

G&BM

**Tome 4
IASI 2003**

ETUDES DE L'IMMOBILISATION ET LA SÉLECTIVITÉ DE LA PEPSINE DANS UN MICROENVIRONNEMENT HYDROPHILE CATIONIQUE

**ELENA LOREDANA ȚICU¹⁾, ANCA MIHAELA HUMA^{2*)}, VLAD ARTENIE²⁾,
DOMINIQUE VERCAIGNE-MARKO¹⁾, NAIMA NEDJAR-ARROUME¹⁾,
DIDIER GUILLOCHON¹⁾**

Mots clef : immobilisation, pepsine, peptides, alumine, phosphoéthanolamine, hémorphines, néokytorphine, CLHP-PI-analytique

Résumé : L'intérêt de ces études est de favoriser l'apparition de peptides à activités biologiques au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine.

La fixation de la pepsine sur l'alumine a permis d'observer une modification de la sélectivité de la réaction d'hydrolyse de l'hémoglobine : l'accumulation d'une population peptidique intermédiaire de haute masse moléculaire est favorisée par rapport à la réaction menée en phase homogène (Figure 4,5). Avec la pepsine immobilisée sur l'alumine native et fonctionnalisée, il a été observé que la vitesse d'hydrolyse de la VV-hémorphine 7 est ralentie comparée à la réaction menée en phase homogène. Enfin, après immobilisation de la pepsine sur native et fonctionnalisée, une production considérablement accélérée de la néokytorphine a été mise en évidence.

INTRODUCTION

Les protéines animales et végétales ainsi que leurs produits dérivés (peptides, acides aminés) jouent un rôle de plus en plus important dans le domaine des ingrédients alimentaires par leurs propriétés fonctionnelles et organoleptiques.

Ces dernières années, des peptides à activités biologiques ont été isolés à partir d'hydrolysats de protéines (caséines [11], protéines de soja [7], gluten [13], protéines du lactosérum, des œufs, hémoglobine bovine. Des nombreuses activités biologiques ont été identifiées telles que opioïdes [8,6,4], immunostimulants [12], transporteur de minéraux, antioxydante, antimicrobienne [1] etc.). Les potentialités de ces peptides ou de ces fractions peptidiques sont importantes dans le secteur en forte expansion des aliments-santé mais aussi dans le domaine de la sécurité alimentaire comme ingrédients stabilisant de préparations alimentaires.

Dans ce travail nous avons développé une recherche préliminaire qui a consisté à construire un micro-environnement hydrophile cationique autour de la pepsine immobilisée sur de l'alumine et à étudier la cinétique et la sélectivité de la réaction d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine. Les objectifs étaient d'étudier l'impact de ce micro-environnement sur l'obtention de peptides cationiques tels que de certains peptides à activités biologiques.

L'hémoglobine a été ici un substrat modèle adapté à ces recherches car elle réunit des caractéristiques exceptionnelles : sa structure et en particulier sa séquence est parfaitement connue, une quarantaine de séquences peptidiques à activités biologiques ont été identifiées par référence à des banques de données, c'est un sous-produit des industries agro-alimentaires.

Nous avons abordé ce sujet pour montrer que la création de fortes densités de charge positive dans cet environnement de la protéase permet de modifier la sélectivité des coupures de la pepsine et de favoriser l'obtention de peptides à activités biologiques qui sont des molécules chargées positivement.

MATERIEL ET METHODES

I. Dosage de la solution d'hémoglobine

Solution d'hémoglobine bovine (Sigma) à 2%, dosée selon la méthode de Crosby et coll. [5]

II. Dosage de l'activité de la pepsine

L'activité de la pepsine est déterminée selon la méthode de Sarath et coll. (1989) [10]

III. Immobilisation de la pepsine sur l'alumine native ou fonctionnalisée

Immobilisation de la pepsine est réalisée selon la méthode de Coletti-Previero (1989) [3]

IV. Modification de l'alumine par la phosphoéthanolamine

La modification de l'alumine est réalisée selon la méthode de Coletti-Previero (1986) [2]

V. Suivi de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine en solution et par la pepsine immobilisée sur l'alumine et alumine fonctionnalisée

La cinétique de l'hydrolyse enzymatique est suivie par CLHP-PI-analytique selon le protocole de Lignot et coll. (1998) [9]

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Création d'un environnement polaire cationique autour de la pepsine insolubilisée sur de l'alumine

Ces études expérimentales avaient pour le but de déterminer la capacité maximale de fixation de la pepsine par l'alumine et d'étudier le greffage d'un dérivé phosphorylé polaire et cationique : la phosphoéthanolamine autour de la pepsine immobilisée.

Ensuite nous avons déterminé la capacité maximale de l'alumine à se charger en phosphoéthanolamine (PEA).

I.1. Immobilisation de la pepsine sur l'alumine

I.1.1 Détermination de la capacité de fixation de la pepsine par l'alumine

Différentes quantités de pepsine ont été immobilisées sur l'alumine afin de déterminer la quantité optimale d'enzyme qui reste accrochée et qui manifeste après immobilisation une activité maximum possible. L'activité résiduelle est mise en évidence par son dosage avec l'hémoglobine à pH 2.

La fixation de l'enzyme sur 1 g d'alumine a été réalisée avec différentes quantités de pepsine allant de 2,5 à 30 mg.

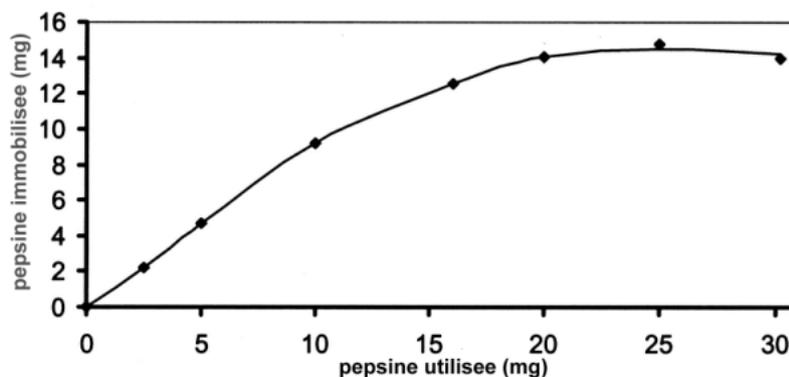


Figure 1. Immobilisation de différentes quantités de pepsine sur 1 g d'alumine.

La courbe de fixation de la pepsine sur l'alumine, présentée sur la figure 1, a une allure linéaire pour des quantités de pepsine allant jusqu'à 20 mg, montrant que la réaction est bien irréversible. Elle présente une saturation de l'alumine à partir de 20 mg introduits. Le pourcentage de fixation de la pepsine est d'environ 90 % jusqu'à 10 mg, puis diminue lorsque la quantité de pepsine ajoutée augmente (jusqu'à 46 % pour 30 mg de pepsine).

La capacité maximale de fixation est d'environ 14 mg par gramme d'alumine.

I.1.2. Activité de la pepsine fixée sur l'alumine

L'activité résiduelle de la pepsine a été dosée avec de l'hémoglobine à 1,67 % à pH 2 étant présenté sur la figure 2.

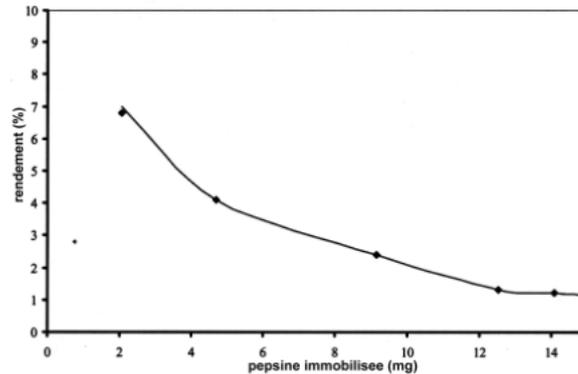


Figure 2. Activité de la pepsine immobilisée sur l'alumine

Le choix de la quantité de pepsine qui sera immobilisée et qui servira pour les trois hydrolyses a été effectuée à la suite de cette expérience. Un compromis entre la quantité minimale d'enzyme immobilisée sur 1 g d'alumine et l'activité résiduelle maximale de la pepsine fixée a été réalisé pour obtenir une hydrolyse efficace de l'hémoglobine à 2%.

Donc nous avons choisi de fixer 5 mg de pepsine par gramme d'alumine qui a permis un rendement maximal d'efficacité.

I.2. Greffage de la phosphoéthanolamine sur l'alumine

Différentes quantités de phosphoéthanolamine (PEA) ont été mises en contact avec l'alumine afin de déterminer la capacité de l'alumine à fixer la PEA (Figure 3). Des quantités de PEA allant de 25 à 700 μ moles ont été mises en contact avec 1 g d'alumine native. 1 gramme d'alumine est capable de fixer jusqu'à environ 500 μ moles de PEA.

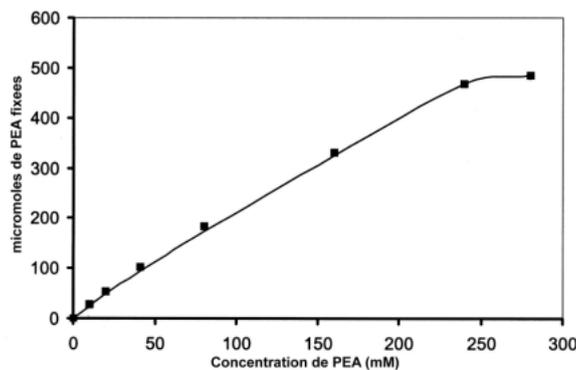


Figure 3. Saturation de l'alumine par la phosphoéthanolamine (PEA)

Pour les expériences d'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine immobilisée sur l'alumine modifiée par la PEA, nous avons choisi de fixer 50 μ moles de PEA par gramme d'alumine, en se référant aux travaux de Coletti-Previero (1986).

II. Etude de la cinétique de la pepsine immobilisée sur l'alumine

Le but de cette étude a été de s'intéresser à la cinétique de disparition du substrat « hémoglobine » d'une part et à celle de l'apparition des produits, c'est à dire l'hème et des peptides, d'autre part.

L'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine a été réalisée à pH 4,5 et à 23°C, pendant 90 heures, dans trois conditions différentes : en catalyse homogène avec l'enzyme en solution, en catalyse hétérogène avec

d'une part la pepsine immobilisée sur l'alumine native et d'autre part avec la pepsine immobilisée sur l'alumine greffée avec de la phosphoéthanolamine (PEA).

Les cinétiques ont été suivies au cours du temps grâce à des prélèvements analysés par chromatographie liquide haute pression en phase inverse (Figure 4,5,6).

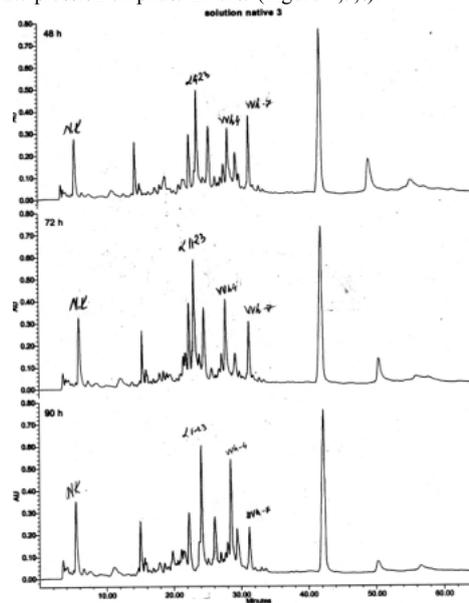


Figure 4. Evolution des profils chromatographiques au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine en solution

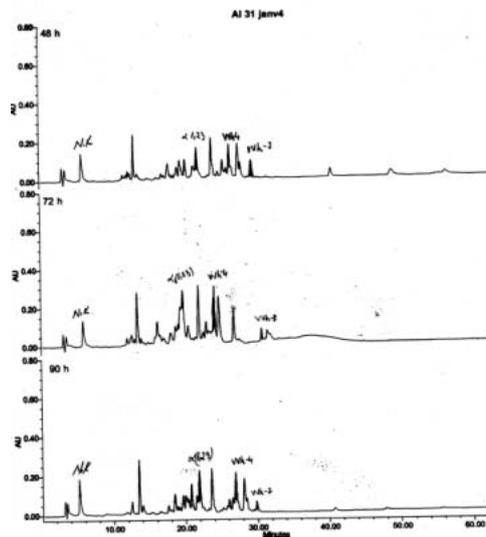


Figure 5. Evolution des profils chromatographiques au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine immobilisée sur l'alumine

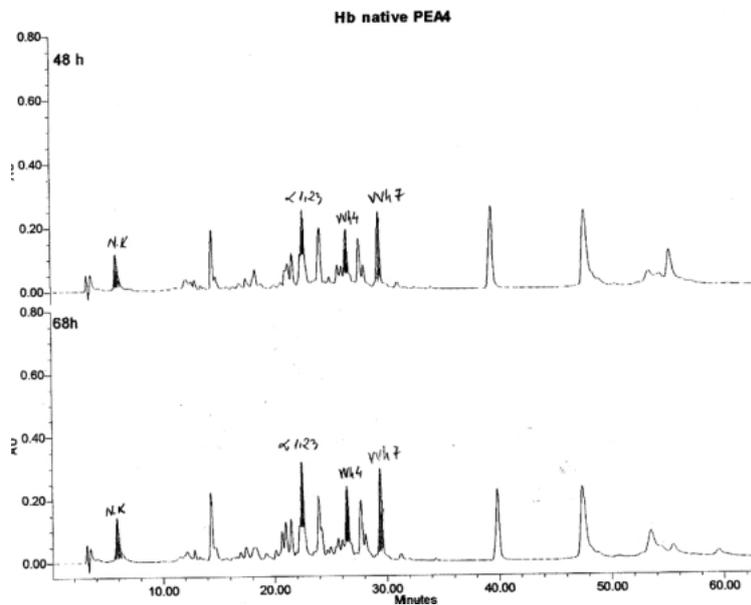


Figure 6. Evolution des profils chromatographiques au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine immobilisée sur l'alumine fonctionnalisée

Nous sommes intéressés plus particulièrement aux trois hémorphines LVVh-7, VVh-7 et VVh-4 ainsi qu' à la néokytorphine qui ont été mises en évidence au cours de la cinétique d'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine en solution [8].

La fixation de la pepsine sur l'alumine a permis d'observer une modification de la sélectivité de la réaction d'hydrolyse de l'hémoglobine : l'accumulation d'une population peptidique intermédiaire de haute masse moléculaire est favorisée par rapport à la réaction menée en phase homogène (Figure 4,5). Avec la pepsine immobilisée sur l'alumine native et fonctionnalisée, il a été observé que la vitesse d'hydrolyse de la VV-hémorphine 7 est ralentie comparée à la réaction menée en phase homogène. Enfin, après immobilisation de la pepsine sur native et fonctionnalisée, une production considérablement accélérée de la néokytorphine a été mise en évidence.

CONCLUSIONS

Les principaux résultats obtenus ont permis de montrer que :

- ✓ L'immobilisation de la pepsine, par liaison covalente avec l'alumine a été réalisée avec un rendement global d'activité très élevé (60%). Celui-ci peut s'expliquer à la fois par la nature hydrophile du support (non dénaturant) et par le fait que la pepsine a été immobilisée par une seule liaison covalente grâce à un groupement phosphorique estérifiant naturellement une serine.
- ✓ La fonctionnalisation de l'alumine par la phosphoéthanolamine en renforçant le caractère cationique permettrait d'envisager d'utiliser la pepsine insolubilisée sur l'alumine pour la mise en œuvre dans un réacteur avec l'objectif de produire des peptides d'intérêt.
- ✓ Avec la pepsine immobilisée sur l'alumine native et fonctionnalisée, il a été observé que la vitesse d'hydrolyse de la VV-hémorphine 7 est ralentie comparée à la réaction menée en phase homogène.
- ✓ Après l'immobilisation de la pepsine sur native et fonctionnalisée, une production considérablement accélérée de la néokytorphine a été mise en évidence.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bellamy, W., Wakabayashi, H., Takase, M., Kawase, K., Shimamura, S. et Tomita, M. (1993) *Med. Microbiol. Immunol.* **182**, 97-105
2. Coletti-Previero M.A., Pugnieri M., Matras H., Nicolas J.C. et Previero A., Selective retention of organic phosphate esters and phosphonates on aluminium oxide, *Biosciences Rep.*, **6** (1986) 477-483.
3. Coletti-Previero M.A., et Previero A., Alumina-Phosphate complexes for immobilization of biomolecules, *Anal. Biochem.*, **180**(1989) 1-10.
4. Chiba, H., Tani, F. et Yoshikawa, M. (1989) *J. Dairy Res.* **56**, 363-366
5. Crosby W.H., Munn J.L. et Furth F.W., Standardizing a method for clinical hemoglobinometry, *U.S. Armed Forces Med. J.*, **5** (1954) 693-703.
6. Froidevaux, R., Brigitte Lignot, Naima Nedjar-Arroume, Guillochon, D., Bernadette Coddeville et Ricart, G., (2000) *Journal of Chromatography A*, **873**, 185-194
7. Gunther, R.C. (1979) *J. Am. Oil Chemists Soc.* **56**, 345-349
8. Lignot B., Froidevaux, R., Naima Nedjar-Arroume et Guillochon, D., (1999) *Biotechnol. Appl. Biochem.* **29**, 25-30
9. Lignot B., Effet de solvant sur la sélectivité de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine et sur l'obtention de peptides a activité biologiques, Thèse de Doctorat de l'Université de Compiègne (1998).
10. Sarath G., De la Motte R.S. et Wagner F.W., *Protease assay methods dans Proteolytic enzymes : a practical approach* (Beynon R.J. and Bond J.S. eds) (1989) , Oxford University Press., 22-55.
11. Schlimme, E. et Meisel, H. (1995) *Nahrung* **39F**, 1-20
12. Werner, G. H., Floc'h, F., Migliore-Samour, D. et Jolles, P. (1986) *Experientia* **42**, 521-531.
13. Ziodrou, C., Streaty, R. A. et Klee, W. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 2446-2449

1) Université de Sciences et Technologies de Lille

2) Université „Al. I. Cuza” Iasi

*) agodja@uaic.ro