et al*., (1999).

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

II.3.12. Analyse de l'hydrolysat de 12 H

A partir de 12H d'hydrolyse, la population peptidique s'oriente vers des peptides de petite et moyenne taille (Tableau XIII). Une nouvelle fraction apparaît sur le profil chromatographique (Figure 31), celle-ci est appelée fraction 17.

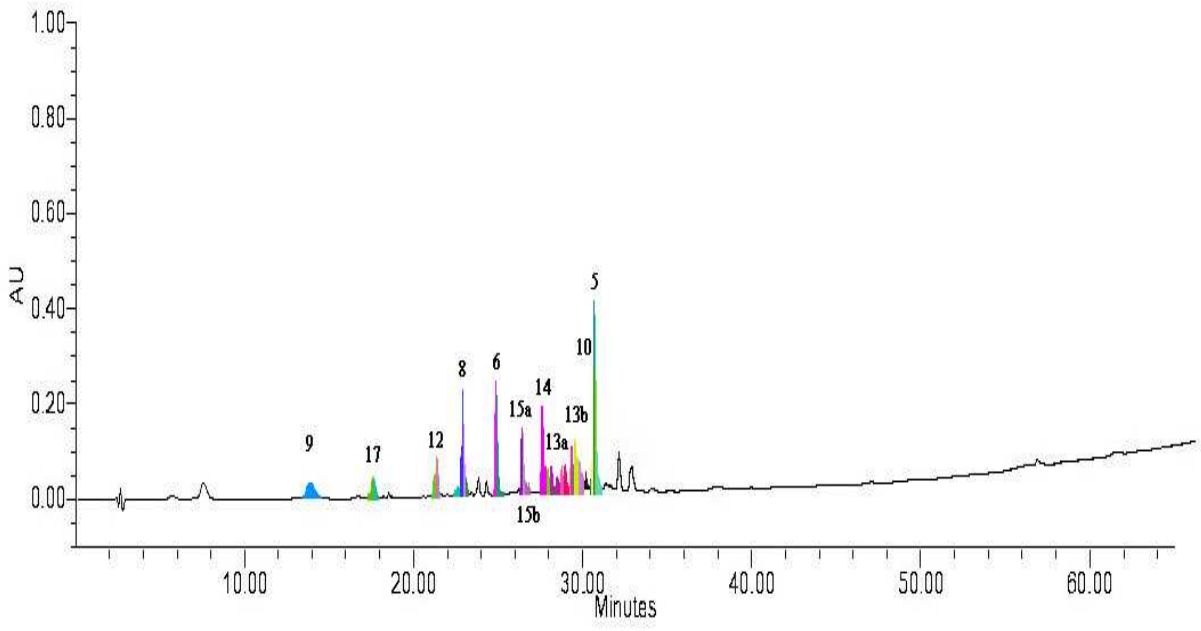


Figure 31. *Profil CLHP de l'hydrolysat chymotrypsique de 12H de l'α-Lactalbumine menée à 37°C dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4.*

Le profil CLHP montre également la disparition de cinq fractions : 11, 1b, 4, 16 et 7. Les quatre premières fractions contenaient les derniers peptides de grande taille : α 61-103 (4883 Da), α 61-104 (5074 Da), α 1-9 / 19-31 / 104-123 (4904 Da), et α 61-68/ 69-90 / 91-103 (4921 Da). La fraction 7 contenait les peptides α 32–50 (2142 Da) et α 37-45 (1003 Da). D'autres peptides ont également disparu : les peptides α 1-9 / 19-31 / 105-123, α 1-9 / 19-31 / 108-123 et α 1-9 / 19-31 / 111-123 localisés dans la fraction 5, le peptide α 19-31 / 108-118 situé dans la fraction 10, les peptides α 61-90 / 91-104 et α 61-93 dans la fraction 13b, les peptides α 61-90 / 91-103 et α 61-94 au sein de la fraction 13a, et le peptide α 96-104 dans la fraction 14. La plupart de ces peptides sont des peptides intermédiaires.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Localisation sur le profil CLHP	*Masse (en Da)*	*Peptide*
9	564	α 32-36
17	417	α 10-12
	267	α 30-31
12	652	α 105-110
	723	α 13-18
	773	α 37-43
8	1597	α 37-50
	1121	α 10-18
	773	α 10-15
	808	α 97-103
6	914	α 54-60
	336	α 51-53
15a	1160	α 94-103
	1584	α 1-9 / 120-123
	1328	α 4-9 / 119-123
15b	994	α 97-104
	1700	α 1-9 / 119-123
14	1219	α 95-104
	1348	α 94-104
	2128	α 1-9 / 116-123
	844	α 19-26
	3904	α 61-71 / 72-90 / 91-94
	3904	α 61-68 / 69-90 / 91-94
	3776	α 61-71 / 72-90 / 91-93
	3776	α 61-68 / 69-90 / 91-93
13a	3762	α 61-90 / 91-93
	1724	α 19-29 / 111-115
	1440	α 79-90
13b	2152	α 19-29 / 111-118
	2475	α 69-74 / 86-103
	2241	α 61-68 / 75-85

© 2006 Tous droits réservés.

http://www.univ-lille1.fr/bustl

Localisation sur le profil CLHP	*Masse (en Da)*	*Peptide*
10	**3834**	**α 1-9 / 19-29 / 111-123**
	1972	**α 19-31 / 111-115**
	2266	**α 19-29 / 110-118**
5	**2490**	**α 19-31 / 105-114 ou**
		α 19-31 / 106-115
	2401	**α 19-31 / 111-118**
	2340	**α 19-29 / 109-118**
	1663	**α 61-68 / 75-80**

Tableau XIII. *Masses et Séquences des Peptides obtenus à 12H d'hydrolyse.*

Onze peptides ont fait leur apparition au sein du tableau XIII. La nouvelle fraction 17 contient deux peptides. Ce sont de petits peptides de 417 Da et 267 Da de masse molaire, dont la séquence en acides aminés correspond respectivement aux peptides α 10-12 et α 30-31. Dans les fractions 12 et 8, sont apparus respectivement le peptide α 37-43 de 773 Da, et le peptide α 97-103 de 808 Da. Au sein de la fraction 15a, un peptide de 1328 Da de masse molaire a été détecté puis identifié comme le peptide α 4–9 / 119–123. Les six peptides restant ont fait leur apparition au sein des fractions 13a, 13b et 5. Chacune de ces fractions en contient deux. La fraction 13a contient les peptides α 19-29 / 111-115 et α 79-90, de 1724 Da et 1440 Da de masse molaire respective. Deux peptides de 2475 Da et 2241 Da sont apparus dans la fraction 13b, et leur séquence en acides aminés correspond respectivement aux fragments α 69-74 / 86-103, et α 61-68 / 75-85. Les deux derniers peptides isolés au sein de la fraction 5, possèdent une masse molaire de 2340 Da et 1663 Da. Après identification la séquence de ces peptides correspond respectivement aux fragments α 19-29 / 109-118, et α 61-68 / 75-80.

Le peptide α 61-68 / 75-80 correspond au peptide antimicrobien LDC identifié par Pellegrini *et al.,* (1999). Ce peptide a été obtenu au bout de 3H d'hydrolyse, tandis que dans cette étude, il n'est pas détecté dans l'hydrolysat de 3H. Ceci est dû au fait que l'hydrolyse de la région 61-104 est très lente et que les sites de coupure pour la chymotrypsine ne sont pas très accessibles.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

La figure 32 représentant la cartographie peptidique à 12H d'hydrolyse, montre que les coupures ont été effectuées en $C_{terminal}$ de : la Leucine[3], la Leucine[12], la Thréonine[29], la Glutamine[43], l'Asparagine[74], l'Acide Aspartique[78], la Phénylalanine[80], la Leucine[85], la Tyrosine[103], et la Lysine[108]. C'est la première fois que la chymotrypsine coupe après une Glutamine et un Acide Aspartique. La Glutamine fait partie des acides aminés que la chymotrypsine coupe secondairement tandis que normalement l'Acide Aspartique n'est pas clivé. Le peptide α 19-29 / 111-115 peut provenir soit du peptide α 19-31 / 111-115 par coupure de la Thr[29] en $C_{terminal}$, soit du clivage de la Leu[115] au sein du peptide α 19-29 / 111-118.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

© 2006 Tous droits réservés.

http://www.univ-lille1.fr/bustl

© 2006 Tous droits réservés.

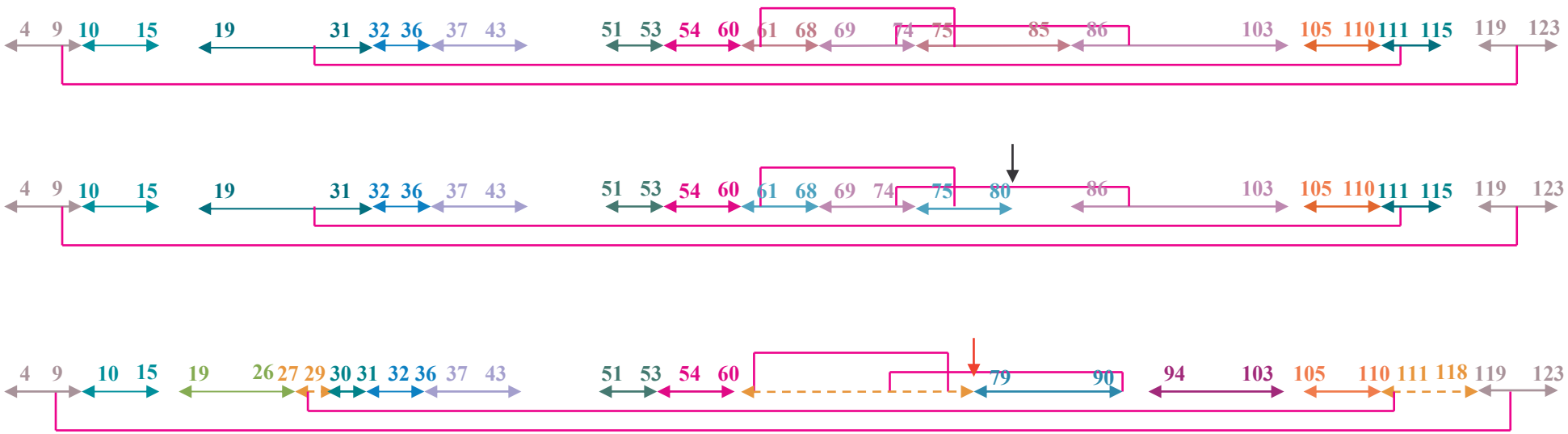


Figure 32. *Représentation de la population peptidique à 12H d'hydrolyse. Les flèches noires représentent les coupures primaires et secondaires, les flèches rouges les coupures atypiques, et les flèches représentées par des traits discontinus localisent des sites de coupure éventuels.*

http://www.univ-lille1.fr/bustl

Thèse de Véronique Dubois-Delval, Lille 1, 2006

II.3.13. Analyse de l'hydrolysat de 24 H

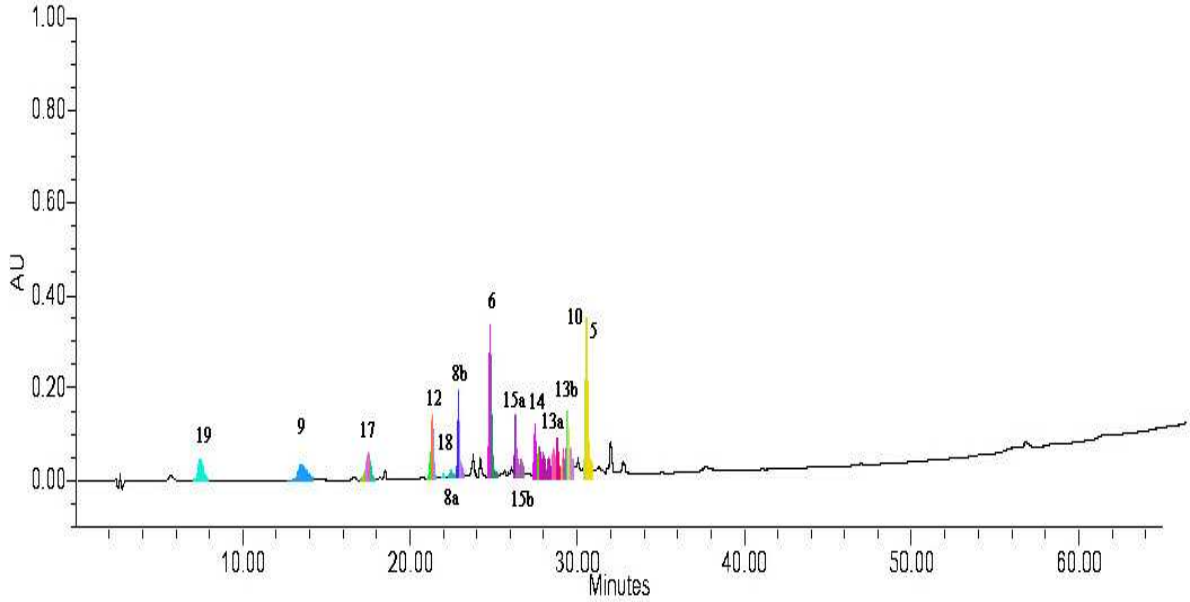


Figure 33. *Profil CLHP de l'hydrolysat chymotrypsique de 24H de l'α-Lactalbumine menée à 37°C dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4.*

L'hydrolysat de 24H présente deux nouvelles fractions peptidiques éluées au début du gradient d'élution (Figure 33). Il s'agit des fractions 18 et 19 (Tableau XIV) qui contiennent respectivement le peptide α 14-18, peptide de 595 Da, et le peptide α 16-18, petit peptide de 367 Da.

Huit autres peptides ont également fait leur apparition au sein de l'hydrolysat de 24H. Dans la fraction 17, sont générés les peptides α 54-57 de 471 Da et α 61-62 / 75-78 de 684 Da. La masse théorique du peptide α 54-57 est en fait de 486 Da. Or, la fragmentation de l'ion de masse 471 Da a permis d'identifier ce peptide comme le fragment α 54-57. Le même phénomène a été observé avec le peptide α 54-60 qui apparaît au cours de l'hydrolyse soit sous la masse de 915 Da, soit sous la masse de 898 Da. Les peptides α 54-60 (Fraction 6) et α 54-57 (Fraction 17) possèdent en $N_{terminal}$ une Glutamine, qui en milieu acide, peut se cycliser en acide pyroglutamique en perdant la fonction NH3 de 17 Da (Kouach *et al.,* 1994).

Au sein des fractions 12 et 8b, sont localisés respectivement un peptide de 888 Da et un de 694 Da, dont les séquences en acides aminés correspondent aux fragments α 37-44 et α 98-103. Deux nouveaux peptides ont été localisés dans la fraction 15a, ces peptides de 1228 Da et 1034 Da de masse molaire, ont été identifiés respectivement comme les fragments

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

α 5-9/ 119-123 et α 95-103. Les deux derniers peptides apparaissant dans cet hydrolysat de 24H sont localisés dans la fraction 13a. Ces peptides ayant pour masse molaire 2813 Da et 1165 Da correspondent respectivement aux fragments α 61-68 / 75-90 et α 81-90.

Localisation sur le profil CLHP	*Masse (en Da)*	*Peptide*
19	367	α 16-18
9	564	α 32-36
17	684	α 61-62 / 75-78
	471	α 54-57
	417	α 10-12
	267	α 30-31
12	652	α 105-110
	723	α 13-18
	773	α 37-43
	888	α 37-44
18	595	α 14-18
8a	773	α 10-15
8b	1597	α 37-50
	808	α 97-103
	694	α 98-103
6	914	α 54-60
	336	α 51-53
15a	1160	α 94-103
	1034	α 95-103
	1228	α 5-9 / 119-123
	1584	α 1-9 / 120-123
	1328	α 4-9 / 119-123
15b	994	α 97-104
	1700	α 1-9 / 119-123

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

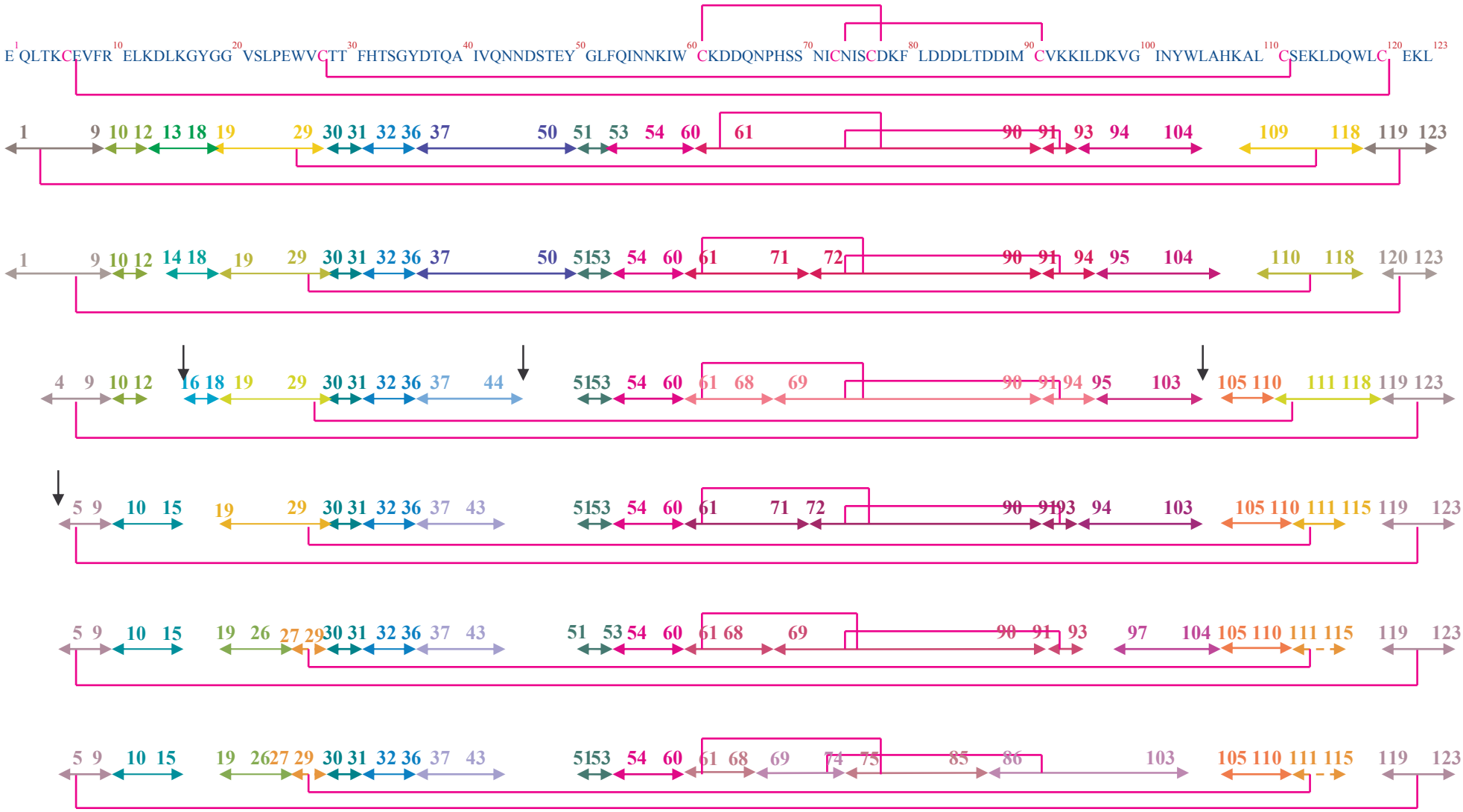
Localisation sur le profil CLHP	*Masse (en Da)*	*Peptide*
14	1219	α 95-104
	1348	α 94-104
	844	α 19-26
	3904	α 61-71 / 72-90 / 91-94
	3904	α 61-68 / 69-90 / 91-94
	3776	α 61-71 / 72-90 / 91-93
	3776	α 61-68 / 69-90 / 91-93
13a	3762	α 61-90 / 91-93
	1724	α 19-29 / 111-115
	1440	α 79-90
	2813	α 61-68 / 75-90
	1165	α 81-90
13b	2152	α 19-29 / 111-118
	2475	α 69-74 / 86-103
	2241	α 61-68 / 75-85
10	2266	α 19-29 / 110-118
5	2340	α 19-29 / 109-118

Tableau XIV. *Masses et Séquences des Peptides obtenus à 24H d'hydrolyse.*

Le Tableau XIV montre également que sept peptides ont disparus à 24H d'hydrolyse. Ceux-ci correspondent aux peptides α 19-31 / 111-118, α 19-31 / 105-114 (ou 19-31 / 106-115), et α 61-68 / 75-80 dans la fraction 5, aux peptides α 1-9 / 19-29 / 111-123 et α 19-31 / 111-115 localisés au sein de la fraction 10, au peptide α 1-9 / 116-123 dans la fraction 14, et au peptide α 10-18 au sein de la fraction 8.

La cartographie peptidique (Figure 34) montre que les coupures de la chymotrypsine sont effectuées en $C_{terminal}$ de : la Thréonine[4], la Leucine[15], l'Asparagine[44], l'Asparagine[57], la Lysine[62], l'Asparagine[74], la Phénylalanine[80], l'Acide Aspartique[97], et la Tyrosine[103].

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl



© 2006 Tous droits réservés.

http://www.univ-lille1.fr/bustl

© 2006 Tous droits réservés.

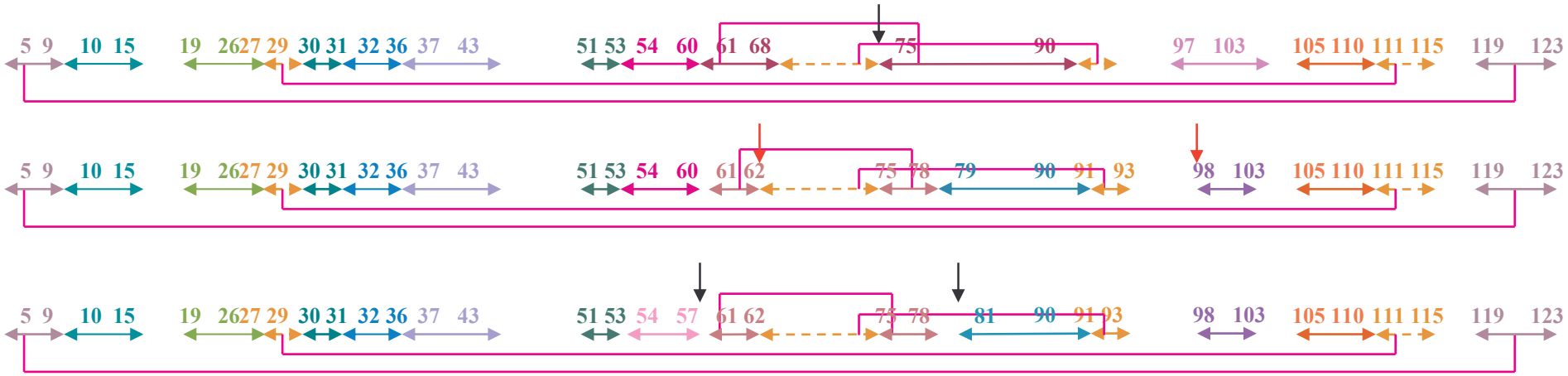


Figure 34. *Représentation de la population peptidique à 24H d'hydrolyse. Les flèches noires représentent les coupures primaires et secondaires, et les flèches rouges représentent les coupures atypiques.*

http://www.univ-lille1.fr/bustl

Thèse de Véronique Dubois-Delval, Lille 1, 2006

Un récapitulatif de l'ensemble des coupures effectuées par la chymotrypsine au cours de cette cinétique d'hydrolyse a été établi (Tableau XV). Celui-ci montre que les coupures primaires ont bien été effectuées en $C_{terminal}$ des acides aminés aromatiques (Y, F, et W). Les coupures secondaires ont été réalisées avec un ordre de préférence pour certains acides aminés, en particulier pour la Leucine. Les coupures atypiques ont été faites en $C_{terminal}$ de trois acides aminés particuliers : la Lysine, l'Acide Aspartique et l'Isoleucine.

Coupure	*Acide (s) Aminé (s)*
Primaire	Y, F, W
Secondaire	L, H, M, N, T, Q
Atypique	K, I, D

Tableau XV. *.Site de coupure de l'α chymotrypsine.*

II.3.14 Répartition et Evolution des peptides

Les figures 35 à 40 présentent une partie des peptides obtenus au cours de la cinétiques d'hydrolyse de l'α-Lactalbumine par l'α chymotrypsine en fonction du temps d'hydrolyse (chaque couleur représentant un temps d'hydrolyse). Elles montrent également que les peptides générés se répartissent en plusieurs familles, au sein desquelles plusieurs chemins coexistent. Le point commun de l'ensemble des familles obtenues correspond au peptide α 1–50 / 51–123 (Figure 35), premier peptide intermédiaire obtenu à partir de l'hydrolyse chymotrypsique de l'α-Lactalbumine. Neuf familles de peptides peuvent être répertoriées.

Le peptide α 1–50 / 51–123 possède deux sites de coupure pour la chymotrypsine, le premier est situé entre la liaison Tyr^{36}-Asp^{37} et le deuxième entre la liaison Phe^{53}-Gln^{54} (Figure 35). Il génère ainsi deux peptides :

- le peptide α 1–36 / 51–123 qui va être le point de départ de la famille αI (Figure 35)
- et le peptide α 1–50 / 54–123 qui va être le point de départ de la famille αII (Figure 35). Cette coupure est plus importante par rapport à la première coupure.

Les peptides intermédiaires obtenus à partir du peptide α 1–36 / 51–123 (αI)

Le peptide α 1–36 / 51–123 va être clivé en $C_{terminal}$ de la Phe^{53}, pour générer le peptide α 1–36 / 54–123 qui va ensuite générer le peptide α 1–31 / 54–123 par la coupure de la liaison Phe^{31}-His^{32}. Ce dernier va être clivé en $C_{terminal}$ de la Tyr^{103} et va libérer deux peptides : le peptide α 1–31 / 104–123 (Figure 35) et le peptide α 54–103, point de départ de la famille αV (Figure 38).

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

© 2006 Tous droits réservés.

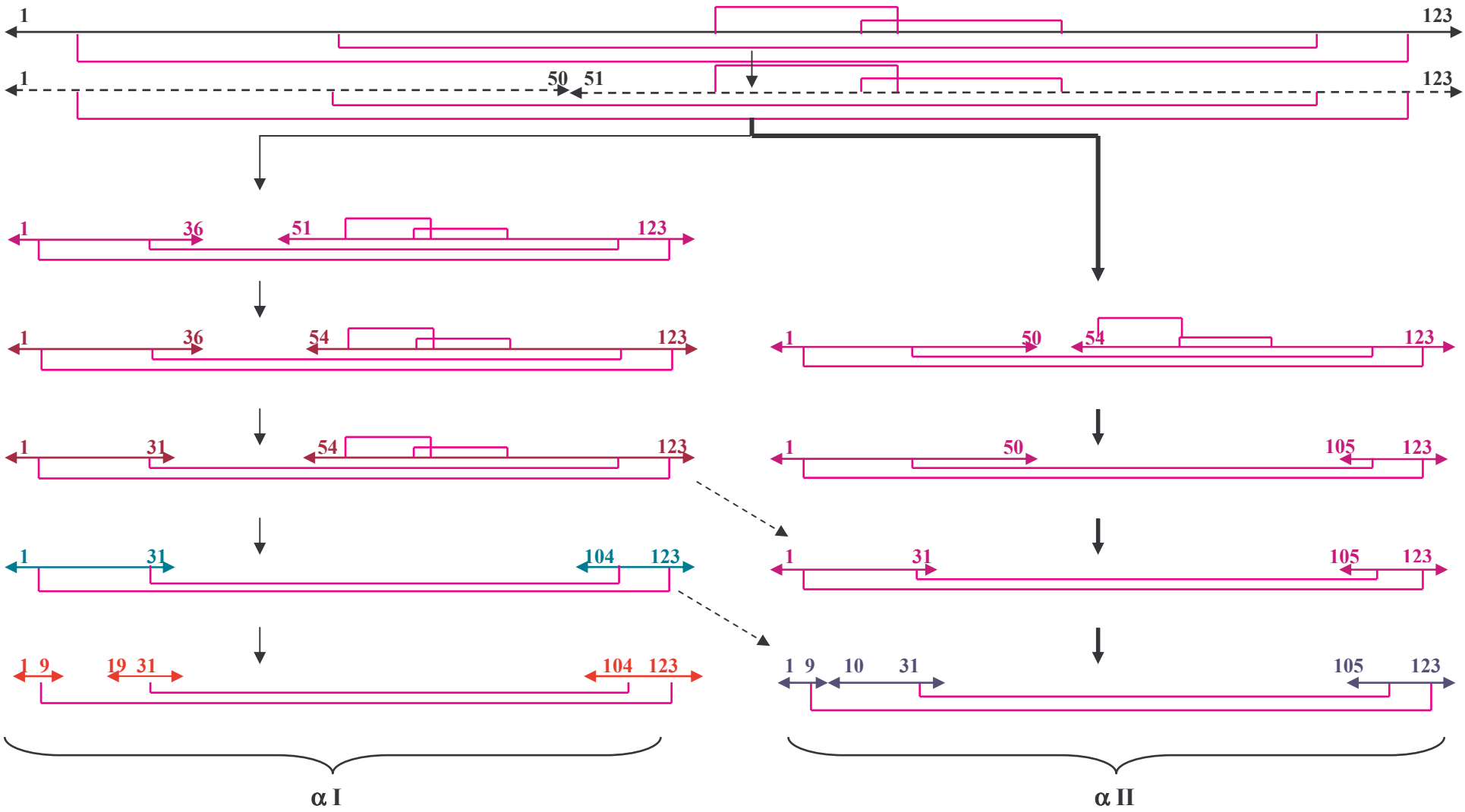


Figure 35. *Evolution des peptides appartenant à la famille αI et αII au cours du temps lors de l'hydrolyse de l'α-Lactalbumine par l'α chymotrypsine.*

0,5 min, 1 min, 2,5 min, 5 min et 10 min, 15 min, 30 min, 1H, 3H, 12H, 24H.

Le peptide α 1–31 / 104–123 va ensuite générer le peptide α 1–9 / 19-31 / 104–123 lors de la coupure de la liaison Tyr[18]-Gly[19], ainsi que le peptide α 10-18 qui va constituer le point de départ de la famille αVIII (Figure 40).

Les peptides intermédiaires obtenus à partir du peptide α 1–50 / 54–123 (αII)

Le peptide α 1–50 / 54–123 va être clivé en $C_{terminal}$ du Trp[104] pour générer le peptide α 1–50 / 105–123 (Figure 35) et le peptide α 54-104 qui va également être le point de départ de la famille αV (Figure 38). Le peptide α 1–50 / 105–123 va ensuite être clivé en $C_{terminal}$ de la Phe[31], ce qui libére le peptide α 32-50 qui va être le point de départ de la famille αVII (Figure 40) et le peptide α 1-31 / 105-123 (Figure 35). Celui-ci va ensuite générer le peptide α 1–9 / 10-31 / 105–123 aprés la coupure de la liaison Phe[9]-Arg[10].

Les peptides α 1–9 / 19-31 / 104–123 (αI) et α 1–9 / 10-31 / 105–123 (αII) sont le point de départ de la famille αIII (Figure 36).

Les peptides intermédiaires obtenus à partir du peptide α 1–9 / 19-31 / 104–123 (αIII)

Le peptide α 1–9 / 19-31 / 104–123 va générer deux peptides : le peptide α 1–9 / 19-31 / 105–123 par coupure de la Leucine[105] en $C_{terminal}$ (voie mineure), et le peptide α 1–9 / 19-31 / 108–123 après la coupure de l'Histidine[107] (voie majeure). Ce dernier va lui-même générer les peptides α 1–9 / 119-123 et α 19-31 / 108–118 après le clivage de la liaison Trp[118]-Leu[119]. Ce dernier va ensuite être coupé en $C_{terminal}$ de la Thréonine[29] et de la Lysine[108] pour donner lieu au peptide α 19-29 / 109–118, qui va lui-même générer le peptide α 19-29 / 110–118, par la coupure de la liaison Ala[109]-Leu[110].

Les peptides intermédiaires obtenus à partir du peptide α 1–9 / 10-31 / 105–123 (αIII)

Comme le peptide α 1–9 / 19-31 / 104–123, le peptide α 1–9 / 10-31 / 105–123 va générer deux peptides : le premier provient de la coupure en $C_{terminal}$ de la Leucine[110] et correspond au peptide α 1–9 / 10-31 / 111–123 (voie mineure). Le second peptide obtenu correspond au peptide α 1–9 / 19-31 / 105–123 (voie majeure) lors du clivage de la liaison Tyr[18]-Gly[19]. Ce dernier va lui-même être clivé en $C_{terminal}$ de la Leucine[110] pour générer le peptide α 1–9 / 19-31 / 111–123 qui va constituer le point de départ de la famille αIV (Figure 37). Celui-ci peut également être obtenu (voie mineure) à partir du peptide α 1–9 / 19-31 / 108–123 par coupure de la Leucine[110] et du peptide α 1–9 / 10-31 / 111–123 par coupure de la Tyrosine[18].

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

© 2006 Tous droits réservés.

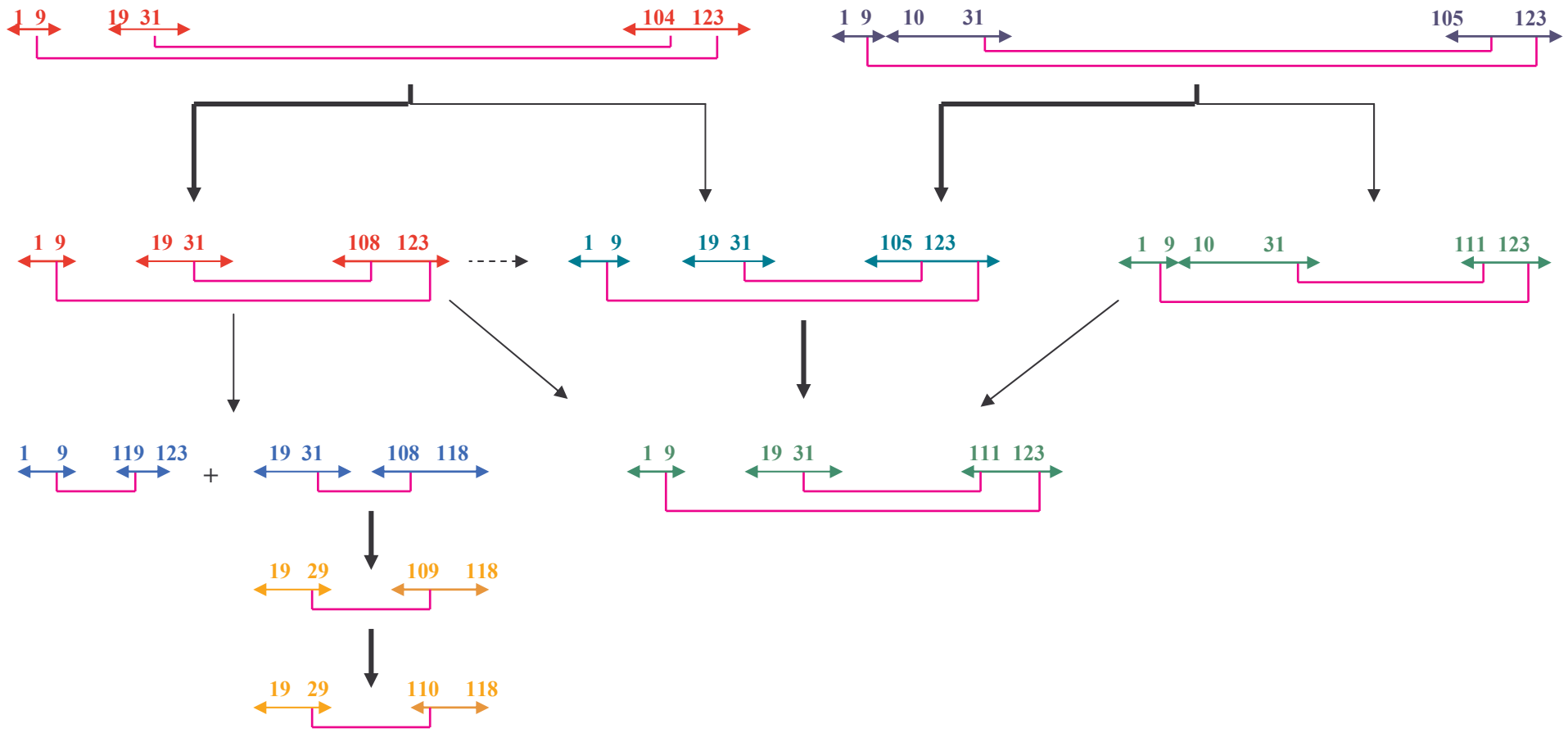


Figure 36. *Evolution des peptides appartenant à la famille αII au cours du temps lors de l'hydrolyse de l'α-Lactalbumine par l'α chymotrypsine.*

0,5 min, 1 min, 2,5 min, 5 min et 10 min, 15 min, 30 min, 1H, 3H, 12H, 24H.

http://www.univ-lille1.fr/bustl

Les peptides intermédiaires obtenus à partir du peptide α 1–9 / 19-31 / 111–123 (αIV)

Au sein de cette famille αIV (Figure 37), la séparation des ponts disulfures Cys^{6}-Cys^{120} et Cys^{28}-Cys^{111}est observée. Le peptide α 1–9 / 19-31 / 111–123 va générer simultanément cinq peptides. Le premier peptide obtenu, correspond au peptide α 1–9 / 19-29 / 111–123 par coupure de la Thréonine^{29}. La deuxième coupure effectuée en $C_{terminal}$ de la Leucine^{115}, a permis de libérer les peptides α 1–9 / 116-123 et α 19-31 / 111–115. Les deux derniers peptides obtenus, correspondent aux peptides α 1–9 / 119-123 et α 19-31 / 111–118 lors de la coupure du Tryptophane^{118}. Le peptide α 19-31 / 111–118 peut aussi générer le peptide α 19-31 / 111–115 par coupure de la Leu^{115}. De la même façon, le peptide α 1-9 / 116–123, par clivage de la liaison Trp^{118}-Leu^{119}, peut donner lieu au peptide α 1-9 / 119–123.

- *Les peptides intermédiaires obtenus à partir du peptide α 1–9 / 119–123 (αIV)*

Le peptide α 1–9 / 119–123 va générer d'un côté le peptide α 1–9 / 120–123 par coupure de la Leu^{119} en $C_{terminal}$, et de l'autre côté, par coupure de la liaison Leu^{3}-Thr^{4}, le peptide α 4–9 / 119–123, qui va lui-même générer le peptide α 5–9 / 119–123 par coupure de la Thr^{4} en $C_{terminal}$ (Figure 37)

- *Les peptides intermédiaires obtenus à partir du peptide α 1–9 / 19-29 / 111–123 (αIV)*

Le peptide α 1–9 / 19-29 / 111–123 (Figure 37), par coupure de la liaison Trp^{118}-Leu^{119}, va libérer le peptide α 1–9 / 119–123 et le peptide α 19-29 / 111–118. Celui-ci peut également être obtenu à partir du peptide α 19-31 / 111–118 lors de la coupure de la Thr^{29}. Ce peptide α 19-29 / 111–118 va également générer le peptide α 19-29 / 111–115 par coupure de la Leu^{115} en $C_{terminal}$. Il peut aussi être obtenu par clivage de la Thr^{29} au sein du peptide α 19-31 / 111–115.

Les peptides intermédiaires obtenus à partir des peptides α 54-103 et α 54-104 (αV)

La cinquième famille αV (Figure 38), commence par la libération des peptides α 54–104 et α 54–103 à partir des peptides α 1-50 / 54–123 et α 1-31 / 54–123 respectivement. Le peptide α 54–103 va générer les peptides α 54–60 et α 61–103 qui va être le point de départ de la famille αVI (Figure 39). Quant au peptide α 54–104, il génére par clivage de la liaison Trp^{60}-Cys^{61}, les peptides α 54–60 et α 61–104 qui va également être le point de départ de la sixième famille (Figure 39). Il peut également donner le peptide α 54–103 par coupure de la Tyr^{103}. De la même façon, le peptide α 61–104, peut générer le peptide α 61–103 par coupure de la Tyr^{103}.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

© 2006 Tous droits réservés.

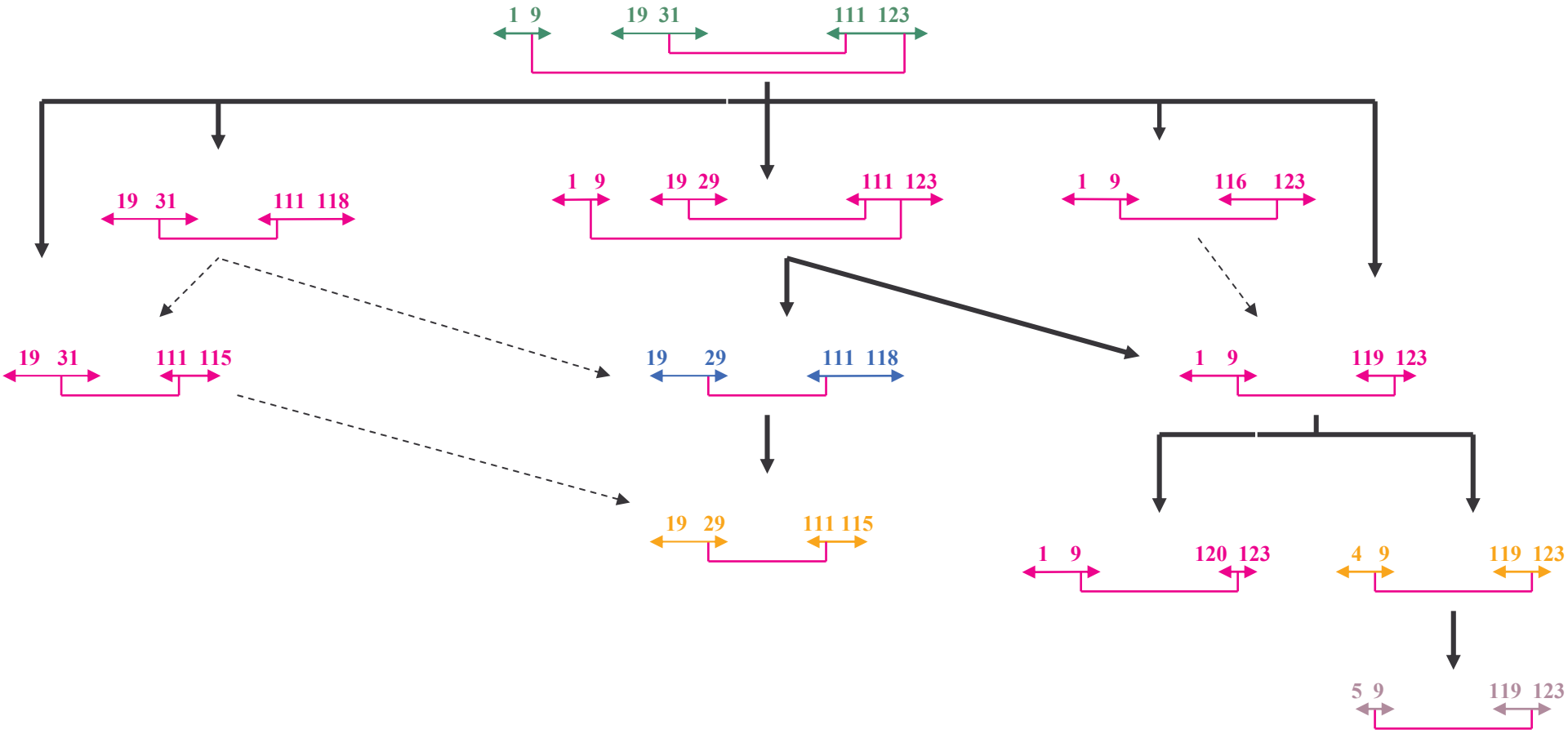


Figure 37. *Evolution des peptides appartenant à la famille αIV au cours du temps lors de l'hydrolyse de l'α-Lactalbumine par l'α chymotrypsine.*

0,5 min, 1 min, 2,5 min, 5 min et 10 min, 15 min, 30 min, 1H, 3H, 12H, 24H.

http://www.univ-lille1.fr/bustl

Thèse de Véronique Dubois-Delval, Lille 1, 2006

© 2006 Tous droits réservés.

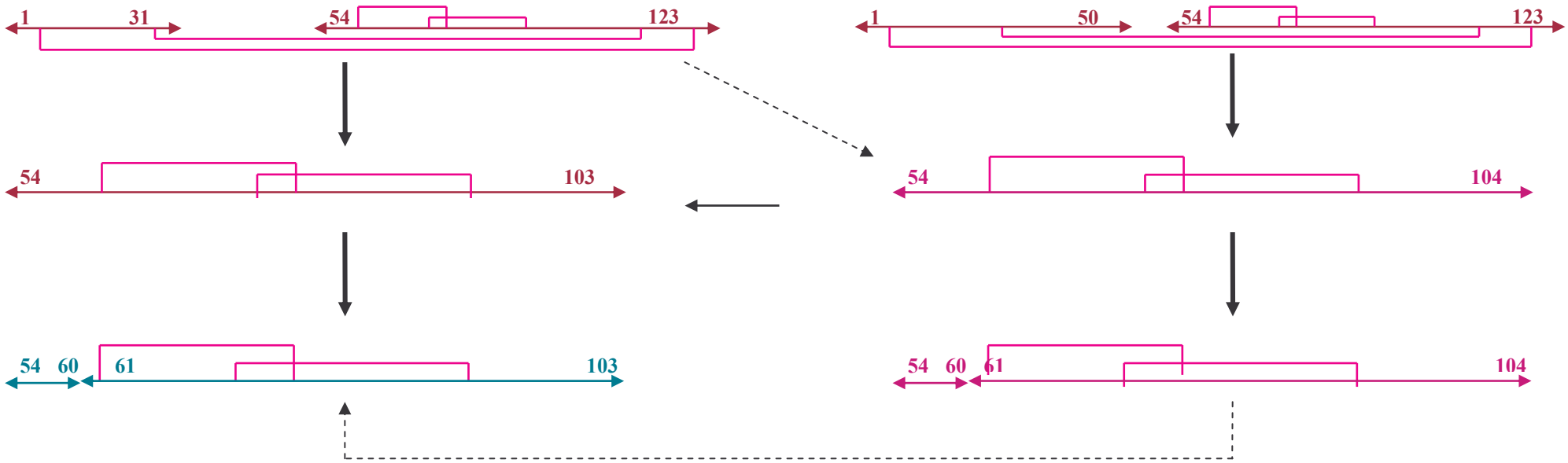


Figure 38. *Evolution des peptides appartenant à la famille αV au cours du temps lors de l'hydrolyse de l'α-Lactalbumine par l'α chymotrypsine.*

0,5 min, 1 min, 2,5 min, 5 min et 10 min, 15 min, 30 min, 1H, 3H, 12H, 24H.

http://www.univ-lille1.fr/bustl

Thèse de Véronique Dubois-Delval, Lille 1, 2006

Les peptides intermédiaires obtenus à partir des peptides α 61-103 (αVI)

A partir des peptides α 61–103 et α 61–104, se forme la famille αVI (Figure 39) qui contient les peptides comprenant les ponts disulfures Cys^{61}-Cys^{77} et Cys^{73}-Cys^{91}.

- *Les peptides intermédiaires obtenus à partir du peptide α 61-103 (αVI)*

Le peptide α 61–103 va générer cinq peptides. Les deux premiers peptides sont obtenus par la coupure de la $Lysine^{93}$, et correspondent aux peptides α 61–93 et α 94–103 qui va être le point de départ de la famille α IX (Figure 40). Par coupure de la Met^{90}, le peptide α 61–103 va également générer le peptide α 61–90 / 91-103. Les deux derniers peptides obtenus à partir du peptide α 61–103, proviennent de la coupure de l'His^{68}, l'Asn^{74}, et de la Leu^{85}, et correspondent aux peptides α 61–68 / 75-85 et α 69-74 / 86-103 qui correspond à un peptide final.

- Les peptides intermédiaires obtenus à partir du peptide α 61–90 / 91-103 (αVI)

Le peptide α 61–90 / 91-103 sera ensuite clivé en $C_{terminal}$ de l'His^{68} pour donner le peptide α 61–68 / 69-90 / 91-103, qui pourra lui-même générer le peptide α 61–68 / 69-90 / 91-93 par la coupure de l'His^{68}.

- Les peptides intermédiaires obtenus à partir du peptide α 61–68 / 75-85 (αVI)

Quant au peptide α 61–68 / 75-85, il va ensuite être clivé en $C_{terminal}$ de la Phe^{80}, pour générer le peptide α 61–68 / 75-80 qui correspond au peptide antimicrobien isolé et identifié par Pellegrini *et al.,* en 1999.

- Les peptides intermédiaires obtenus à partir du peptide α 61–93 (αVI)

Le peptide α 61–93 va être clivé en $C_{terminal}$ de la Met^{90} pour générer le peptide α 61–90 / 91-93. Ce dernier peut également être obtenu à partir du peptide α 61–90 / 91-103 par coupure en $C_{terminal}$ de la $Lysine^{93}$. Le peptide α 61–90 / 91-93 va ensuite générer deux peptides : d'un côté le peptide α 61–71 / 72-90 / 91-93, par coupure de l'Asn^{71}, et le peptide α 61–68 / 69-90 / 91-93 par coupure de l'His^{68}. Ce dernier va ensuite être clivé en $C_{terminal}$ de l'$Asparagine^{74}$ pour donner lieu au peptide α 61–68 / 75-90, qui va ensuite générer le peptide α 61–62 / 75-78 par coupure de la $Lysine^{62}$ et de l'Acide $Aspartique^{78}$, ce qui permet également de générer le peptide α 79–90 qui est lui-même clivé en Phe^{80} pour donner le peptide α 81–90.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

© 2006 Tous droits réservés.

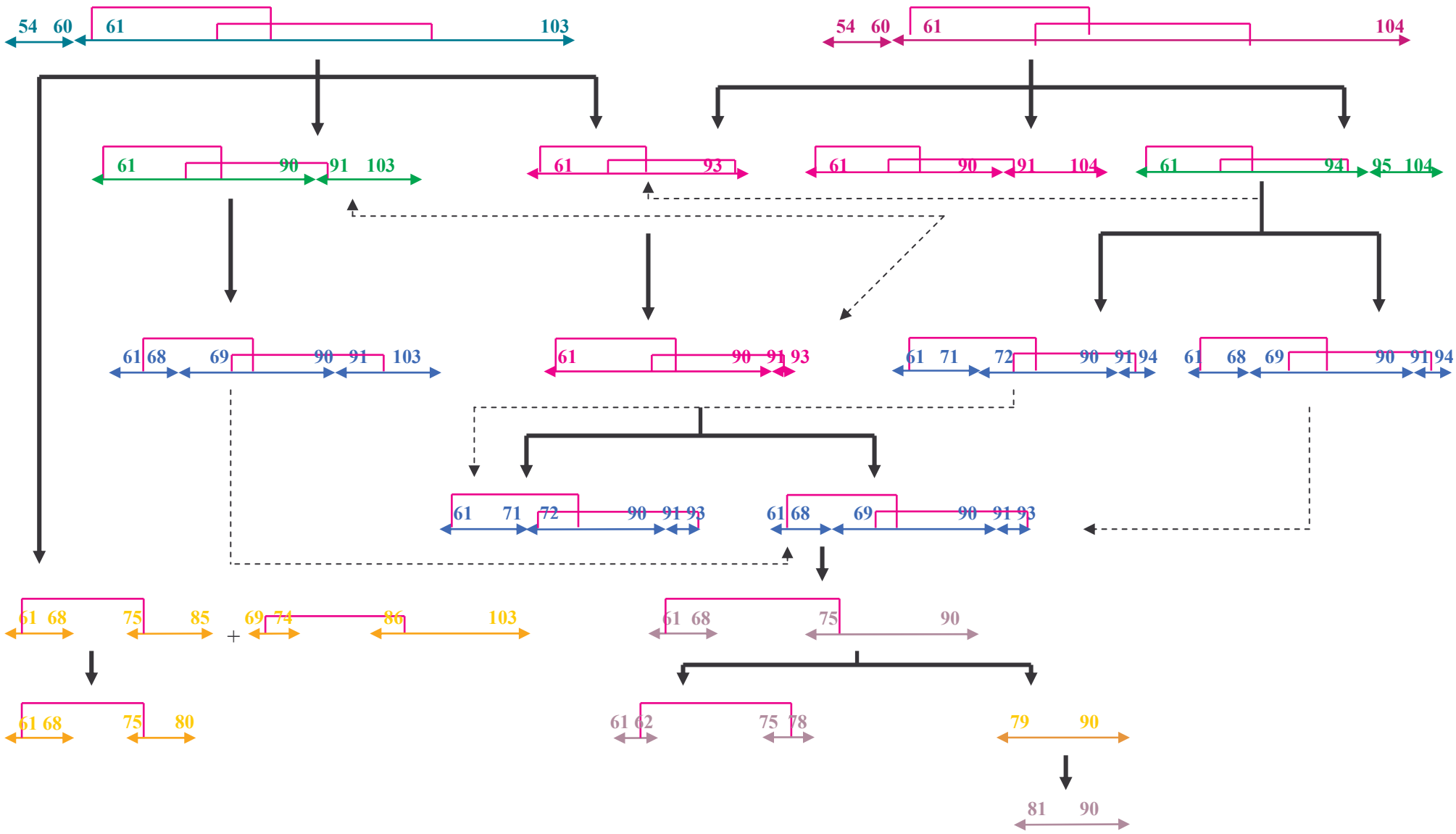


Figure 39. *Evolution des peptides appartenant à la famille αVI au cours du temps lors de l'hydrolyse de l'α-Lactalbumine par l'α chymotrypsine.*

0,5 min, 1 min, 2,5 min, 5 min et 10 min, 15 min, 30 min, 1H, 2H, 3H, 12H, 24H.

Les peptides intermédiaires obtenus à partir des peptides α 61-104 (αVI)

Le peptide α 61–104 va générer cinq peptides (Figure 39). Le premier peptide est obtenu par la coupure en $C_{terminal}$ de la Met^{90} et correspond au peptide α 61–90 / 91-104. La coupure en $C_{terminal}$ de la $Lysine^{94}$ du peptide α 61–104, va libérer les peptides α 61–94 et α 95–104 qui va également être le point de départ de la famille αIX (Figure 40). Les deux derniers peptides générés lors de la coupure en $C_{terminal}$ de la $Lysine^{93}$ au sein du peptide α 61–104, correspondent aux peptides α 61–93 et α 94–104 qui va également être le point de départ de la famille αIX (Figure 40).

- Les peptides intermédiaires obtenus à partir du peptide α 61–90 / 91-104 (αVI)

Le peptide α 61–90 / 91-104 peut générer d'un côté le peptide α 61–90 / 91-103 par coupure de la Tyr^{103}, et de l'autre côté, le peptide α 61–90 / 91-93 lors de la coupure en $C_{terminal}$ de la $Lysine^{93}$.

- Les peptides intermédiaires obtenus à partir du peptide α 61–94 (αVI)

Le peptide α 61–94 va générer deux peptides : le peptide α 61–71 / 72-90 / 91-94, par coupure de l'Asn^{71} et de la Met^{90}, et le peptide α 61–68 / 69-90 / 91-94 par la coupure de l'His^{68} et celle de la Met^{90}. Ces deux peptides peuvent par la coupure de la $Lysine^{93}$, donner lieu aux peptides α 61–71 / 72-90 / 91-93, et α 61–68 / 69-90 / 91-93.

- Les peptides intermédiaires obtenus à partir du peptide α 61–93 (αVI)

Les peptides générés à partir du peptide α 61–93, ont été décrits au sein du paragraphe précedent, concernant les peptides intermédiaires obtenus à partir du peptide α 61–103.

Les peptides intermédiaires obtenus à partir des peptides α 32-50 (αVII)

La septième famille (αVII) a pour point de départ le peptide α 32–50 (Figure 40). Celui-ci, par coupure de la Tyr^{36} en $C_{terminal}$, va générer les peptides α 32–36, et α 37–50. Ce dernier va ensuite être clivé en $C_{terminal}$ de l'Asn^{45}, et générer le peptide α 37–45. Celui-ci va lui même générer le peptide α 37–44 par coupure de la liaison Asn^{44}-Asn^{45}. Le dernier peptide obtenu au sein de la famille αVII, provient du clivage du peptide α 37–44 par coupure de la Gln^{43}, et correspond au peptide α 37–43.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

© 2006 Tous droits réservés.

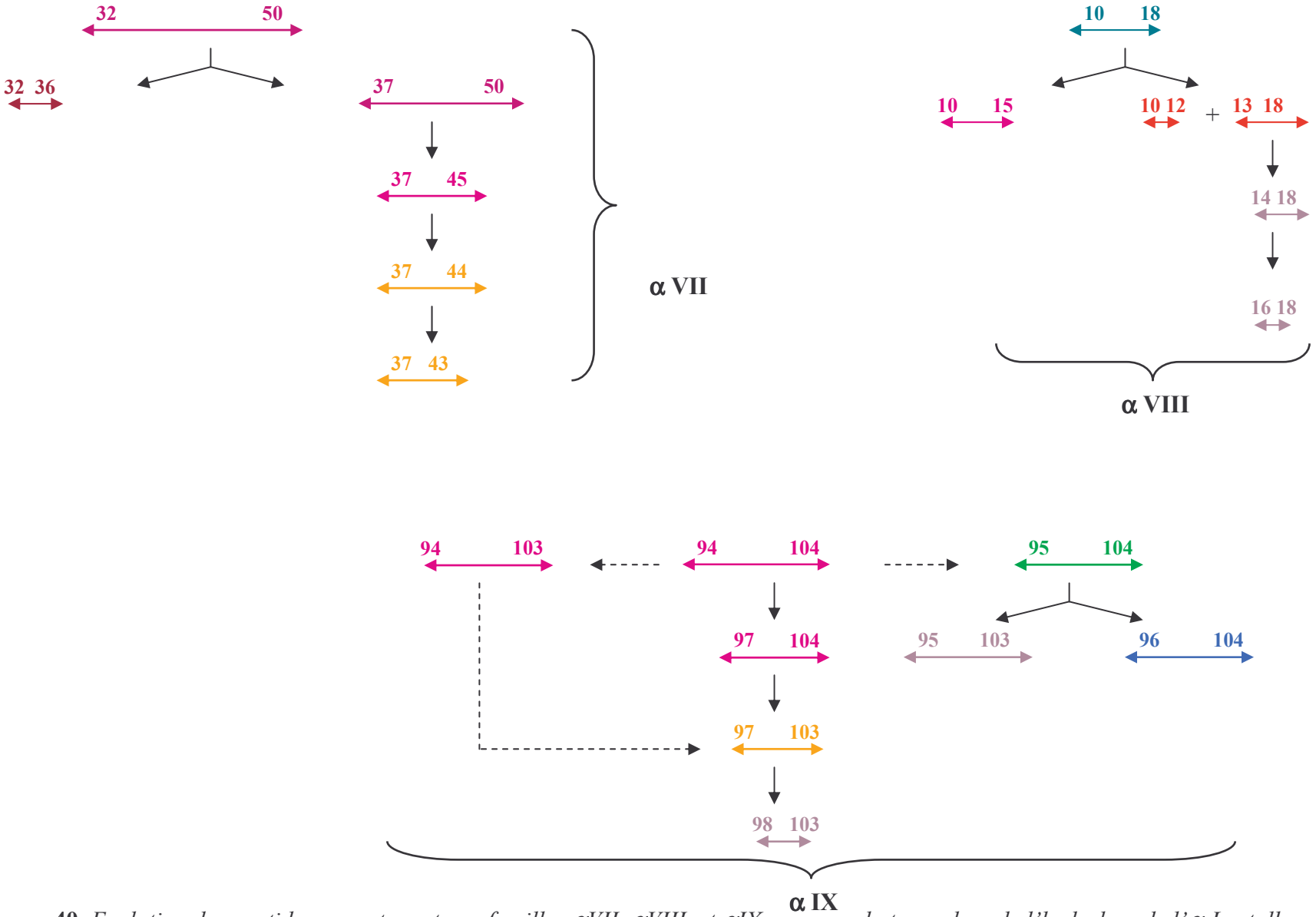


Figure 40. *Evolution des peptides appartenant aux familles αVII, αVIII, et αIX au cours du temps lors de l'hydrolyse de l'α-Lactalbumine par l'α chymotrypsine.* **0,5 min, 1 min, 2,5 min, 5 min et 10 min, 15 min, 30 min, 1H, 2H, 3H, 12H, 24H.**

http://www.univ-lille1.fr/bustl

Les peptides intermédiaires obtenus à partir des peptides α 10-18 (αVIII)

La famille αVIII dérive du peptide α 10–18 (Figure 40). Celui-ci va générer d'un côté le peptide α 10–15 par coupure de la Leu^{15} en $C_{terminal}$, et de l'autre côté, par clivage de la liaison Leu^{12}-Lys^{13}, les peptides α 10–12, et α 13–18. Ce dernier va ensuite être clivé en $C_{terminal}$ de la Lys^{13} pour donner le peptide α 14–18, qui va lui-même générer le peptide α 16–18 par coupure de la liaison Leu^{15}-Lys^{16}.

Les peptides intermédiaires obtenus à partir des coupures atypiques de la chymotrypsine (αIX)

La dernière famille obtenue à partir de l'hydrolyse chymotrypsique de l'α-Lactalbumine, appelée αIX, correspond à des peptides issus des coupures atypiques de la chymotrypsine, malgré la présence d'un inhibiteur de la trypsine. Ces coupures atypiques ont lieu soit en $C_{terminal}$ de la $Lysine^{93}$, soit en $C_{terminal}$ de la $Lysine^{94}$ (Figure 40). Trois peptides sont à l'origine de cette famille. Le premier peptide provient de la coupure du peptide α 61–103 en $C_{terminal}$ de la $Lysine^{93}$et correspond au peptide α 94–103. Le second peptide α 94–104 est généré lors de la coupure de la $Lysine^{93}$ au sein du peptide α 61–104. Le dernier peptide est également obtenu à partir de ce peptide α 61–104 par la coupure de la $Lysine^{94}$, et correspond au peptide α 95–104. Le peptide α 94–104 peut également générer les peptides α 94–103 et α 95–104 par coupure respective de la Tyr^{103} et de la Lys^{94}.

- *Le peptide intermédiaire obtenu à partir du peptide α 94-103 (αIX)*

Le peptide α 94-103 va générer le peptide α 97-103 par coupure de la Leu^{96} en $C_{terminal}$.

- *Les peptides intermédiaires obtenus à partir du peptide α 94-104 (αIX)*

Le peptide α 94-104 va être clivé en $C_{terminal}$ de la Leu^{96}, et donner le peptide α 97-104. Celui-ci va générer par coupure de la Tyr^{103}, le peptide α 97-103, qui va lui-même donner le peptide α 98-103 par coupure de la Lys^{98}.

- *Les peptides intermédiaires obtenus à partir du peptide α 95-104 (αIX)*

Le peptide α 95-104 va générer d'un côté le peptide α 95-103 par coupure de la Tyr^{103} en $C_{terminal}$, et de l'autre côté le peptide α 96-104 par coupure de l'Isoleucine^{95}.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

II.4. Mise en évidence d'activité antimicrobienne au cours de la cinétique d'hydrolyse de l'α-Lactalbumine

Après l'étude de la cinétique d'hydrolyse de l'α-Lactalbumine par l'α chymotrypsine, et l'identification de la population peptidique, l'activité antimicrobienne au sein de cette cinétique a été recherchée.

Pellegrini *et al.,* (1999) ont isolé à partir de l'hydrolyse chymotrypsique de l'α-Lactalbumine un peptide présentant une activité antimicrobienne. Ce peptide nommé LDC correspondant à la séquence 61-68/75-80 (avec un pont disulfure : Cys^{61}-Cys^{77}) est surtout actif contre des bactéries à Gram-positif. Puis en 2006, Biziulevičius *et al.,* ont montré qu'un hydrolysat chymotrypsique de l'α-Lactalbumine induisait également la lyse de bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif.

Il paraît donc intéressant de rechercher à partir de la cinétique d'hydrolyse de l'α-Lactalbumine par l'α chymotrypsine des activités antimicrobiennes. Pour cela, chaque hydrolyse de la cinétique a été testée sur des souches bactériennes à Gram-positif et à Gram-négatif en se servant de la technique en double couche de Parish *et al*., (2001).

Différentes souches bactériennes ont été utilisées : 5 Gram-positif : *Micrococcus luteus* A270, *Listeria innocua, Listeria monocytogenes Scott A, Listeria monocytogenes 500, Staphylococcus aureus,* et 6 Gram-négatif : *Escherichia coli, Shigella sonnei, Salmonella enteritidis, Salmonella arizonae, Salmonella typhimurium, Yersinia enterocolitica.* En fonction de la souche bactérienne utilisée, les tests ont été effectués au sein du laboratoire ou à l'INRA.

L'activité antimicrobienne est détectée par l'apparition de zones d'inhibition de croissance autour des puits après 24 heures d'incubation à 37°C de la souche bactérienne avec l'hydrolysat à tester.

Après évaporation à sec, plusieurs hydrolysats ont été testés sur l'ensemble des souches bactériennes. Lors de chaque test, un témoin négatif et un témoin positif ont été réalisés. Le témoin négatif correspond à du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4 et le témoin positif à de la tétracycline (0,1mg/mL).

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Le tableau XVI montre que l'α-Lactalbumine non hydrolysée (T_0), ne présente pas d'activité antimicrobienne vis-à-vis des souches testées, tandis que plusieurs hydrolysats de l'α-Lactalbumine inhibent la croissance de plusieurs souches bactériennes. Aucun des hydrolysats n'étant actif vis-à-vis de la souche *Yersinia enterocolitica,* celle-ci a donc été par la suite retirée des tests. L'activité antimicrobienne est très variable selon la souche testée. Sur l'ensemble des hydrolysats testés, seulement quatre d'entre eux ne présentent pas d'activité antimicrobienne, ce sont les hydrolysats de 15 minutes, 4H, 5H et 6H. Les hydrolysats de 5 et 10 minutes ne sont actifs que vis-à-vis d'une seule souche bactérienne, *Salmonella enteritidis*, tandis que tous les autres hydrolysats sont actifs au minimum sur deux souches bactériennes. Ce sont les hydrolysats de 2,5 minutes, 30 minutes, 1H, 12H et 24H qui présentent une activité antimicrobienne vis-à-vis du plus grand nombre de souches bactériennes. Parmi ces hydrolysats, celui de 30 minutes apparaît comme étant le plus actif, en inhibant presque la totalité des souches bactériennes.

Les hydrolysats présentant une activité antimicrobienne vis-à-vis du plus grand nombre de souches bactériennes, ont été préparés en grande quantité, afin de tester sur les souches bactériennes différentes concentrations de ces hydrolysats. Le choix s'est porté sur les hydrolysats de 2,5 minutes, 30 minutes, 1H, 12H et 24H. Le T_0 servant de témoin négatif a également été testé. Trois concentrations ont été testées, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, et 0,5 mg/mL. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 38. A 5 mg/mL, tous les hydrolysats testés sont actifs, même le T_0. A cette concentration, les souches ne sont pas inhibées par les peptides, mais par la concentration trop élevée de la protéine qui inhibe leur croissance. A 2,5 mg/mL, le T_0 n'est pas actif, par contre les autres hydrolysats inhibent la croissance des souches bactériennes. Deux hydrolysats parmi les six testés inhibent la totalité des souches bactériennes, il s'agit des hydrolysats de 30 minutes et de 12H. Quand les tests sont effectués à une concentration de 0,5 mg/mL, il n'y a pratiquement plus d'inhibition de croissance, sauf pour deux souches bactériennes, *Listeria monocytogenes Scott A,* et *Listeria monocytogenes 500.* Cette dernière est inhibée par les hydrolysats de 2,5 minutes, 30 minutes et 1H, et *Listeria monocytogenes Scott A* est inhibée uniquement par l'hydrolysat de 30 minutes.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

© 2006 Tous droits réservés.

Souche Bactérienne	Hydrolysat															
	TO	T0,5'	T1'	T2,5'	T5'	T10'	T15'	T30'	T1H	T2H	T3H	T4H	T5H	T6H	T12H	T24H
Micrococcus luteus A270	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+++	+
Listeria innocua	-	-	-	+	-	-	-	++	+	+	+	-	-	-	+++	+
Listeria monocytogenes Scott A	-	-	-	+	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	+	-
Listeria monocytogenes 500	-	+	+	+	-	-	-	++	+	-	-	-	-	-	+	-
Staphylococcus aureus	-	-	+	+	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	+	-
Escherichia coli	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
Shigella sonnei	-	+	+	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-
Salmonella enteritidis	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Salmonella arizonae	-	-	+	+	-	-	-	++	+	-	-	-	-	-	+	+
Salmonella typhimurium	-	-	+	+	-	-	-	++	+	-	-	-	-	-	+	+
Yersinia enterocolitica.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau XVI. *Activité antimicrobienne des hydrolysats d'α-Lactalbumine. Le symbole + représente l'activité antimicrobienne de l'hydrolysat vis-à-vis de la souche testée, tandis que l'absence d'activité antimicrobienne est représentée par le symbole -.*

http://www.univ-lille1.fr/bustl

Thèse de Véronique Dubois-Delval, Lille 1, 2006

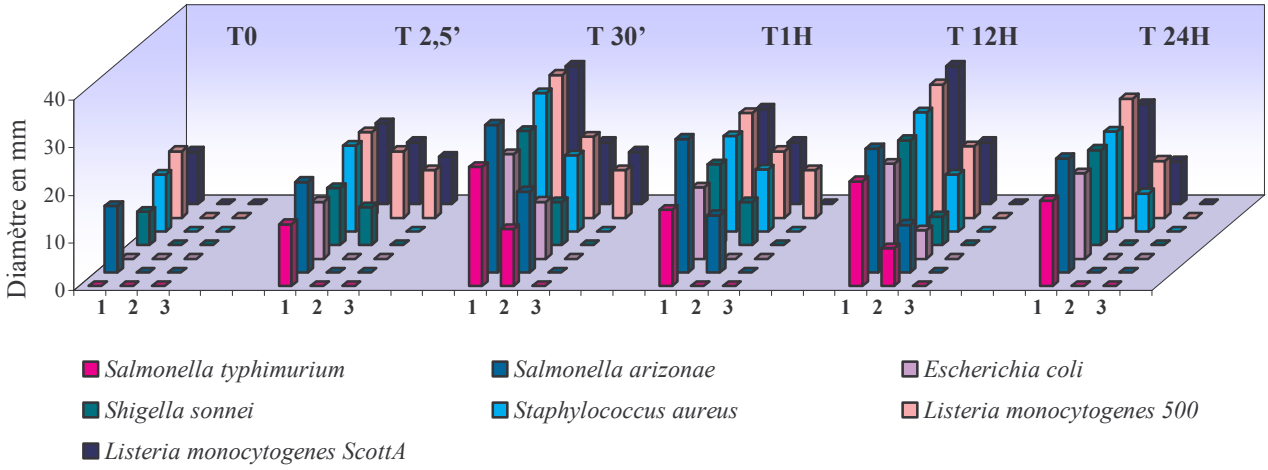


Figure 38. *Inhibition des souches bactériennes en fonction de la concentration des hydrolysats l'α-Lactalbumine.* ***1*** *: 5mg/mL,* ***2*** *: 2,5mg/mL, et* ***3*** *: 0,5mg/mL.*

Ce sont les hydrolysats de 30 minutes et de 12H qui ont montré une activité antimicrobienne vis-à-vis de plusieurs souches bactériennes. Pourtant la population peptidique au sein de ces deux hydrolysats est assez différente. Certains peptides sont présents aux deux temps d'hydrolyse, ce qui pourrait expliquer leur activité. Mais ces mêmes peptides sont présents à d'autres temps d'hydrolyse qui ne présentent pas d'activité antimicrobienne. Cette différence d'activité antimicrobienne pourrait s'expliquer par le fait que ce ne soit pas le(s) même(s) peptide(s) actif(s) au sein des différents hydrolysats ou soit par l'apparition au sein de certains hydrolysats (en particulier 4H, 5H, et 6H) de peptides ayant un effet antagoniste à celui des au(x) peptide(s) antimicrobien(s). L'existence de deux groupes de peptides peut être également envisagée. D'un côté, à 30 minutes d'hydrolyse, la population peptidique est constituée en majorité de peptides de grande taille contenant pour la plupart un ou deux pont(s) disulfure(s). Par contre à 12H d'hydrolyse, la population peptidique est différente, elle contient beaucoup de peptides de petite et moyenne taille pouvant se structurer plus facilement au contact des membranes des bactéries. L'hydrolysat de 12H, contient également le peptide α 61-68 / 75-80, connu sous le nom LDC, peptide antimicrobien isolé et identifié par Pellegrini *et al.,* en 1999. L'activité antimicrobienne de cet hydrolysat peut s'expliquer par la présence de ce peptide, et peut être par la présence de peptides précurseurs comme le peptide α 61-68 / 75-85. Il semble donc intéressant d'isoler et d'identifier le ou les peptide(s) antimicrobien(s) présent(s) dans un premier temps au sein des hydrolysats de 30 minutes et de 12H, puis dans un second temps au sein des autres hydrolysats.

Ainsi l'hydrolyse de l'α-Lactalbumine par la chymotrypsine a permis d'obtenir plusieurs hydrolysats présentant une activité antimicrobienne vis-à-vis de bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

L'étude des différentes cinétiques d'hydrolyse de l'α-Lactalbumine a permis de comprendre le mécanisme d'hydrolyse de l'α-Lactalbumine par l'α chymotrypsine. Selon la conformation de la protéine, il a été possible d'obtenir soit un mécanisme du type « one by one », soit un mécanisme du type « semi-zipper ». Ce mécanisme « semi-zipper » a été obtenu sans ajout de dénaturant comme pour l'hémoglobine. C'est la température d'incubation jouant le rôle de dénaturant, qui a permis l'obtention d'un mécanisme « semi-zipper ».

Dans une seconde partie, la population peptidique apparaissant au cours de la cinétique de l'α-Lactalbumine a pu être établie. Cette population est très variable en taille et en structure, par la présence des ponts disulfures. L'identification de la population peptidique a montré également la difficulté à établir une séquence en acides aminés au sein de peptides de grande taille, et de peptides possédant des ponts disulfures. La réduction des ponts disulfures s'est révélée nécessaire pour certains peptides, et a permis d'élucider et de comprendre certains spectres de fragmentation obtenus à partir de ces peptides à l'état natif.

Enfin, l'activité antimicrobienne de plusieurs hydrolysats au sein de la cinétique d'hydrolyse de l'α-Lactalbumine, a pu être mise en évidence. Certains sont plus actifs que d'autres, c'est le cas de deux hydrolysats, celui de 30 minutes et celui de 12H.

Les conditions d'hydrolyse mises au point dans cette étude, ont permis l'obtention de plusieurs hydrolysats présentant une activité antimicrobienne, mais également de générer des peptides présentant d'autres activités biologiques telles que immunomodulatrice et inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Une partie des résultats obtenus dans cette étude, a fait l'objet de deux posters :

Dubois-Delval V, Nedjar-Arroume N, Kouach M, Guillochon D, et Briand G.
Identification des peptides issus de l'hydrolyse de l'Alpha Lactalbumine par la Spectrométrie de Masse en Tandem.
Poster, Ier Symposium de Chimie et Biologie Analytique : de la Molécule au Protéome, 22ème JFSM. Montpellier, Septembre 2005.

Dubois V, Vaccher V, Ticu HL, Kouach M, Nedjar-Arroume N, Guillochon D, et Briand G.
Optimisation du Couplage LC/MS pour l'étude de l'Alpha Lactalbumine bovine.
Poster, 20ème JFSM, Spectrométrie de Masse et Analyse Protéomique. Toulouse, Septembre 2003.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

© 2006 Tous droits réservés.

http://www.univ-lille1.fr/bustl

Dans cette étude, deux protéines de structure différente ont été hydrolysées afin de générer des peptides antimicrobiens. L'une des deux, est une protéine modèle possédant deux chaînes peptidiques structurées en hélice α : l'hémoglobine bovine. L'autre est constituée d'une seule chaîne peptidique contenant quatre ponts disulfures possédant un domaine structuré en hélice α et un domaine structuré en feuillet β. Cette protéine va servir de nouveau modèle : l'α-Lactalbumine.

Dans une première partie, une hydrolyse pepsique a été menée sur l'hémoglobine bovine, ce qui a permis d'obtenir 24 peptides antimicrobiens localisés soit sur la chaîne α soit sur la chaîne β. Parmi ces 24 peptides antimicrobiens, 5 se sont révélés purs et en quantité suffisante pour déterminer leurs CMI, leur mode d'action, et l'effet hémolytique ainsi que certaines de leurs propriétés structurales. Ces peptides ont pour séquence en acides aminés : les fragments α 107-141, α 107-136, α 133-141, α 137-141 et β 126-145. L'étude sur l'amélioration des méthodes de préparation de ces peptides antimicrobiens a montré qu'il était possible en jouant sur la température d'incubation mais surtout en modifiant le pH du milieu réactionnel, d'augmenter les quantités de ces peptides. En conditions natives et à pH 3,5 il a été possible d'obtenir l'ensemble de ces peptides dont la majorité était absente à pH 4,5. Le pH 3,5 a également permis l'obtention d'un mécanisme « zipper » sans l'utilisation d'urée. La mise en place de système biphasique eau / butan-2-ol a permis d'extraire sélectivement huit peptides possédant une activité biologique : un peptide opioïde la LVVH-7, et sept peptides antimicrobiens correspondant aux peptides α 107-133, α 107-136, α 107-141, α 33-46, β 114-145, β 126-145, et β 1-30 (qui permet également de solubiliser l'hème).

A partir de ces résultats, plusieurs orientations vont être envisagées. Avec les peptides antimicrobiens purs, il est nécessaire de comprendre leur mécanisme, mais également de préciser leur structure secondaire. Des études par dichroïsme circulaire vont être réalisées sur ces peptides afin de déterminer réellement leur structure, ainsi que des études permettant de comprendre l'interaction de ces peptides avec des liposomes. En ce qui concerne les méthodes de préparation de ces peptides, en se plaçant à un pH et une température donnés, il sera possible de favoriser un ou plusieurs peptides, et des études complémentaires sur les extractions de ces peptides peuvent être également menées, pour déterminer les rendements d'extraction. En ce qui concerne les autres peptides antimicrobiens, de nouvelles étapes de purification par CLHP seront nécessaires afin d'obtenir chacun de ces peptides en quantité suffisante pour déterminer leurs CMI, leurs mode d'action, et l'effet hémolytique.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Dans une seconde partie, la mise au point d'un nouveau modèle d'étude a été établie à partir de l'hydrolyse de l'α-Lactalbumine par l'α chymotrypsine. Afin d'établir ce nouveau modèle permettant de générer des peptides antimicrobiens, différentes cinétiques d'hydrolyse ont été réalisées. L'étude des différentes cinétiques a montré que le mécanisme d'hydrolyse de l'α-Lactalbumine par la chymotrypsine dépendait de la conformation de l'α-Lactalbumine, de la température d'incubation et du milieu réactionnel. Un mécanisme d'hydrolyse du type « semi-zipper » a été obtenu lors de l'hydrolyse de l'apoforme de l'α-Lactalbumine à 37°C dans le tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4, permettant l'obtention de peptides de grande taille. Une cartographie peptidique a été établie au cours de cette cinétique d'hydrolyse en utilisant différentes techniques de spectrométrie de masse. L'activité antimicrobienne de l'ensemble de la cinétique a été testée et plusieurs hydrolysats ont montré une activité antimicrobienne vis-à-vis de plusieurs souches bactériennes. Deux hydrolysats ont été particulièrement actifs vis-à-vis de plusieurs souches bactériennes : l'hydrolysat de 30 minutes et celui de 12 heures. L'hydrolysat de 30 minutes est surtout constitué de peptides de grande taille, tandis que l'hydrolysat de 12 heures est constitué de peptides de plus petite taille, dont le peptide antimicrobien LDC (Pellegrini *et al.,* 1999).

A partir de ces deux hydrolysats, plusieurs étapes de fractionnement et de purification par CLHP seront nécessaires, afin de déterminer dans un premier temps la ou les fraction(s) active(s), puis dans un second temps d'isoler le ou les peptide(s) actif(s), et de déterminer leur CMI, leur mode d'action, et l'effet hémolytique. Une comparaison de la structure et du mécanisme d'action entre les peptides antimicrobiens issus de l'hémoglobine et ceux issus de l'α-Lactalbumine pourra être effectuée.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

© 2006 Tous droits réservés.

http://www.univ-lille1.fr/bustl

Abad-Zapatero C., Rydel T. J., et Erickson J.
Revised 2.3 Å Structure of Porcine Pepsin : Evidence for a Flexible Subdomain.
Proteins., 1990, vol. 8, p. 62-81.

Adler-Nissen J.
Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid.
J. Agric. Food Chem., 1979, vol. 27, p. 1256-1262.

Andersen J. S., Svensson B., et Roepstorff P.
Electrospray ionization and matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry : powerful analytical tools in recombinant protein chemistry.
Nat. Biotechnol., 1996, vol. 14, p. 449-457.

Aubes-Dufau I., Capdevielle J., Seris J. L., et Combes D.
Bitter peptid from haemoglobin hydrolysate : isolation and characterization.
FEBS Lett., 1995, vol. 364, p. 115-119.

Aubes-Dufau I., et Combes D.
Effect of different proteases on bitterness of haemoglobin hydrolysates.
Appl. Biotech. Biochem., 1997, vol. 67, p. 127-138.

Barber M., Jolles P., Vilkas E., et Lederer E.
Determination of amino acid sequences in oligopeptides by mass spectrometry. I. The structure of fortuitine, an acylnonapeptide methyl ester.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1965, vol. 18, p. 469-473.

Barber M.
Fast Atom Bombardment of Solids (F.A.B.) : A New Ion Source for Mass Spectrometer.
J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1981, vol. 1981, p. 325-327.

Barber M., Bordoli R. S., Elliot G. J., Sedgwick R. D., Tyler A. N., et Green B. N.
Fast Atom Bombardment mass spectrometry of human proinsulin.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1983, vol. 110, p. 753-757.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Beavis R. C., et Chait B. T.
Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry in high resolution separation analysis of biological macromolecules.
Part A Fundamentals, B. L. Karger and W. S. Hancok, Editors, Academic Press : San Diego, 1996, p. 519-551.

Belem M. A. F., Gibbs B. F., et Lee B. H.
Proposing Sequences for Peptides Derived from Whey Fermentation with Potential Bioactive Sites.
J. Dairy Sci., 1999, vol. 82, p. 486-493.

Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Kawase K., Shimamura S., et Tomita M.
Identification of the bactericidal domain of lactoferrin.
Biochim. Biophys., 1992,vol. 1121, p. 130-136.

Bennett J. C.
Paper chromatography and electrophoresis ; special procedure for peptide maps.
Methods Enzymol., 1967, vol. 11, p. 330-338.

Biemann K.
Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions).
Methods Enzymol., 1990, vol. 193, p. 886-887.

Bigelow C. C.
On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure.
J. Theoret. Biol., 1967, vol. 16, p. 187-211.

Biziulevičius G. A., Kislukhina O. V., Kazlauskaité J., et Žukaité V.
Food-protein enzymatic hydrolysates possess both antimicrobial and immunostimulatory activities:a cause and effect theory of bifunctionality.
FEMS Immunol. Med. Microbiol., 2006, vol. 46, p. 131-138.

Black J. A., et Hodges R. S.
Peak identification in HPLC of peptides using spectral analysis and second order spectroscopy of aromatic amino acid residues.
High performance liquid chromatography of peptides and proteins, Mant C.T. & Hodges R.S. (Editors). CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, p. 563-570.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Blishchenko E. Y., Kalinina O. A., Sazonova O. V., Khaidukov S. V., Egorova N. S., Suruvoy A. Y., Philippova M. M., Vass A. A., Karelin A. A., et Ivanov V. T.
Endogenous fragment of haemoglobin, neokyotorphin, as cell growth factor.
Peptides., 2001, vol. 22, p. 1999-2008.

Blow D. M.
The Study of α-Chymotrypsin by X-Ray Diffraction.
Biochem. J., 1969, vol. 112, p. 261-268.

Böhlen P., et Kleeman G.
Analytical and preparative mapping of complez peptide mixture by reversed-phase high performance liquid chromatography.
J. Chromatogr., 1981, vol. 205, p. 65-75.

Brew K., Vanaman T. C., et Hill R. L.
Comparison of the Amino Acid Sequence of Bovine α-Lactalbumin and Hens Egg White Lysozyme.
J. Biol. Chem., 1967, vol. 242, p. 3747-3749.

Brew K., et Hill R. L.
The isolation and characterization of the tryptic, chymotryptic, peptic, and cyanogen bromide peptides from bovine α Lactalbumin.
J. Biol. Chem., 1970a, vol. 245, p. 4559-4569.

Brew K., Castellino F. J., Vanaman T. C., et Hill R. L.
The complete amino acid sequence of bovine α lactalbumin.
J. Biol. Chem., 1970b, vol. 245, p. 4570-4582.

Brown J. R., et Hartley B. S.
Location of Disulfide Bridges by Diagonal Paper Electrophoresis. The Disulphide Bridges of Bovine Chymotrypsinogen A.
Biochem. J., 1966, vol. 101, p. 214-228.

Budnik B. A., Olsen J. V., Egorov T. A., Anisimova V. E., Galkina T. G., Musolyamov A. K., Grishin E. V., et Zubarev R. A.
De novo sequencing of antimicrobial peptides isolated from the venom glands of the wolf spider Lycosa singoriensis.
J. Mass Spectrom., 2004, vol. 39, p. 193-201.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Bulet P., Stocklin R., et Menin L.
Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates.
Immunol. Rev., 2004, vol. 198, p. 169-184.

Cawthern K. M., Narayan M., Chaudhuri D., Permyakov E. A., et Berliner L. J.
Interactions of α-Lactalbumin with Fatty Acids and Spin Label Analogs.
J. Biol. Chem., 1997, vol. 272, p. 30812-30816.

Cempel N., Aubry J. M., Piot J. M., et Guillochon D.
Isolation from bovine haemoglobin of a peptid that might be used as a potential hydrophobic photosensitizer carrier.
Biotech. Appl. Biochem., 1995, vol. 21, p. 287-294.

Chang J.-Y., et Li L.
The structure of denatured α lactalbumin elucidated by the technique of disulfide scrambling.
J. Biol. Chem., 2001, vol. 276, p. 9705-9712.

Chiba H., et Yoshikawa M.
Biologically functional peptides from food proteins : New opioïd peptides from milk proteins.
Protein teiloring for food medical uses, Feeney R.E. Whitaker J.R. Edition Marcel dekker, New York, 1986, p. 123-153.

Choisnard L., Froidevaux R., Nedjar-Arroume N., Lignot B., Vercaigne-Marko D., Krier F., Dhulster P., et Guillochon D.
Kinetic study of the appearance of an anti-bacterial peptide in the course of bovine haemoglobin peptic hydrolysis.
Biotechnol. Appl. Biochem., 2002, vol. 36, p. 187-194.

Chrysina E. D., Brew K., et Acharya K. R.
Crystal structure of Apo and Holo bovine α Lactalbumin at 2,2 Å Resolution reveal an effect of calcium on inter lobe interactions.
J. Biol. Chem., 2000, vol. 275, p. 37021-37029.

Clare D. A., Catignani G. L., et Swaisgood H. E.
Biodefense properties of milk : the role of antimicrobial proteins and peptides.
Curr. Pharm. Des., 2003, vol. 9, p. 1239-1255.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Corbier C., Krier F., Mulliert G., Vitoux B., et Revol-Junelles A. M.
Biological activities and structural properties of the atypical bacteriocins mesenterocin 52b and leucocin b-ta33a.
Appl. Environ. Microbiol., 2001, vol. 67, p. 1418-1422.

Corzo G., Escoubas P., Villegas E., Barnham K. J., He W., Norton R. S., et Nakajima T.
Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*.
Biochem. J., 2001, vol. 359, p. 35-45.

Cristoni S., et Bernardi L. R.
Development of new methodologies for the mass spectrometry study of bioorganic macromolecules.
Mass Spectrom. Rev., 2003, vol. 22, p. 369-406.

Crosby W. H., Munn J. I., et Furth F. W.
Standardizing a method for clinical hemoglobimetry.
US. Armed. Forces. Med. J., 1954, vol. 5, p. 693-703.

Csordas A., et Michl H.
Isolation and structure of a haemolytic polypeptide from the defensive secretion of European Bombina species.
Monatsh. Chem., 1970, vol. 101, p. 182-189.

Dale C. S., Pagano R. de L., et Rioli V.
Hemopressin : a novel bioactive peptide derived from the alpha1-chain of hemoglobin.
Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 2005, vol. 100, p. 105-106.

Daoud R., Dubois V., Bors-Dodita L., Nedjar-Arroume N., Krier F., Chihib N.-E., Mary P., Kouach M., Briand G., et Guillochon D.
New antibacterial peptide derived from bovine haemoglobin.
Peptides., 2005, vol. 26, p. 713-719.

Dathe M., Schumann M., Wieprecht T., Winkler A., Beyermann M., Krause E., Matsuzaki K., Murase O., et Bienert M.
Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes.
Biochemistry., 1996, vol. 35, p. 12612-12622.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Dathe M., Nikolenko H., Meyer J., Beyermann M., et Bienert M.
Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge.
FEBS Lett., 2001, vol. 501, p. 146-150.

Davies D. R.
The structure and function of the aspartic proteinases.
Ann. Rev. Bioph. Chem., 1990, vol. 19, p. 189-215.

Destoumieux D., Bulet P., Loew D., Van Dorsselaer A., Rodriguez J., et Bachère E.
Penaeidins, a New Family of Antimicrobial Peptides Isolated from the Shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda).
J. Biol. Chem., 1997, vol. 272, p. 28398-28406.

Devine D. A.
Antimicrobial peptides in defence of the oral and respiratory tracts.
Mol. Immunol., 2003, vol. 40, p. 431-443.

Dubin A., Mak P., Dubin G., Rzychon M., Stec-Niemczyk J., Wladyka B., Maziarka K., et Chmiel D.
New generation of peptide antibiotics.
Acta Biochim. Pol., 2005, vol. 52, p. 633-638.

Dubois V., Nedjar-Arroume N., et Guillochon D.
pH influence on the appearance of active peptides in the course of peptic hydrolysis of bovine haemoglobin.
Prep. Biochem. Biotechnol., 2005, vol. 35, p. 85-102.

Dunn B. M.
Structure and Mechanism of the Pepsin-Like Family of Aspartic Peptidases.
Chem. Rev., 2002, vol. 102, p. 4431-4458.

Edman P.
Method of determination of the amino acid sequence in peptides.
Acta Chem. Scand., 1950, vol. 4, p. 283–293.

Edman P.
On the mechanism of the phenyl isothiocyanate degradation of peptides.
Acta Chem. Scand., 1956, vol. 10, p. 761–768.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Edman P., et Begg G.
A protein sequenator.
Eur. J. Biochem., 1967, vol. 1, p. 80-91.

Emmet M. R., et Caprioli R. M.
Micro-electrospray mass spectrometry : ultra-high-sensitivity analysis of peptides and proteins.
J. Am. Soc. Mass Spectrom., 1994, vol. 5, p. 605-613.

Epand R. M., et Vogel H. J.
Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action.
Biochim. Biophys. Acta., 1999, vol. 1462, p. 11-28.

Favreau P., Menin L., Michalet S., Perret F., Cheneval O., Stocklin M., Bulet P., et Stocklin R.
Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: Case applications with single arthropod specimen.
Toxicon., 2006, vol. 47, p. 676-687.

Fazio M. A., Oliveira V. X. Jr., Bulet P., Miranda M. T., Daffre S., et Miranda A.
Structure-activity relationship studies of gomesin : Importance of the disulfide bridges for conformation, bioactivities, and serum stability.
Biopolymers., 2006, vol. 84, p. 205-218.

Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F., et Whitehouse C. M.
Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules.
Science., 1989, vol. 246, p. 64-71.

Fernandez de Caleya R., Gonzalez-Pascual B., Garcia-Olmedo F., et Carbonero P.
Susceptibility of Phytopathogenic Bacteria to Wheat Purothionins In Vitro.
Appl. Microbiol., 1972, vol. 23, p. 998-1000.

Fiat A. M., Miglore-Samour D., Jollés P., Drouet L., Bal-Sollier C., et Caen J.
Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities.
J. Dairy Sci., 1991, vol. 76, p. 301-310.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Finehout E. J., et Lee K. H.
An Introduction to Mass Spectrometry Applications in Biological Research
Biochem. Mol. Biol. Educ., 2004, vol. 32, p. 93-100.

Floris R., Recio I., Berkhout B., et Visser S.
Antibacterial and Antiviral Effects of Milk Protein and Derivatives Thereof.
Curr. Pharm. Des., 2003, vol. 9, p. 1257-1275.

Fogaça A. C., Da Silva P. I., Teresa Jr. M., Miranda M., Bianchi A. G., Miranda A., Ribolla P. E. M., et Daffre S.
Antimicrobial activity of a bovine haemoglobin fragment in the tick Boophilus microplus.
J. Biol. Chem., 1999, vol. 274, p. 25330-25334.

Frank R. W., Gennaro R., Schneider K., Przybylski M., et Romeo D.
Amino Acid Sequences of Two Proline-rich Bactenecins.
J. Biol. Chem., 1990, vol. 265, p. 18871-18874.

Froidevaux R., Krier F., Nedjar-Arroume N., Vercaigne-Marko D., Kosciarz E., Ruckebush C., Dhulster P., et Guillochon D.
Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine haemoglobin fragment.
FEBS Lett., 2001a, vol. 491, p. 159-163.

Froidevaux R., Nedjar-Arroume N., Choisnard L., Bigan M., et Guillochon D.
Using an experimental design for the optimisation of LVVH7 and VVH7 extraction by organic solvent mixture in the course of bovine haemoglobin peptic hydrolysis.
Biotechnol. Appl. Biochem., 2001b, vol. 33, p. 75-83.

Garcia K.C., De Sauvage F. J., Struble M., Henzel W., Reilly D., et Goeddel D. V.
Processing and Characterization of Human Proguanylin Expressed in *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem., 1993, vol. 268, p. 22397-22401.

Gevaert K., et Vanderkerckhove J.
Protein identification methods in proteomics.
Electrophoresis., 2000, vol. 21, p. 1145-1154.

Gibson B. W., Poulter L., Williams D. H., et Maggio J. E.
Novel Peptide Fragments Originating from PGL and the Caerulein and Xenopsin Precursors from *Xenopus laevis*.
J. Biol. Chem., 1986, vol. 261, p. 5341-5349.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Gibson B. W., Tang D., Mandrell R., Kelly M., et Spindel E. R.
Bombinin-like Peptides with Antimicrobial Activity from Skin Secretions of the Asian Toad, *Bombina orientalis*.
J. Biol. Chem., 1991, vol. 266, p. 23103-23111.

Griko Y. V., et Remeta D. P.
Energetics of solvent and ligand-induced conformational changes in α-lactalbumin.
Protein Sci., 1999, vol. 8, p. 554-561.

Habermann E.
Bee and wasp venoms.
Science., 1972, vol. 177, p. 314-322.

Haileselassie S. S., Lee B. H., et Gibbs B. F.
Purification and Identification of Potentially Bioactive Peptides from Enzyme-Modified Cheese.
J. Dairy Sci., 1999, vol. 82, p. 1612-1617.

Hålekausson P., Kamenski I., Sundquist B., Fohlman J., Peterson P., McNeal C. J., et Macfarlane R. D.
127-I plasma desorption mass spectrometry of insulin.
J. Am. Chem. Soc., 1982, vol. 104, p. 2948-2949.

Hancock R. E. W., et Chapple D. S.
Peptide Antibiotics.
Antimicrob. Agents Chemother., 1999, vol. 43, p. 1317-1323.

Harrison S. J., McManus A. M., Marcus J. P., Goulter K. C., Green J. L., Nielsen K. J., Craik D. J., Maclean D. J., et Manners J. M.
Purification and characterization of a plant antimicrobial peptide expressed in *Escherichia coli*.
Protein Expr. Purif., 1999, vol. 15, p. 171-177.

Hartley B. S.
Amino-Acid Sequence of Bovine Chymotrypsinogen A.
Nature., 1964, vol. 201, p. 1284-1287.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Herriott R. M.
Pepsinogen and Pepsin.
J. Gen. Physiol., 1962, vol. 45, p. 57-76.

Hill R. L., et Delaney R.
Peptide mapping with automatic analysers : use of analysers and other automatic equipment to monitor peptide separations by column methods.
Methods Enzymol., 1967, vol. 11, p. 339-350.

Hill R. L., Brew K., Vanaman T. C., Trayer I. P., et Mattock P.
The Structure, Function and Evolution of α Lactalbumin.
Brookhaven Symp. Biol., 1968, vol. 21, p. 139-154.

Ibrahim H. R., Iwamori E., Sugimoto Y., et Aoki T.
Identification of a distinct antibacterial domain within the N-lobe of ovotransferrin.
Biochim. Biophys. Acta., 1998, vol. 1401, p. 289-303.

Ibrahim H. R., Thomas U., et Pellegrini A.
A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action.
J. Biol. Che., 2001, vol. 276, p. 43767-43774.

Ivanov V. T., Karelin A. A., Philippova M. M., Nazimov I. V., et Pletnev V. Z.
Haemoglobin as a source of endogenous bio-active peptides : the concept of tissue-specific peptide pool.
Biopolymers., 1997, vol. 43, p. 171-188.

Izadpanah A., et Gallo R. L.
Antimicrobial peptides.
J. Am. Acad. Dermatol., 2005, vol. 52, p. 381-390.

Janini G. M., Chan K. C., Conrads T. P., Issaq H. J., et Veenstra T. D.
Two-dimensional liquid chromatography-capillary zone electrophoresis-sheathless electrospray ionization-mass spectrometry : evaluation for peptide analysis and protein identification.
Electrophoresis., 2004, vol. 25, p. 1973-1980.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Karas M., Bachmann D., Bach U., et Hillenkamp F.
Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non volatile compounds.
Int. J. Mass Spectrum. Ion. Proc., 1987, vol. 78, p. 53-68.

Karas M., et Hillenkamp F.
Laser desorption Ionization of Proteins with molecular masses exceeding 10 000 Daltons.
Anal. Chem., 1988, vol. 60, p. 2299-2301.

Karas M., Bach U., et Hillenkamp F.
UV laser matrix desorption/ionization mass spectrometry of proteins in the 100 000 dalton range.
Int. J. Mass Spectrom. Ion. Proc., 1989, vol. 92, p. 231-242.

Kayser H., et Meisel H.
Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins.
FEBS Lett., 1996, vol. 383, p. 18-20.

Keil B.
Proteolysis Data Bank : Specificity of alpha-chymotrypsin from computation of protein cleavages.
Protein Seq. Data Anal., 1987, vol. 1, p. 13-20.

Keil B.
Specificity of Proteolysis.
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York., 1992, Pp335.

Körner R., Wilm M., Morand K., Schubert M., et Mann M.
Nano electrospray Combined with a Quadrupole Ion Trap for the Analysis of Peptides and Protein Digests.
J. Am. Soc. Mass. Spectrom., 1996, vol. 7, p. 150-156.

Kouach M., Belaïche D., Jacquinod M., Couppez M., Kmiecik D., Ricart G., Van Dorsselaer A., Sautière P., et Briand G.
Application of Electrospray and Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry to the Identification of Post-translational and other Chemical Modifications of Proteins and Peptides.
Biol. Mass Spectrom., 1994, vol. 23, p. 283-294.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Kussmann M., Nordhoff E., Rabek-Nielsen H., Haebel S., Rossel-larsen M., Jakobsen L., Gobom J., Mirgorodskaya E., Kroll-Kristensen A., Palm L., et Roepstoff P.
Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes.
J. Mass Spectrom., 1997, vol. 32, p. 593-601.

Kuwajima K.
The molten globule state of α Lactalbumin.
FASEB J., 1996, vol. 10, p. 102-109.

Lahov E., et Regelson W.
Antibacterial and Immunostimulating Casein-derived Substances from Milk : Casecidin, Isracidin Peptides.
Fd Chem. Toxic., 1996, vol. 34, p. 131-145.

Lange C., Marvin L., Marcual A., Ordsmith N., et Bordoli R. S.
Determination of the amino acid sequence of apamin by tandem mass spectrometry.
Rapid Commun. Mass Spectrom., 1994, vol. 8, p. 539-543.

Lebrun F., Bazus A., Dhulster P., et Guillochon D.
Solubility of heme in heme-iron enriched bovine haemoglobin hydrolysates.
J. Agric. Food Chem., 1998, vol. 46, p. 5017-5025.

Legros C., Célérier M.-L., Henry M., et Guette C.
Nanospray analysis of the venom of the tarantula Theraphosa leblondi : a powerful method for direct venom mass fingerprinting and toxin sequencing.
Rapid Commun. Mass Spectrom., 2004a, vol. 18, p. 1024-1032.

Legros C., Célérier M.-L., et Guette C.
An unusual cleavage reaction of a peptide observed during dithiotreitol and tris(2-carboxyethyl) phosphine reduction : application to sequencing of HpTx2 spider toxin using nanospray tandem mass spectrometry.
Rapid Commun. Mass Spectrom., 2004b, vol. 18, p. 1317-1323.

Levy O.
Antimicrobial proteins and peptides : anti-infective molecules of mammalian leukocytes.
J. Leukoc. Biol., 2004, vol. 76, p. 909-925.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Liepke C., Zucht H. D., Forssmann W. G., et Stanoker L.
Purification of novel peptide antibiotics from human milk.
J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl., 2001, vol. 752, p. 369-377.

Liepke C., Baxmann S., Heine C., Breithaupt N., Ständker L., et Forssmann W.G.
Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity : a class of host defense peptides.
J. Chromatogr. B., 2003, vol. 791, p. 345-356.

Lignot B.
Effet de solvant sur la sélectivité de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine et sur l'obtention de peptides à activités biologiques.
Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille, 1998.

Lignot B., Froidevaux R., Nedjar-Arroume N., et Guillochon D.
Solvent effect on kinetics of appearance of neokyotorphin VVh4 and a bradykinin-potentiating peptide in the course of peptic hydrolysis of bovine haemoglobin.
Biotech. Appl. Biochem., 1999, vol. 30, p. 201-207.

Linderstrom-Lang K.
The initial stages in the breakdown of proteins by enzymes . Proteins and Enzymes III.
Lane Medical Lectures, Stanford University Press California, 1952, vol. 6, p. 53-72.

Liu Y.-Q., Sun Z.-J., Wang C., Li S.-J., et Liu T.-Z.
Purification of a Novel Antibacterial Short Peptide in Earthworm *Eisenia foetida*.
Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai), 2004, vol. 36, p. 297-302.

Lopes S. C. D. N., Federov A., et Castanho M. A. R. B.
Lipidic membranes are potential "catalysts" in the ligand activity of the multifunctional pentapeptide Neokyotorphin.
Chem. Bio. Chem., 2005, vol. 6, p. 697-702.

Losito I., Carbonara T., De Bari M. D., Gobbetti M., Palmisano F., Rizzello C. G., et Zambonin P. G.
Identification of peptides in antimicrobial fractions of cheese extracts by electrospray ionization ion trap mass spectrometry coupled to a two-dimensional liquid chromatographic separation.
Rapid Commun. Mass Spectrom., 2006, vol. 20, p. 447-455.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Macfarlane R. D., et Torgerson D. F.
Californium-252 plasma desorption mass spectrometry.
Science., 1976, vol. 191, p. 920-925.

Mak P., Wójcik K., Wicherek L., Suder P., et Dubin A.
Antibacterial hemoglobin peptides in human menstrual blood.
Peptides., 2004, vol. 25, p. 1839-1847.

Malkoski M., Dashper S. G., O'Brien-Simpson N. M., Talbo G. H., Macris M., Cross K. J., et Reynolds E. C.
Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk.
Antimicrob. Agents Chemother., 2001, vol. 45, p. 2309-2315.

Mann M., et Wilm M.
Electrospray mass spectrometry for protein characterization.
Trends Biochem. Sci., 1995, p. 219-224.

Marshall S. H., et Arenas G.
Antimicrobial peptides : A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology.
Electron. J. Biotechnol., 2003, vol. 6, p. 271-284.

Matsumoto H., Shimokawa Y., Ushida Y., Toida T., et Hayasawa H.
New Biological Function of Bovine α-Lactalbumin : Protective Effect against Ethanol- and Stress-Induced Gastric Mucosal Injury in Rats.
Biosci. Biotechnol. Biochem., 2001, vol. 65, p. 1104-1111.

Matsuo T., Caprioli R. M., Gross M. L., et Seyama Y.
Biological Mass Spectrometry : Present and Future.
Biol. Mass Spectrom., John Willey & Sons Ltd., New York. 1994.

Meisel H.
Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins : Potentials nutraceuticals for food and pharmaceutical applications.
Livest. Prod. Sci., 1997, vol. 50, p. 127-138.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Morãvek L., et Kostka V.
Complete amino acid sequence of Hog Pepsin.
FEBS Lett., 1974, vol. 43, p. 207-211.

Moseley M. A., Deterding L. J., Tomer K. B., et Jorgenson J. W.
Determination of bioactive peptides using capillary zone electrophoresis/mass spectrometry.
Anal. Chem., 1991, vol. 63, p. 109-114.

Nagele E., Vollmer M., Horth P., et Vad C.
2D-LC/MS techniques for the identification of proteins in highly complex mixtures.
Expert Rev. Proteomics., 2004, vol.1, p. 37-46.

Nakajima K., Powers J. C., Ashe B. M., et Zimmerman M.
Mapping the extended substrate binding site of Cathepsin G and Human Leukocyte Elastase.
J. Biol. Chem., 1979, vol. 254, p. 4027-4032.

Nakamura T., Furunaka H., Miyata T., Tokunaga F., Muta T., et Iwanaga S.
Tachyplesin, a Class of Antimicrobial Peptide from the Hematocytes of the Horseshoe Crab *(Tachypleus tridentatus)*.
J. Biol. Chem., 1988, vol. 263, p. 16709-16713.

Nedjar-Arroume N., Dubois-Delval V., Miloudi K., Daoud R., Krier F., Kouach M., Briand G., et Guillochon D.
Isolation and Characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin.
Peptides., article in press, 2006.

Novak J., Caufield P. W., et Miller E. J.
Isolation and Biochemical Characterization of a novel Lantibiotic Mutacin from *Streptococcus mutans*.
J. Bacteriol., 1994, vol. 176, p. 4316-4320.

Noyelle K., et Van Dael H.
Kinetics of conformational changes induced by the binding of various metal ions to bovine α-lactalbumin.
J. Inorg. Biochem., 2002, vol. 88, p. 69-76.

Owusu Apenten R. K.
A three-state heat-denaturation of bovine α lactalbumin.
Food Chem., 1995, vol. 52, p. 131-133.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Palladino D. E. H., et Cohen K. A.
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., 1991, vol. 29, p. 91-97.

Parish C. A., Jiang H., Tokiwa Y., Berova N., Nakanishi K., Mc Cabe D., Zuckerman W., Xia M. M., et Gabay J. E.
Broad-spectrum antimicrobial activity of haemoglobin.
Bioorg. Med. Chem., 2001, vol. 9, p. 377-382.

Pellegrini A., Thomas U., Bramaz N., Hunziker P., et Von Fellenberg R.
Isolation and Identification of three bactericidal domains in the bovine α Lactalbumin molecule.
Biochim. Biophys. Acta., 1999, vol. 1426, p. 439-448.

Pellegrini A., Dettling C., Thomas U., et Hunziker P.
Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β-lactoglobulin.
Biochim. Biophys. Acta., 2001, vol. 1526, p. 131-140.

Pelligrini A.
Antimicrobial Peptides from Food Protein.
Curr. Pharm. Des., 2003, vol. 9, p. 1225-1238.

Perrin E.
Développement par voie enzymatique et caractérisation d'une fraction protéique appauvrie en phénylalanine utilisable pour le traitement des phénylcétonuries.
Thèse de Doctorat., Nancy, 1999.

Permyakov E. A., Morozova L. A., et Burstein E. A.
Cation binding effects on the pH, thermal and urea denaturation transitions in α Lactalbumin.
Biophys. Chem., 1985, vol. 21, p. 21-31.

Permyakov E. A., Grishchenko V. M., Kalinichenko L. P., Orlov N. Y., Kuwajima K., et Sugai S.
Calcium-regulated interactions of human alpha-lactalbumin with bee venom melittin.
Biophys. Chem., 1991, vol. 39, p. 111-117.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Permyakov E. A., et Berliner L. J.
α Lactalbumin : Structure and Function.
FEBS Lett., 2000, vol. 473, p. 269-274.

Perutz M. F.
Structure of Hemoglobin.
Brookhaven. Symp Bio., 1960, p. 165-183.

Pihlanto-Leppälä A., Koskinen P., Piilola K., Tupasela T., et Korhonen H.
Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory properties of whey proteins digests : concentration and characterization of active peptides.
J. Dairy Res., 2000, vol. 67, p. 53-64.

Pihlanto-Leppälä A., Rokka T., et Korhonen H.
Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Bovine Milk Proteins.
Int. Dairy J., 1998, vol. 8, p. 325-331.

Piot J. M., Guillochon D., et Thomas D.
Size-exclusion and high-performance liquid chromatography separation of peptides from peptic hemoglobin hydrolysate obtained by ultrafiltration.
Chromatographia., 1988, vol. 25, p. 307-312.

Piot J. M., Guillochon D., Zhao Q., Leroy Y., Ricart G., Fournet B., et Thomas D.
LC-MS of enzymatic peptic haemoglobin hydrolysate produced at the pilot-plant level.
Chromatographia, 1989a, vol. 27, p. 128-134.

Piot J. M., Guillochon D., Zhao Q., Ricart G., Fournet B., et Thomas D.
Identification of peptides, from a peptic haemoglobin hydrolysate produced at pilot-plant scale, by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry.
J. Chromatogr., 1989b, vol. 481, p. 221-231.

Piot J. M., Zhao Q., Guillochon D., Ricart G., et Thomas D.
Isolation and characterization of two opioid peptides from bovine haemoglobin peptic hydrolysate.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1992, vol. 189, p. 101-110.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Polverino de Laureto P., Scaramella E., Frigo M., Wondrich F. G., De Filippis V., Zambinin M., et Fontana A.
Limited proteolysis of bovine α Lactalbumin : Isolation and Characterisation of proteins domains.
Protein Sci., 1999, vol. 8, p. 2290-2303.

Polverino de Laureto P., Frare E., Gottardo R., Van Dael H., et Fontana A.
Partly folded states of members of the lysozyme/lactalbumin superfamily : A comparative study by circular dichroism spectroscopy and limited proteolysis.
Protein Sci., 2002a, vol. 11, p. 2932-2946.

Polverino de Laureto P., Frare E., Gottardo R., et Fontana A.
Molten Globule of bovine α Lactalbumin at neutral pH, induced by heat trifluoroethanol and oleic acid : A comparative analysis by circular dichroism spectroscopy and limited proteolysis.
Proteins, 2002b, vol. 49, p. 385-397.

Poulter L., Terry A. S., Williams D. H., Giovannini M. G., Moore C. H., et Gibson B. W.
Levitide, a Neurohormone-like Peptide from the skin of *Xenopus laevis*.
J. Biol. Chem., 1988, vol. 263, p. 3279-3283.

Powers J.-P. S., et Hancock R. E. W.
The relationship between structure and antibacterial activity.
Peptides., 2003, vol. 24, p. 1681-1691.

Proekt A., Vilim F. S., Alexeeva V., Brezina V., Friedman A., Jing J., Li L., Zhurov Y., Sweedler J. V., et Weiss K. R.
Identification of a New Neuropeptide Precursor Reveals a Novel Source of Extrinsic Modulation in the Feeding System of *Aplysia*.
J. Neurosci., 2005, vol. 25, p. 9637-9648.

Rao P. S., Weinstein G. S., Wilson D. W., Rujikarn N., et Tyras D. H.
Isocratic high-performance liquid chromatography-photodiode-array detection method for determination of lysine- and arginine-vasopressins and oxytocin in biological samples.
J. Chromatogr., 1991, vol. 536, p. 137-142.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Recio I., et Visser S.
Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine α_{S2}-casein.
Biochim. Biophys. Acta., 1999, vol. 1428, p. 314-326.

Recio I., et Visser S.
Antibacterial and binding characteristics of bovine, ovine and caprine lactoferrins : a comparative study.
Int. Dairy J., 2000, vol. 10, p. 597-605.

Roepstorff P., et Fohlman J.
Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides.
Biomed Mass Spectrom., 1984, vol. 11, p. 601.

Safo M. K., et Abraham D. J.
The X-ray structure determination of bovine carbonmonoxyhemoglobin at 2.1 Å resolution and its relationship to the quaternary structures of other hemoglobin crystal forms.
Protein Sci., 2001, vol. 10, p. 1091-1099.

Salmon A. L., Cross L. J. M., Irvine A. E., Lappin T. R. J., Dathe M., Krause G., Canning P., Thim L., Beyermann M., Rothemund S., Bienert M., et Shaw C.
Peptide Leucine Arginine, a Potent Immunomodulatory Peptide Isolated and Structurally Characterized from the Skin of the Northern Leopard Frog, *Rana pipiens*.
J. Biol. Chem., 2001, vol. 276, p. 10145-10152.

Salzet M.
Neuropeptide-derived antimicrobial peptides from invertebrates for biomedical applications
Curr. Med. Chem., 2005, vol. 12, p. 3055-3061.

Sanderson J. M.
Peptide-lipid interactions : insights and perspectives.
Org. Biomol. Chem., 2005, vol. 3, p. 201-212.

Sasakawa S.
Studies on Hemoglobin. VI. Amino Acid Composition of the Fractionated Bovine Globin α and β.
J. Biochem., 1961, vol. 50, p. 345-351.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Satake K., et Sasakawa S.
Partial structure of bovine globin alpha.
J. Biochem., 1962, vol. 52, p. 232-234.

Sazonova O. V., Blishchenko E. Yu., Kalinina O. A., Egorova N. S., Suruvoy A. Y., Philippova M. M., Karelin A. A., et Ivanov V. T.
Proliferative activity of neokyotorphin-related hemoglobin fragments in cell cultures.
Protein. Pept. Lett., 2003, vol. 10, p. 386-395.

Schechter L., et Berger A.
On the size of the active site in proteases I. Papain.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1967, vol. 27, p. 157-162.

Schechter L., et Berger A.
On the active site in proteases 3. Mapping the active site of Papain; specific peptide inhibitors of papain.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1968, vol. 32, p. 898-902.

Selsted M. E., Brown D. M., DeLange R. J., et Lehrer R. I.
Primary Structures of MCP-1 and MCP-2, Natural Peptide Antibiotics of Rabbit Lung Macrophages.
J. Biol. Chem., 1983, vol. 258, p. 14485-14489.

Selsted M. E., et Harwig S. S. L.
Purification, Primary Structure, and Antimicrobial Activities of a Guinea Pig Neutrophil Defensin.
Infect. Immun., 1987, vol. 55, p. 2281-2286.

Sepulveda P., Marciniszyn Jr. J., Liu D., et Tang J.
Primary Structure of porcine Pepsin. III. Amino acid sequence of a cyanogens bromide fragment, CB2A, and the complete structure of porcine pepsin.
J. Biol. Chem., 1975, vol. 250, p. 5082-5088.

Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., et Mann M.
Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels.
An. Chem., 1996, vol. 68, p. 850-858.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Shewale J. G., Sinha S. K., et Brew K.
Evolutions of α-Lactalbumins. The complete amino acid sequence of the α-Lactalbumin from a Marsupial (Macropus Rufrogriseus) and corrections to regions of sequence in Bovine and Goat α-Lactalbumins.
J. Biol. Chem., 1984, vol. 259, p. 4947-4956.

Shroeder W. A., et Robberson B.
An improved gradient for ion exchange chromatography of peptides on Dowex-1.
Anal. Chem., 1965, vol. 37, p. 1583-1585.

Shroeder W. A., Shelton J. R., Shelton J. B., Robberson B., et Babin D. R.
A comparison of amino acid sequences in the beta-chains of adult bovine hemoglobins A and B.
Arch. Biochem. Biophys., 1967, vol. 120, p. 124-135.

Shiomi H., Ueda H., et Takagi H.
Isolation and identification of an analgesic opioïd dipeptide kyotorphin (Tyr-Arg) from bovine brain.
Neuropharmacology., 1981, vol. 20, p. 633-638.

Sielecki A. R., Fedorov A. A., Boodhoo A., Andreeva N. S., et James M. N. G.
Molecular and Crystal Structures of Monoclinic Porcine Pepsin Refined at 1.8 Å Resolution.
J. Biol. Chem., 1990, vol. 214, p. 143-170.

Skeggs L. T. Jr., Kahn J. R., Lentz K., et Shumway N. P.
The preparation, purification, and amino acid sequence of a polypeptide renin substrate.
J. Exp. Med., 1957, vol. 106, p. 439-453.

Smith, R. D., Wahl J. H., Goodlett D. R., et Hofstadler S. A.
Capillary electrophoresis/mass spectrometry.
Anal. Chem., 1993, vol. 65, p. 574-584.

Stoesz J. D., et Lumry R. W.
Refolding transition of α Chymotrypsin : pH and salt dependence.
Biochemistry., 1978, vol. 17, p. 3693-3699.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Strub J. M., Goumon Y., Lugardon K., Capon C., Lopez M., Moniatte M., Van Dorsselaer A., Aunis D., et Metz-Boutigue M. H.
Antibacterial activity of glycosylated and phosphorylated chromogranin A-derived peptide 173-194 from bovine adrenal medullary chromaffin granules.
J. Biol. Chem., 1996, vol. 271, p. 28533-28540.

Svensson M., Mossberg A.-K., Pettersson J., Linse S., et Svanborg C.
Lipids as cofactors in protein folding : Stereo-specific lipid-protein interactions are required to form HAMLET (human α-lactalbumin made lethal to tumor cells).
Protein Sci., 2003, vol. 12, p. 2805-2814.

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

Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., et Yoshida T.
Protein and polymer analysis up to m/z 100.000 by ionization time-of-flight mass spectrometry.
Rapid Commun. Mass Spectrom., 1988, vol. 2, p. 151-152.

Tang Y.-Q., Yeaman M. R., et Selsted M. E.
Antimicrobial Peptides from Human Platelets.
Infection and Immunity., 2002, vol. 70, p. 6524-6533.

Theil R., et Scheit K. H.
Amino acid sequence of seminalplasmin, an antimicrobial protein from bull semen.
EMBO J., 1983, vol. 2, p. 1159-1163.

Togerson D. F., Skowronski R. P., et Macfarlane R. D.
New approach to the mass spectrometry of non-volatile compounds.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1974, vol. 60, p. 616-621.

Toke O.
Antimicrobial peptides : new candidates in the fight against bacterial infections.
Biopolymers., 2005, vol. 80, p. 717-735.

Tomita M., Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., et Kawase K.
Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin.
J. Dairy Sci., 1991, vol. 74, p. 4137-4142.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Tsuruki T., et Yoshikawa M.
Anti-Alopecia effect of Gly-Leu-Phe, an immunostimulating peptide derived from alpha–lactalbumin.
Biosci. Biotechnol. Biochem., 2005, vol. 69, p. 1633-1635.

Uttenweiler-Joseph S., Moniatte M., Lagueux M., Van Dorsselaer A., Hoffmann J. A., et Bulet P.
Differential display of peptides induced during the immune response of *Drosophila:* A matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry study.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1998, vol. 95, p. 11342-11347.

Vanaman T. C., Brew K., et Hill R. L.
The Disulfide Bonds of Bovine α Lactalbumin.
J. Biol. Chem., 1970, vol. 245, p. 4583-4590.

Vorm O., Roepstorff P., et Mann M.
Improved resolution and very high sensivity in MALDI-TOF of matrix surfaces made by fast evaporation.
Anal. Chem., 1994, vol. 66, p. 3281-3287.

Wakabayashi H., Takase M., et Tomita M.
Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin.
Curr. Pharm. Des., 2003, vol. 9, p. 1277-1287.

Wehbi Z., Pérez M.-D., Dalgalarrondo M., Sánchez L., Calvo M., Chobert J.-M., et Haertlé T.
Study of ethanol-induced conformational changes of holo and apo α-lactalbumin by spectroscopy and limited proteolysis.
Mol. Nutr. Food Res., 2006, vol. 50, p. 34-43.

Wilm M., et Mann M.
Analytical properties of the nanoelectrospray ion source.
Anal. Chem., 1996, vol. 68, p. 1-8.

Xiang F., et Beavis R. C.
A method to increase contaminant tolerance in protein matrix-assisted laser desorption ionization by the fabrication of thin protein-doped polycrystalline film.
Rapid Commun. Mass Spectrom., 1994, vol. 8, p. 199-204.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl

Yadav S. P., et Brew K.
Structure and function in Galactosyltransferase.
J. Biol. Chem., 1991, vol. 266, p. 698-703.

Yeaman M. R., et Yount N. Y.
Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance.
Pharmacol Rev., 2003, vol. 55, p. 27-55.

Zavitsanos P., et Goetz H.
The practical application of diode array UV-visible detectors to high-performance liquid chromatography analysis of peptides and proteins.
High performance liquid chromatography of peptides and proteins, Mant C.T. et Hodges R.S. (Editors). CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, p. 553-562.

Zhao Q., Sannier F., Garreau I., Lecœur C., et Piot J. M.
Reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with second-order derivative spectroscopy for the quantitation of aromatic amino acids in peptides : application to hemorphins.
J. Chromatogr. A., 1996, vol. 723, p. 35-41.

Zhao Q., Molina P., et Piot J. M.
Peptic peptide mapping by HPLC, on line with photodiode array detection, of a haemoglobin hydrolysate produced at pilot-plant scale from an ultrafiltration process.
J. Liq. Chrom. Rel. Technol., 1997, vol. 20, p. 1717-1739.

Zhao Q., et Piot J. M.
Organic solvent extraction associated with HPLC in the preparation of hemorphins from bovine haemoglobin peptic hydrolysate.
Prep. Biochem. Biotech., 1998, vol. 28, p. 61-78.

Zucht H.-D., Raida M., Adermann K., Mägert H.-J., et Forssmann W.-G.
Casocidin-I : a casein-α_{S2} derived peptide exhibits antibacterial activity.
FEBS Lett., 1995, vol. 372, p. 185-188.

© 2006 Tous droits réservés. http://www.univ-lille1.fr/bustl