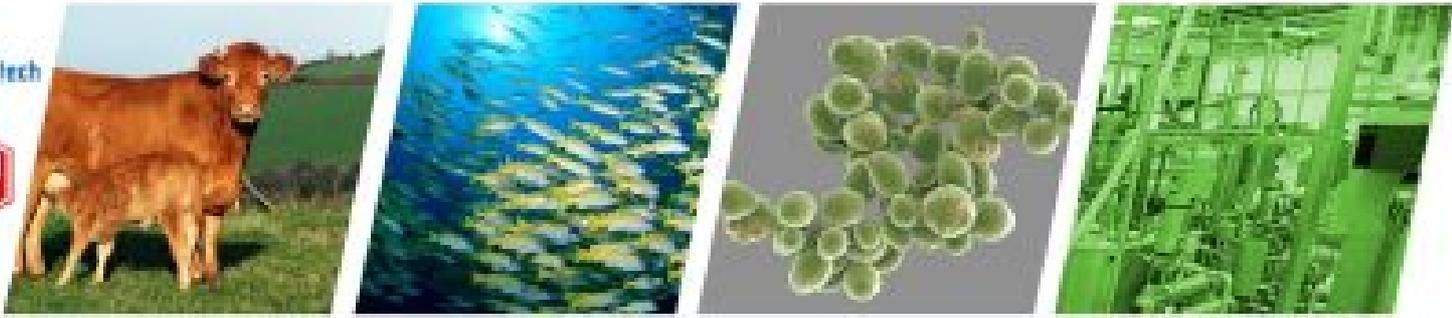


# Colloque Adebitech-SFGP

adebitech



## Peptides issus des procédés d'hydrolyse Filières Industrielles

2 et 3 octobre 2012

Biocitech - Paris-Romainville



Avec le soutien de

ingredia  
GROUP

  
**ROQUETTE**  
Offering the best of nature™



SAINE-SANT-DENIS  
LE DÉPARTEMENT

SUP



<b>Préface Adebiotech/SFGP -----</b>	<b>4</b>
<b>Préface Président du Comité Scientifique J-L Simon-----</b>	<b>5</b>
<b>Programme détaillé -----</b>	<b>6</b>
<b>Résumés des conférences -----</b>	<b>11</b>
<b>Résumés des posters -----</b>	<b>39</b>
<b>Partenaires</b>	
<i>INGREDIA</i> -----	<b>64</b>
<i>ROQUETTE</i> -----	<b>65</b>
<b>Stands -----</b>	<b>66</b>

## **Peptides issus des procédés d'hydrolyse : Filières Industrielles**

Ce colloque s'inscrit dans les démarches conjointes de deux associations ou Sociétés savantes suivantes :

a) Adebiotech qui a pour objectif de valoriser les biotechnologies en intervenant de manière transversale dans tous les champs d'applications afin de rassembler les acteurs pour les fédérer et accélérer le développement industriel.

b) La Société Française de Génie des Procédés (SFGP) dont l'objectif est de favoriser l'échange de connaissances entre les différents acteurs (chercheurs et enseignants-chercheurs, industriels et équipementiers) de l'industrie française.

Fidèles à leurs stratégies, Adebiotech et la SFGP, chacune dans leurs spécificités, réunissent autour d'un thème innovant et appliqué une dimension non seulement scientifique, mais également industrielle et de procédé, économique et réglementaire.

L'objectif est toujours de mettre en évidence les perspectives les plus prometteuses et les actions à mener. Un rapport est mis à disposition pour les différents acteurs et institutionnels responsables des programmations.

Ce colloque a pu s'organiser grâce à la collaboration enthousiaste et fructueuse des membres du Comité d'organisation appartenant aux deux associations partenaires (Adebiotech et SFGP) et du Comité Scientifique.

Nous sommes reconnaissants aux entreprises qui ont soutenu cette manifestation.

Nous remercions également Biocitech et Sup'Biotech pour leur soutien ainsi que le Ministère du Développement productif pour son parrainage.

Nous remercions les intervenants et l'ensemble des participants en souhaitant à tous un excellent colloque et de fructueuses discussions.

*Danielle LANDO*  
*Adebiotech*

*Joseph BOUDRANT*  
*SFGP*

Chers Collègues,

C'est à la fois un grand honneur et un plaisir de vous accueillir au colloque «Hydrolysats de protéines» qu'Adebiotech et la SFGP organisent ces 2 et 3 octobre à Romainville.

Les protéines, molécules constitutives ou fonctionnelles de tout organisme vivant, quelle qu'en soit l'origine, sont biosynthétisées à partir des briques élémentaires que sont les acides aminés ; certains de ceux-ci étant essentiels aux mammifères qui sont incapables de les produire.

L'alimentation nous apporte, via les protéines des organismes vivants que nous consommons, des sources d'azote indispensables pour fabriquer nos propres protéines. La digestion puis le catabolisme cellulaire sont le siège naturel des hydrolyses enzymatiques de ces protéines.

Depuis longtemps, l'Homme a cherché à reproduire ces hydrolyses industriellement pour obtenir une grande diversité d'hydrolysats de protéines aux propriétés rhéologiques, organoleptiques, de conservation, nutritionnelles et de santé très diverses.

La maîtrise des procédés de production, des techniques de caractérisation physico-chimiques et des propriétés fonctionnelles des hydrolysats sont au cœur de ses préoccupations. S'agissant de denrées alimentaires ou d'ingrédients pour la Cosmétique ou la Pharma, la réglementation encadre cette activité de façon stricte.

La mise sur le marché d'un hydrolysats de protéine nécessite donc de lever un grand nombre de verrous.

Je formule le souhait que les conférences, posters et débats de ce colloque éclaireront les participants sous différents angles et leur permettront de nouer de nouveaux contacts ou partenariats.

Bon colloque.

Bien cordialement.

*Jean-Luc SIMON (Ingrédia)*

*Président du Comité Scientifique*

9H45 **Conférence introductive au colloque**  
*Jean-Luc Simon, Ingredia, Arras*

10H15 **Diminution de l'allergénicité (Conférence anticipée de la session 2)**  
*Jean-Michel WAL, INRA/CEA, Gif-sur-Yvette*

---

## **SESSION 1 : PROCÉDÉS D'HYDROLYSE, D'EXTRACTION, DE SÉPARATION, DE PURIFICATION ET OUTILS DE CARACTÉRISATION**

---

*Animateurs - Pascal Dhulster, Univ. Lille 1 - Philippe Looten, Roquette, Lestrem*

10H45 **Conférence introductive : Génération d'hydrolysats protéiques et enrichissement en peptides bioactifs : vers une production intégrative ciblée**  
*Romain KAPEL, CNRS, Univ. de Lorraine*

### **Thème 1 : Procédés d'hydrolyse et de fractionnement**

11H05 **Développements récents de protéases spécifiques. Exemples d'applications industrielles**  
*David GUERRAND et André DE ROOS, DSM Food Specialities, Delft*

11H25 **Les technologies à membranes pour la séparation de peptides bioactifs : techniques disponibles, avantages et limites**  
*Laurent BAZINET, Univ. Laval, Québec*

11H45 **La chromatographie de partage centrifuge en mode échange d'ions : un outil novateur pour la capture de peptides d'intérêts au sein d'un hydrolysat de RuBisCO**  
*Leslie BOUDESOCQUE, Univ. de Tours François Rabelais*

12H05 **Étude d'un nouveau procédé de fractionnement des co-produits de fabrication de jambon sec et des propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des extraits peptidiques**  
*Christine RAYNAUD, CATAR-CRITT Agroressources, Univ. de Toulouse*

12H25 **Le séchage des peptides et de protéines actives par atomisation et fluidisation**  
*Philippe THONART, Univ. de Liège*

12H45-14H00 **Buffet / Posters**

### **Thème 2 : Techniques de caractérisation et de quantification**

14H00 **Développement d'outils de caractérisation de petits peptides en mélanges complexes : un pas vers l'identification, la compréhension des bioactivités, et la purification rationnelle de molécules d'intérêt**  
*Christelle HARSCOAT, CNRS Univ. de Lorraine*

14H20 **Apport de l'instrumentation RMN Bruker dans l'étude de peptides en solution ou sous la forme solide**  
*Pedro LAMEIRAS, Bruker BioSpin, Wissenbourg*

14H40 **Les peptides : un rôle essentiel dans l'élaboration et les fonctionnalités des produits laitiers**  
*Valérie GAGNAIRE, INRA, Rennes*

15H00-15H30 **Pause café / Posters**

---

### SESSION 2 : APPLICATIONS FONCTIONNELLES, NUTRITIONNELLES, COSMÉTIQUES ET DE SANTÉ

---

*Animateurs - Claire Gaudichon, AgroParis Tech - Vincent Fournier, Aquativ*

- 15H30 **Conférence introductive : Intérêts des hydrolysats protéiques et des biopeptides alimentaires en santé humaine et animale**  
*Vincent FOURNIER, Aquativ, Elven*
- 16H00 **Modification de la capacité antioxydante et des propriétés émulsifiantes d'un hydrolysat de coproduits marins par réaction de Maillard en conditions contrôlées**  
*Fabienne GUÉRARD, Univ. de Brest*
- 16H20 **Cryptides marins et syndrome métabolique**  
*Stéphanie BORDENAVE-JUCHEREAU, Univ. de La Rochelle*
- 16H40 **Purification, caractérisation et validation des effets santé d'hydrolysats de protéines de poissons et de biopeptides marins**  
*André MARETTE, Univ. Laval, Québec*
- 17H00 **Le peptide beta-CN(94-123), un peptide bioactif des laits fermentés, comme modulateur de la protection intestinale**  
*Pascale PLAISANCIÉ, INRA, Rennes/INSERM, Lyon*
- 17H20 **Dietary protein to stimulate muscle protein synthesis**  
*Lucas J.C. Van LOON, NUTRIM, Maastricht University*
- 17H40 **Les biopeptides anxiolytiques issus du lait, leur biodisponibilité et leur activité**  
*Yves LE ROUX, Laurent MICLO, Ensaia, Univ. de Lorraine*
- 18H00 **Development of new screening tools to evaluate bioactive peptides with ACE and CCK1R activity**  
*John VAN CAMP, Univ. de Gand, Belgique*
- 18H20 **Cocktail / Posters**

**Diminution de l'allergénicité (Conférence déplacée à 10h15)**

*Jean-Michel WAL, INRA/CEA, Gif-sur-Yvette*

---

### **SESSION 3 : ASPECTS RÉGLEMENTAIRES : INNOCUITÉ, BIO-MARQUEURS ET MODÈLES SOUTENANT LES ALLÉGATIONS**

---

*Animateurs - Pascal Vandekerckove, Lesaffre - Thomas Haertlé, INRA*

- 8H30 Conférence introductive : Développement d'un actif à allégation santé : aspects réglementaires**  
*Pascal VANDEKERCKOVE, Lesaffre International, Marcq-en-Barœul*
- 9H00 Adoption de la première liste d'allégations de santé génériques autorisées, quelles conséquences ?**  
*Julie UNZEITIG, DGCCRF, Paris*
- 9H15 Réglementation REACH et réglementation cosmétique en UE**  
*Jean-Luc GARRIGUE, Mérieux NutriSciences - BIOAGRI, Lyon*
- 9H30 Caractérisation et quantification de peptides pour la protéomique quantitative : aspects métrologiques**  
*Vincent DELATOUR, LNE, Chatillon*
- 9H45 Biomarqueurs d'intérêt dans le cadre de l'évaluation des allégations santé**  
*Camille NOURY, Pharmanager Development, Angers*  
*Adrien SCHEFFER, Biofortis*
- 10H15 Auxiliaires technologiques**  
*Elisabeth GOIDIN, Roquette, Lestrem*
- 10H30 Nouveaux ingrédients alimentaires : de l'idée à l'allégation**  
*Christophe RIPOLL, Naturalpha, Lille*
- 10H45 Etudes précliniques et cliniques pour soutenir une allégation santé**  
*Claire GAUDICHON, AgroParis Tech, Paris*
- 11H00 Pause café / posters**
- 11H15 Table Ronde (avec l'ensemble des intervenants)**
- 12H30-14H00 Buffet / Posters**

---

### **SESSION 4 : SUCCÈS ET VEROUS INDUSTRIELS, PERSPECTIVES DE DÉVELOPPEMENT**

---

*Animateurs - Alix Roger, ARD – Charles Delannoy, Procidys*

#### **14H00 Table Ronde 1 : Succès et verrous industriels**

*Alain BANIEL, Ingredia, Arras  
Bruno GEHIN, Roquette, Lestrem  
David GUERRAND, DSM, Delft  
Luce SERGENT, Copalis, Boulogne-sur-Mer*

#### **15H30 Table Ronde 2 : Perspectives de développement**

*Vincent FOURNIER, Aquativ, Pelven  
Karl LINTNER, KAL'IDEES, Paris, ex DG Sederma  
Pierre MORTAMAIS, Soft-Ingrédients/Takabio, Vatan  
Daniel THOMAS, Pôle IAR, Compiègne  
Philippe THONART, Univ. de Liège*

#### **17H00 Intervention Pierre ANGOT, DGCIS, Sous-directeur de l'industrie de santé, de la chimie et des nouveaux matériaux**

*Rôle de la DGCIS pour promouvoir l'innovation et l'économie industrielle*

#### **17H15 Conclusions et Propositions**



# Résumés des conférences

**Mardi 2 octobre - 10h15**

**Jean-Michel WAL – INRA/CEA SACLAY**

L'incidence des allergies alimentaires est en constante et rapide croissance. Des études récentes l'évaluent à plus de 3% de la population générale et 7 à 8% de la population pédiatrique. Le nombre d'aliments incriminés comme la sévérité des manifestations cliniques sont également en augmentation.

Les allergènes alimentaires sont en règle générale des protéines solubles. Lors d'un premier contact, l'allergène ingéré est plus ou moins complètement dégradé par les enzymes digestives avant d'être absorbé à travers la muqueuse intestinale, puis remanié par les cellules compétentes qui le présentent au système immunitaire.

Chez les individus génétiquement prédisposés, dits atopiques, la réponse immunitaire est alors dérégulée vers une production excessive d'une classe d'anticorps spécifiques particulière : les IgE. C'est la phase dite de sensibilisation qui ne se traduit par aucune manifestation clinique. Un contact ultérieur avec le même allergène, ou avec d'autres protéines qui partagent avec lui des structures immunoréactives (épitopes) communes déclenche la réaction allergique et les manifestations cliniques provoquées par la libération de médiateurs pharmacologiques actifs, notamment l'histamine. Les symptômes de l'allergie alimentaire se manifestent surtout au niveau cutané ou respiratoire et la prévention passe le plus souvent par un régime d'éviction.

L'allergénité peut donc se définir comme l'aptitude à induire la synthèse d'IgE spécifiques et/ou à être reconnu par ces IgE et déclencher une réaction.

Il n'existe pas de lien étroit actuellement bien établi entre la structure ou la fonction d'une protéine et son caractère allergène éventuel. Cependant les allergènes pourraient se caractériser par un certain nombre de propriétés physico-chimiques comme la stabilité à la température, aux pH acides et à la dégradation par les enzymes digestives.

L'hydrolyse d'une protéine entraîne sa dénaturation, la perte de sa structure spatiale avec la destruction des épitopes conformationnels voire même le clivage de certains épitopes séquentiels et donc en principe la perte ou la diminution de son allergénité.

L'utilisation de formules hydrolysées a été préconisée en ce sens pour l'alimentation de sujets sensibilisés, notamment dans le cas des enfants à risque allergique au lait de vache, voire même pour la prévention de sensibilisation ultérieure par les protéines du lait de vache chez des enfants atopiques, par induction ou rétablissement d'une tolérance orale.

Les critères qui sous tendent cette démarche sont cependant loin d'être absolus et les résultats sont variables selon les protéines concernées et selon le degré d'hydrolyse appliqué, hydrolyse poussée ou hydrolyse modérée et partielle. Il est maintenant bien démontré que la dénaturation et le clivage d'une protéine ne suppriment pas systématiquement son allergénité et que des fragments peptidiques, même de faible taille, peuvent conserver une partie non négligeable de l'allergénité de la protéine entière.

La réponse est également très variable selon le sujet exposé et il convient d'être prudent lors de l'utilisation d'hydrolysats ou de peptides dérivés d'allergènes chez des sujets allergiques. L'innocuité, la valeur nutritionnelle et l'hypoallergénité d'une formule hydrolysée doivent être étayées par des analyses immunologiques voire par des études cliniques dans le cas d'allégation santé. Il en est de même si l'absence d'allergénité d'un ingrédient alimentaire issu d'allergène(s) notoire(s) est revendiquée comme une conséquence de l'hydrolyse ayant servi à sa préparation pour s'affranchir de la récente réglementation d'étiquetage.

## GÉNÉRATION D'HYDROLYSATS PROTÉIQUES ET ENRICHISSEMENT EN PEPTIDES BIOACTIFS : VERS UNE PRODUCTION INTÉGRATIVE CIBLÉE

---

*Mardi 2 octobre – 10H45*

**Romain KAPEL** - *LRGP-UPR CNRS 3349, Univ. de Lorraine*

Les peptides bioactifs sont des fragments protéiques qui ont la propriété d'interagir avec certains systèmes biologiques et de provoquer un effet physiologique. Les interactions qui peuvent exister sont de trois grands types : (i) inhibition d'enzymes, (ii) interaction avec des récepteurs et (iii) déstructuration de membranes biologiques. Les effets physiologiques observés sont très variés. Il peut s'agir d'effets bénéfiques pour la santé humaine (activité anti-hypertensive, anxiolytique, saciétogène, ...), de propriétés anti-microbiennes ou, au contraire, stimulatrices de croissance de cellules procaryotes ou eucaryotes. Les peptides bioactifs intéressent donc principalement le secteur de la santé, des nutraceutiques, des milieux de cultures, de la santé et de la sécurité alimentaire.

Une voie classique de production de peptides bioactifs est la protéolyse enzymatique de protéines issues d'agro-ressources. Les peptides bioactifs sont alors produits au sein d'hydrolysats complexes (composés parfois de plus de 100 peptides différents). La variété des produits obtenus et les performances du procédé de protéolyse sont connues pour être dépendantes de la spécificité de coupure de la protéase et des conditions opératoires ( $t^\circ$ , pH et durée d'hydrolyse), mais la mise en œuvre reste globalement empirique (premier verrou). D'autre part, la complexité des hydrolysats rend difficile la mise en place de techniques de criblages pertinentes. Ce problème est d'autant plus important si les activités visées impliquent de résister à la protéolyse du tractus gastro-intestinal ou de passer dans la circulation sanguine (second verrou).

La complexité des hydrolysats fait aussi qu'il peut-être nécessaire de mettre en œuvre des procédés de séparation pour l'enrichissement en peptides bioactifs. Les procédés qui peuvent être utilisés pour cela à l'échelle industrielle sont principalement des procédés membranaires (haute productivité et faible sélectivité) et chromatographiques (haute sélectivité et faible productivité). Cependant, il est très difficile de prédire la performance de ces systèmes séparatifs pour l'enrichissement d'un peptide (ou d'une famille de peptides) cible, ce qui impose une stratégie de fractionnement peu rationnelle (troisième verrou). Enfin, la recherche de procédés de séparation innovants couplant haute sélectivité et productivité constitue le quatrième verrou majeur de cette filière.

L'objectif de cette conférence est d'appréhender chacun de ces verrous et d'indiquer les pistes suivies actuellement pour les résoudre, afin de permettre la production rationnelle et ciblée de produits contenant des peptides bioactifs.

## DÉVELOPPEMENTS RÉCENTS DE PROTÉASES SPÉCIFIQUES. EXEMPLES D'APPLICATIONS INDUSTRIELLES

---

**Mardi 2 octobre - 11h05**

**David GUERRAND, André DE ROOS - DSM FOOD SPECIALTIES, Delft**

Les protéases sont aujourd'hui parmi les enzymes les plus utilisées dans des applications industrielles, notamment dans le secteur des détergents mais également dans les procédés de transformation des aliments à base de lait, de viandes, de poissons ou encore de végétaux.

Le terme générique "protéases" englobe une très grande variété de fonctionnalités qui seront brièvement exposées. De nombreuses préparations de protéases actuellement commercialisées sont des produits à large spectre (non spécifiques) et contenant donc plusieurs protéases. Ces produits sont souvent définis par leurs conditions d'emploi (par exemple : protéases pour utilisation en milieu acide etc...).

Depuis plusieurs années le groupe néerlandais DSM travaille au développement de protéases spécifiques, ciblant des protéines bien définies pour de nouvelles applications industrielles.

L'exemple d'une protéase spécifique des protéines riches en proline ("Prolin Specific Protease" ou PSP) sera largement développé au travers d'applications dans le secteur de la transformation des céréales, de la brasserie et de la valorisation de sous produits animaux.

En conclusion de la présentation seront évoqués d'autres axes de développement dans le domaine des protéases spécifiques pour des applications dans le secteur agro-alimentaire.

## LES TECHNOLOGIES À MEMBRANES POUR LA SÉPARATION DE PEPTIDES BIOACTIFS : TECHNIQUES DISPONIBLES, AVANTAGES ET LIMITES

---

**Mardi 2 octobre - 11h25**

**Laurent BAZINET** - *Université Laval, Québec*

Depuis plusieurs années, les aliments fonctionnels et les nutraceutiques attirent l'attention des consommateurs, tout particulièrement pour leurs impacts sur la santé humaine et la prévention de certaines maladies. Par conséquent, la production et les propriétés des peptides bioactifs font l'objet d'un intérêt scientifique croissant. Considérant que la majorité des peptides fonctionnels sont présents dans des matrices complexes contenant un grand nombre de fractions protéiques hydrolysées, leur séparation et leur purification sont requises.

Les procédés conventionnels baromembranaires peuvent être utilisés pour la séparation de peptides et d'acides aminés mais ils sont limités à la fois par leur faible sélectivité, lorsque la séparation fait intervenir des biomolécules de tailles similaires, et les problèmes de colmatage. Pour améliorer la sélectivité de séparation de ces procédés, l'application d'un champ électrique externe durant la filtration baromembranaire a été proposée. Cependant, le gradient de pression induit l'accumulation des peptides à l'interface de la membrane de filtration et affecte la sélectivité de transport des membranes. Par conséquent, des procédés combinant un champ électrique comme force motrice avec des membranes poreuses ont été développés pour la séparation de peptides bioactifs afin d'obtenir des produits plus purifiés. Les composés de poids moléculaires supérieurs au seuil de coupure de la membrane de filtration peuvent être séparés. Les premiers essais, sur la séparation d'acides aminés et de peptides, ont été réalisés avec un module de filtration spécialement conçu et utilisant une seule membrane de filtration. Tout récemment, l'électrodialyse avec membrane de filtration a été mise au point et brevetée pour fractionner simultanément des peptides acides et basiques, par l'utilisation à la base d'une cellule d'électrodialyse conventionnelle, dans laquelle certaines membranes échangeuses d'ions ont été remplacées par des membranes de filtration.

Les perspectives dans le domaine de la séparation des peptides bioactifs sont la compréhension des interactions peptides/membranes de même que le développement de nouveaux matériaux de membranes limitant ou augmentant ces interactions afin d'accroître la sélectivité et les rendements de production de ces peptides spécifiques.

# LA CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE CENTRIFUGE EN MODE ÉCHANGE D'IONS : UN OUTIL NOVATEUR POUR LA CAPTURE DE PEPTIDES D'INTÉRÊTS AU SEIN D'UN HYDROLYSAT DE RUBISCO

---

**Mardi 2 octobre - 11h45**

**Leslie BOUDESOCQUE<sup>2</sup>**, Romain KAPEL<sup>3</sup>, Cédric PARIS<sup>3</sup>, Pascal DHULSTER<sup>4</sup>, Ivan MARC<sup>3</sup>,  
Jean Hugues RENAULT<sup>1</sup>

*1 : Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR) UMR CNRS 6229, Université de Reims  
Champagne Ardenne*

*2 : Infectiologie Santé Publique (ISP) UMR INRA 1282, Université de Tours François Rabelais*

*3 : Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP) CNRS, Nancy*

*4 : ProBioGEM, UPRES-EA 1026, Polytech'Lille, Boulevard Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq.*

La RuBisCO ou Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase (EC 4.1.1.39) est appelée également protéine blanche de luzerne. D'un point de vue nutritionnel, la RuBisCO est une protéine d'un intérêt majeur, du fait de sa richesse en acides aminés essentiels. Plusieurs équipes se sont penchées sur la production et la valorisation de concentrés de protéines blanches de luzerne, ainsi que sur la production d'hydrolysats à partir de ces concentrés.

L'hydrolysats décrit ici a été obtenu après action de Delvolase<sup>®</sup>. Il présente une teneur en matière sèche de 95 % environ et contient 90 % de peptides, de masse molaire moyenne 600 g.mol<sup>-1</sup>. Cet hydrolysats a montré une activité de type opioïde intéressante, et de plus parmi tous les peptides présents, un dipeptide en particulier est doué de propriétés inhibitrices de l'enzyme de conversion de l'angiotensine : le dipeptide ValylTryptophane (VW). L'enzyme de conversion de l'angiotensine étant une cible pour le traitement de l'hypertension artérielle, l'utilisation de cet extrait en tant que nutraceutique permettrait de bénéficier d'un effet antihypertenseur préventif. Cet emploi serait une valorisation intéressante, à condition d'augmenter la teneur en VW, initialement de 0,3 %, de l'hydrolysats.

La Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) est une technique chromatographique liquide/liquide sans support solide, qui a démontré un intérêt certain dans la capture d'analytes au sein de matrices complexes, notamment par la mise en oeuvre d'un mode particulier : le mode échange d'ions. L'utilisation de la CPC en mode échange d'ions mixte (MIXCPC)<sup>i</sup> pour la capture du VW dans notre hydrolysats de RuBisCO a permis l'obtention de fractions enrichies d'un facteur 41 en une seule étape, soit une teneur en VW de 11 %, avec un rendement en VW de 97 %. La montée en échelle du procédé n'a pas montré d'altération de la qualité de séparation.

<sup>i</sup> L. Boudesocque, L. Forni, M. Giraud, J. McGarrity, J.-H. Renault, Purification of amphoteric products, or of products liable to be converted into amphoteric products, WO2011157803 (A1) , EP20100305656 20100618

# ÉTUDE D'UN NOUVEAU PROCÉDÉ DE FRACTIONNEMENT DES CO-PRODUITS DE FABRICATION DE JAMBON SEC ET DES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES ET FONCTIONNELLES DES EXTRAITS PEPTIDIQUES

---

**Mardi 2 octobre - 12h05**

Sylvain Forêt<sup>1,2</sup>, **Christine RAYNAUD**<sup>1,2,3</sup>, Gérard Vilarem<sup>1,2</sup> et Luc Rigal<sup>1,2</sup>

1 : Université de Toulouse; INP; LCA (Laboratoire de Chimie AgroIndustrielle); ENSIACET, Toulouse, France

2 : INRA; LCA (Laboratoire de Chimie AgroIndustrielle); F-31029 Toulouse

3 : Centre de Ressources Technologiques CATAR-CRITT Agroressources; ENSIACET, Toulouse, France, christine.raynaud@ensiacet.fr

Le coproduit de fabrication de jambon sec est issu de l'opération de désossage de la cuisse de porc parée, salée, séchée et affinée. Il est constitué à plus de 85 % d'os et de tissus associés (cartilages, ligaments, tendons). Le concassage au broyeur à marteau permet d'homogénéiser le coproduit en morceaux de taille inférieure à 8 cm. La composition chimique de la matière sèche du mélange ( $77 \pm 3$  % de MS) est de  $33 \pm 5$  % en protéines (89 % de collagène, 14 % de protéines hydrosolubles, 6 % d'acide aminés libres),  $31 \pm 3$  % en lipides et  $26 \pm 4$  % de matière minérale. L'extraction aqueuse des lipides et des protéines du coproduit est étudiée en contacteur agité. Le raffinat solide est séparé par filtration à chaud sous forme de granulats et la matière grasse entraînée est séparée par décantation à froid. L'étude de l'influence des principaux facteurs de l'extraction liquide/solide grâce à la réalisation d'un plan d'expérience met en évidence les effets de la solubilisation et la coagulation des protéines sur l'entraînement des lipides et leur décantation sous forme de matière grasse. Mis en œuvre à l'échelle pilote (64 kg de coproduit de jambon sec concassé), le procédé de fractionnement aqueux conduit par filtration centrifuge et séchage à un granulats stable (rendement : 59 % ; matière minérale : 41 % ; protéines : 43 % ; lipides : 16 %), source de phosphate de calcium (95 % de la matière minérale) et de gélatine ou de colle d'os (88 % de protéines de nature collagénique). La fraction matière grasse décantée (rendement : 24 % lipides) présente les mêmes caractéristiques physicochimiques que le saindoux, avec une odeur proche de celle du jambon sec (19 COV aromatiques identifiés présents dans les arômes majoritaires de jambon). La fraction protéines solubilisées, obtenue sous forme de lyophilisat après concentration de la phase aqueuse (rendement : 8 % ; protéines : 52 %), contient aussi des glucosaminoglycanes sulfatés (GAGs : 3,4 %). Ces caractéristiques de composition, associées à ses propriétés épaississantes et gélifiantes, adhésives et stabilisantes d'émulsion, font de cette fraction minoritaire du procédé de fractionnement aqueux du coproduit de jambon sec, un extrait aux multiples applications à forte valeur ajoutée ; *i.e.* source de peptones pour la culture de champignons et de levures, adhésif et liant naturel, ingrédient de formulation alimentaire nutraceutique et cosmétique.

## LE SÉCHAGE DES PEPTIDES ET DE PROTÉINES ACTIVES PAR ATOMISATION ET FLUIDISATION

---

**Mardi 2 octobre - 12h25**

**Philippe THONART** - *Universite de Liège - CWBI*

Les procédés de séchage industriels sont variés et dépendants des propriétés des produits à traiter.

L'atomisation est une technique particulièrement utilisée pour les produits thermosensibles et spécialement les protéines.

L'exposé envisagera les procédés pour le séchage d'enzymes de différentes origines (microbiennes, végétales) et de différentes thermo-résistances.

Des exemples de peptides seront ensuite présentés.

En dernier lieu, une étude de la dimension des particules en fonction des conditions d'atomisation montrera les potentialités de cette technique pour la fabrication de poudres de l'ordre de quelques microns jusque 50-100 microns.

Ph. Thonart, Slim Zgoulli, Igor Bilik, Jacqueline Destain, Frank Delvigne

# DÉVELOPPEMENT D'OUTILS DE CARACTÉRISATION DE PETITS PEPTIDES EN MÉLANGES COMPLEXES : UN PAS VERS L'IDENTIFICATION, LA COMPRÉHENSION DES BIOACTIVITÉS, ET LA PURIFICATION RATIONNELLE DE MOLÉCULES D'INTÉRÊT

---

*Mardi 2 octobre - 14H00*

**Christelle HARSCOAT-SCHIAVO - CNRS LRGP**

De par leurs propriétés physico-chimiques et bioactivités potentielles, les petits peptides issus de protéines végétales présentent un grand intérêt pour les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques. Cependant, l'hydrolyse enzymatique de protéines conduit à un mélange complexe de peptides de tailles et propriétés variées. La production industrielle de peptides particuliers ou fractions peptidiques ciblées se heurte alors à d'importants problèmes de fractionnement, purification et caractérisation. Il est nécessaire i) d'élaborer des stratégies rationnelles de séparation pour adapter les étapes de purification aux peptides ou fractions d'intérêt, ii) de développer des outils de caractérisation performants en milieux complexes.

L'identification de petits peptides par chromatographie liquide (CL) couplée à la spectrométrie de masse (SM) tandem se heurte parfois à des difficultés, lorsque les mélanges contiennent des solutés de pouvoirs d'ionisation différents et que les protéines natives sont absentes des bases de données. Pour y remédier, nous avons conçu un logiciel d'aide à l'identification de peptides dont l'objectif est de prédire au mieux leur composition élémentaire en acides aminés.

Cet outil s'appuie sur les informations obtenues par combinaison de trois techniques analytiques (CL en phase inverse, CL à interactions hydrophiles, et électrophorèse capillaire) couplées à la spectrométrie de masse, et sur un logiciel calculant toutes les combinaisons d'acides aminés correspondant à une masse donnée. Pour chacune des séparations, un modèle a été établi permettant de prédire les propriétés physico-chimiques d'un peptide à partir de son élution. Les trois modèles obtenus sont utilisés pour trier la liste de toutes les combinaisons en acides aminés établie pour une masse déterminée. Les propriétés physico-chimiques étudiées : hydrophobie, hydrophilie et charge, présentent une complémentarité adéquate permettant une réduction supérieure à 95 % de la liste initiale.

Ce logiciel a été appliqué à l'identification de 24 peptides dans un hydrolysats de protéines de colza. Pour les petits peptides (< 300 g/mol), le logiciel a donné une seule combinaison finale, tandis que pour les plus grands (> 700 g/mol), la liste finale comportait une centaine de combinaisons sur les 3000 initiales. L'utilisation de banques de séquences de protéines de colza a montré l'existence de séquences peptidiques correspondant aux combinaisons déterminées, prouvant ainsi l'efficacité de la méthode.

Enfin, l'ensemble des informations obtenues par les diverses analyses et les modèles de séparation établis pourront être utilisés pour la mise en place de stratégies rationnelles de séparation afin d'adapter les étapes de purification des hydrolysats aux peptides ou fractions peptidiques d'intérêt ciblés.

# APPORT DE L'INSTRUMENTATION RMN BRUKER DANS L'ÉTUDE DE PEPTIDES EN SOLUTION OU SOUS LA FORME SOLIDE

---

**Mardi 2 octobre - 14H20**

**Pedro LAMEIRAS** - *Bruker BioSpin*

Les nouvelles avancées technologiques de l'instrumentation Bruker en Résonance Magnétique Nucléaire concernant les aimants, les consoles et les sondes de mesure accompagnés de logiciels d'acquisition et de traitement de plus en plus performants favorisent encore plus les études très variées de peptides de différentes tailles, de différentes concentrations, purs ou en mélanges, en solution ou sous la forme solide ; entre autres :

I. Études de la relation structure-activité(-dynamique) de peptides de petites à grandes tailles (protéines) :

=> en solution via l'utilisation de sondes de mesure cryogéniques refroidies à l'Hélium gaz et maintenant disponibles à l'Azote gaz en combinaison avec l'utilisation d'aimants à haut et à très haut champ magnétique (de 400 à 1000 MHz) favorisant ainsi l'étude de peptides de structures complexes à de très faibles concentrations.

=> sous la forme solide via l'utilisation de sondes de mesure solides MAS de manière à s'affranchir des interactions anisotropes, avec la possibilité de mettre à profit le transfert de polarisation d'un spin électronique vers un spin nucléaire de manière à améliorer la sensibilité grâce à l'utilisation d'un système DNP : gyrotron, aimant, console et sonde LT-MAS.

II. Études de caractérisation structurale et de quantification de mélanges peptidiques complexes en solution :

=> avec séparation chromatographique avant analyse RMN via le couplage LC-(SPE)-RMN

=> sans séparation chromatographique :

\* via la mise en œuvre d'expériences RMN de diffusion moléculaire DOSY

\* via l'utilisation de solvants ultrasoupleux afin de mettre à profit le phénomène de diffusion de spin, etc.

## LES PEPTIDES : UN RÔLE ESSENTIEL DANS L'ÉLABORATION ET LES FONCTIONNALITÉS DES PRODUITS LAITIERS

---

**Mardi 2 octobre - 14H40**

**Valérie GAGNAIRE<sup>1\*</sup>**, R. Richoux<sup>2</sup>, S. Jeanson<sup>1</sup>, J. Floury<sup>1</sup>, S. Lortal<sup>1</sup>

*1 : UMR1253, INRA Agrocampus-Ouest, Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, 65 rue de Saint Brieuc, F-35000 Rennes, France*

*2 : Actilait, BP 50915, F-35009 Rennes, France.*

*\*valerie.gagnaire@rennes.inra.fr*

Au cours des procédés de transformation des produits laitiers, l'hydrolyse des protéines est un des phénomènes biochimiques essentiels pour obtenir les caractéristiques finales tant sensorielles, nutritionnelles que santé, via les peptides produits. Ces peptides sont produits sous l'action de multiples enzymes, d'origine variée, présentes dans le lait (plasmine), ou ajoutées comme auxiliaire technologique (chymosine) ou issues des flores bactériennes.

Si l'action des protéases telles la plasmine et la chymosine ont d'ores et déjà été bien étudiées, des études sont en cours pour mieux connaître les protéases bactériennes localisées en surface et les peptidases intracellulaires qui sont relarguées lors de la mort des bactéries.

Nous proposons au cours de cette conférence de montrer en quoi ces peptides interviennent de manière cruciale dans les propriétés sensorielle (texture et flaveur), et sur la santé humaine au travers des peptides bioactifs, et quelles sont les limites pour contrôler la production de ces peptides in situ.

Ces peptides étant de mieux en mieux caractérisés, nous présenterons les dernières avancées en termes d'identification et de quantification des peptides dans des produits laitiers au moyen de techniques émergentes de type "omic" qui permettront à terme de comprendre l'élaboration et l'évolution de la qualité des produits laitiers.

## INTÉRÊTS DES HYDROLYSATS PROTÉIQUES ET DES BIOPEPTIDES ALIMENTAIRES EN SANTÉ HUMAINE ET ANIMALE

---

**Mardi 2 octobre - 15H30**

**Vincent FOURNIER - AQUATIV - Groupe DIANA Ingrédients**

Depuis de nombreuses années, les hydrolysats protéiques et peptides qu'ils contiennent font l'objet de recherches intensives pour la caractérisation des activités biologiques et de leurs applications.

L'hydrolyse enzymatique contrôlée de matières premières est une des méthodes les plus répandues pour la production de peptides bioactifs. Toutes les matières premières peuvent faire l'objet de réaction de protéolyse. Si les matières premières d'origine laitière ont fait l'objet de nombreuses recherches sur les peptides bioactifs, les matières premières d'origine marines sont particulièrement étudiées pour la performance des peptides générés. Les ovo produits et les matières premières d'origine végétales sont également de très bons substrats pour la production de peptides d'intérêt. Le contrôle très strict des conditions opératoires (enzymes, température, durée, hydrolyse, Ph, ...) permettra de standardiser la production de peptides ainsi que leurs performances. Le champ d'application potentiel des peptides et hydrolysats est très large : alimentation et santé animale et humaine, cosmétique, ...

Une application très répandue des hydrolysats en alimentation animale concerne l'augmentation de l'appétence des aliments, agissant indirectement sur le bien-être animal. L'utilisation d'hydrolysats de matières premières carnées et marines se pratique couramment dans les industries du Pet-Food (chien et chat) et chez les animaux de rente (porcelet, poissons et crevettes). En aquaculture, les performances qui leur sont attribués sont une amélioration des performances zootechniques, des performances digestives de l'animal (maturation système digestif et transport intestinal des nutriments) et une stimulation du système immunitaire non spécifique des animaux.

Chez l'homme, la prise alimentaire de peptides et d'hydrolysats est très pratiquée chez les sportifs pour des objectifs de récupération après l'effort ou de prise de masse musculaire.

L'alimentation sous forme de peptides/hydrolysats est courante chez les sujets atteints de syndromes de malabsorption des nutriments. Les hydrolysats et peptides sont également reconnus pour leurs effets satiétogènes et ainsi prévenir des phénomènes d'obésité. D'autres activités biologiques d'intérêt thérapeutique sont aujourd'hui reconnues aux peptides : anti-hypertensif, antioxydant, anti-inflammatoire, prévention des maladies cardiovasculaires et du diabète. Les activités antimicrobiennes reconnues pour certains peptides peuvent être particulièrement intéressantes pour des applications cosmétologiques ou médicamenteuses (substituts d'antibiotiques). Enfin, des propriétés anxiolytiques sont également reconnues aux peptides.

# MODIFICATION DE LA CAPACITÉ ANTIOXYDANTE ET DES PROPRIÉTÉS ÉMULSIFIANTES D'UN HYDROLYSAT DE COPRODUITS MARINS PAR RÉACTION DE MAILLARD EN CONDITIONS CONTRÔLÉES

**Mardi 2 octobre - 16H00**

**Fabienne GUÉRARD<sup>1</sup>, Claire Sabourin<sup>1</sup> & Nicolas Decourcelle<sup>2</sup>**

*Université de Bretagne Occidentale,*

*1 : LEMAR - UMR 6539, IUEM, Technopole Brest Iroise, 29280 Plouzané, France*

*2 : LUBEM - EA 3882, 6 rue de l'université, 29000 Quimper, France*

La recherche de nouveaux ingrédients d'origine naturelle est un défi majeur pour les industriels de l'agro-alimentaire. Les pistes explorées sont nombreuses, et parmi celles-ci, la réaction de glycation ou réaction de Maillard (RM) appliquée à des protéines ou des mélanges peptidiques suscite un intérêt croissant pour sa capacité à renforcer les activités antioxydantes et/ou les propriétés technofonctionnelles. Dans ce contexte, nous avons cherché à renforcer les propriétés émulsifiantes et antioxydantes d'un hydrolysat de coproduits marins par une RM en présence de différents glucides.

Une RM en milieu réactionnel pulvérulent et en conditions contrôlées a été développée à une température de 50°C et une humidité relative de 75 %. Un hydrolysat de crevette (SH; 150 mg.mL<sup>-1</sup>) a ainsi été modifié en présence de 90 mg.mL<sup>-1</sup> de glucides très réactifs tels que le xylose (Xyl) et le glucose (Glc), et de glucides peu réactifs tels qu'un fructo-oligosaccharide (FOS) et du dextran (Dex). Les modifications dues à la RM ont été explorées sous plusieurs angles, et nous avons démontré que :

(1) L'ordre de réactivité des glucides, évalué par la perte de lysine, est le suivant (du plus réactif vers le moins réactif) : Xyl > Glc > FOS > Dex.

(2) Des analyses chromatographiques (SEC-FPLC) révèlent que la RM entre l'hydrolysat de crevette et le xylose entraîne des réarrangements moléculaires se traduisant par l'apparition de composés de plus hauts poids moléculaires comparativement à l'hydrolysat de crevette natif (entre 1 et 7 kDa) et de nombreux composés cycliques, détectés respectivement à 220 et 294 nm.

(3) Quels que soient les tests in vitro mis en oeuvre, les produits de la RM obtenus avec le xylose possèdent des propriétés antioxydantes significativement améliorées par rapport à l'hydrolysat de crevette natif. Il en est de même pour les propriétés émulsifiantes : ainsi, à pH 7 et 0,05 %, on observe un ralentissement du déphasage des émulsions après un temps de vieillissement de 4h. De plus, à 0,5 % et pH 7, ils agissent en diminuant l'indice d'écoulement (n) et en augmentant l'indice de consistance (K) des émulsions.

(4) L'impact de la concentration en xylose sur la RM a été étudié afin de déterminer le ratio optimal SH : Xyl. Trois concentrations de xylose ont été testées : 90 mg.ml<sup>-1</sup>; 180 mg.ml<sup>-1</sup> et 360 mg.ml<sup>-1</sup>. La capacité antioxydante des produits de la RM augmente avec la concentration en xylose jusqu'à une concentration limite pour laquelle le maximum de composés antioxydants est produit. Enfin, une diminution du coefficient de consistance K et une augmentation de l'indice d'écoulement n ont été observées lorsque la concentration en xylose a été multipliée par 2.

En conclusion, la modification d'hydrolysats protéiques par RM conduite en conditions optimisées et contrôlées représente une solution innovante pour créer de nouveaux ingrédients de type "bi-fonctionnel" (à la fois antioxydants et émulsifiants) pour l'agro-alimentaire, la nutrition animale et la cosmétique. Les perspectives porteront sur l'évaluation de nouvelles propriétés technofonctionnelles telles que les propriétés gélifiantes, moussantes, filmogènes et antimicrobiennes des hydrolysats glyqués, puis fractionnés par classes de taille. Enfin, il conviendra de vérifier l'innocuité des composés néoformés, de valider leur conformité à la réglementation en vigueur et d'évaluer leurs caractéristiques organoleptiques.

**Mardi 2 octobre - 16H20**

**Stéphanie BORDENAVE-JUCHEREAU** - *Laboratoire LIENSs, Approches Moléculaires  
Environnement Santé*

Les cryptides sont des peptides bioactifs dont la séquence est cachée au cœur d'une protéine parent (Autelitano et al. 2006). De nombreux cryptides marins ont été isolés d'hydrolysats de muscles, peaux, arrêtes de poissons ou de coproduits marins en mélange (déchets de filetage, viscères...).

Les coquillages ou les crustacés sont également sources de cryptéines, protéines capables de libérer des cryptides.

Parmi les propriétés répertoriées, on retrouve, *in vitro*, des propriétés anticoagulantes suggérant une interaction possible avec les facteurs de coagulation. Des activités antioxydantes ont également été détectées tout comme des propriétés immunostimulantes. De plus, les cryptides marins peuvent se comporter comme des hormones ou des facteurs de croissance liés à l'absorption du calcium (Slizyte et al 2009) et peuvent inhiber l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) impliquée dans la régulation de l'hypertension artérielle. Leur activité est parfois même plus importante que celle d'autres peptides issus de ressources naturelles (soja, lait...) et a été également démontrée chez l'humain.

L'activité d'inhibition de l'ECA liée à la régulation de la tension artérielle est particulièrement étudiée car l'hypertension fait partie des pathologies du syndrome métabolique. Le syndrome métabolique rassemble plusieurs anomalies métaboliques que sont l'obésité, l'hyperglycémie, la dyslipidémie et l'hypertension. Les individus touchés par le syndrome métabolique présentent de forts risques de diabète de type 2 et de pathologies cardiovasculaires.

La lutte contre le syndrome métabolique et ses risques associés passe par une éventuelle modification des habitudes nutritionnelles et des traitements médicamenteux. Il a été montré que la présence de produits marins et en particulier de lipides marins dans la ration peut réduire les risques de pathologies cardiovasculaires.

En plus de "bons lipides" les poisons et autres produits marins peuvent apporter à l'organisme des cryptéines intéressantes capables de libérer des cryptides aux activités biologiques bénéfiques. Les applications potentielles des hydrolysats de protéines de poisson ne se cantonnent plus à la nutrition mais dérivent vers le maintien et la préservation de la santé. Ils deviennent pertinents dans la lutte contre le syndrome métabolique quand ils concernent la réduction de l'appétit (Cudennec et al. 2008) ou de la masse adipeuse.

Des travaux se focalisent sur le lien entre inhibition de l'ECA et réduction de la masse grasse. En effet, le Système Rénine–Angiotensine a été mis en évidence dans le tissu adipeux et joue un rôle dans la régulation du cycle adipocytaire (Goossens 2003). Des inhibiteurs synthétiques de l'ECA ont permis de diminuer la masse grasse chez des rats (De Kloet et al 2008) mais présentent des effets secondaires délétères. Les cryptides marins inhibiteurs de l'ECA sont certainement des alternatives/ou des compléments intéressants aux polyphénols car sont capables d'influencer l'homéostasie adipocytaire et le métabolisme énergétique. De plus, ces peptides peuvent contribuer à augmenter la sensibilité à l'insuline et donc réduire le diabète de type 2. Les cryptides marins sont donc des acteurs potentiels dans la lutte contre le syndrome métabolique.

**Mardi 2 octobre - 16H40**

**André MARETTE** - *Université Laval, Québec*

Dans leur lutte aux maladies liées à l'obésité, l'équipe du Dr André Marette, chercheur au Centre de recherche de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec — et les collaborateurs qui s'y associent —étudient, depuis plusieurs années maintenant, les vertus rattachées à la consommation de poissons. Plutôt cependant que d'orienter leurs travaux sur les seuls bienfaits des acides gras oméga-3 contenus dans certaines catégories de poissons, comme l'on s'y emploie actuellement le plus souvent, ceux-ci cherchent à comprendre le rôle bienfaiteur du contenu en protéine de l'espèce.

Déjà, les travaux réalisés par ce regroupement de chercheurs ont démontré que plusieurs protéines présentes en particulier dans le saumon, la bonite, le hareng et le maquereau empêchent l'apparition de molécules inflammatoires dans les tissus adipeux d'animaux nourris à l'aide une diète menant à l'obésité. Les chercheurs ont également observé chez les animaux consommant des protéines de saumon et de morue une amélioration de la sensibilité à l'insuline associée à une diminution de l'accumulation de la graisse viscérale dans le cas des animaux consommant la protéine de saumon.

Stimulé par ces résultats, l'équipe du Dr Marette cherche maintenant à identifier les peptides bioactifs présents dans ces protéines de poisson. En collaboration avec le Dr Laurent Bazinet de l'Université Laval (Québec) et du Dr Tom Gill de l'University of Dalhousie (Halifax), nous avons récemment isolés des fractions peptidiques à partir de protéines de saumon et de morue qui démontrent des activités biologiques au niveau du métabolisme du glucose dans les cellules musculaires et hépatiques, ainsi que sur l'inflammation au niveau des macrophages. Ces dernières cellules infiltrent le tissu adipeux des sujets obèses et jouent ainsi un rôle clé dans la développement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 en relâchant des molécules pro-inflammatoires. Des études en cours montrent également qu'une fraction peptidique purifiée des protéines de saumon permet de prévenir l'apparition du diabète chez des souris rendues obèses par un régime riche en gras et en sucre.

À terme, les recherches du Dr Marette et de ses collaborateurs pourraient donc mener à la production d'un aliment ou d'un supplément mettant à profit la synergie de l'ensemble des composantes peptidiques et lipidique du poisson, et ainsi prévenir le développement de l'obésité, du diabète et des nombreuses complications cardio-métaboliques associées

## LE PEPTIDE BETA-CN(94-123), UN PEPTIDE BIOACTIF DES LAITS FERMENTÉS, COMME MODULATEUR DE LA PROTECTION INTESTINALE

---

**Mardi 2 octobre - 17H00**

**Pascale PLAISANCIÉ** – *INRA, Rennes/INSERM, Lyon*

Introduction : Deux populations de cellules épithéliales jouent un rôle crucial dans la défense intestinale : les cellules à mucus qui produisent la mucine MUC2 à l'origine de la formation du gel de mucus, et les cellules de Paneth qui libèrent dans la lumière intestinale des molécules à action antimicrobienne (alpha-défensines, lysozyme, ..). Lors de travaux antérieurs, nous avons montré que la beta-casomorphine-7 (peptide opioïde issu de la beta-caséine bovine) était un puissant sécrétagogue du mucus intestinal, suggérant ainsi que des peptides bioactifs du lait pourraient renforcer l'arsenal défensif de l'intestin. Cependant pour être active par voie luminale, la beta-casomorphine-7 devait être administrée à des concentrations élevées ( $10^{-4}$  M). Parallèlement à ces résultats, des données de la littérature dévoilaient la présence de très nombreux peptides bioactifs dans les laits fermentés.

Objectifs et méthodes : Dans ce contexte, le premier objectif de notre étude était de déterminer si les pools peptidiques totaux (PPT) de yaourts pouvaient moduler la production de la mucine MUC2 in vitro sur la lignée intestinale mucipare humaine (HT29-MTX). Notre 2ème objectif a ensuite été d'identifier le peptide portant l'activité biologique et d'étudier son impact in vivo après administration par voie orale à des rats.

Résultats : Dans un premier temps, nous avons caractérisé puis testé in vitro les pools peptidiques de deux yaourts (C et F). Les résultats obtenus ont montré que les 2 PPTs induisent une augmentation dose-dépendante de l'expression et de la sécrétion de mucines intestinales par les cellules HT29-MTX. Parmi les fractions peptidiques obtenues par RP-HPLC préparative à partir des PPTs des deux yaourts, seules les fractions C2 et F3 étaient capables de reproduire l'effet in vitro des PPTs. Après identification et analyse des précurseurs de peptides bioactifs présents dans les différentes fractions actives et inactives, la séquence [94-123] de la beta-caséine faisait figure de candidat potentiel car présente uniquement dans les fractions C2 et F3. Testée sur cellules HT29-MTX, cette séquence peptidique, que nous avons appelé peptide beta-CN(94-123), a augmenté la production de la mucine sécrétée MUC2 et de la mucine membranaire MUC4. Cet effet était dose-dépendant, la réponse maximale étant observée à la dose de  $10^{-7}$  M ( $184 \pm 18$  % du CT et  $160 \pm 15$  % du CT pour MUC2 et MUC4, respectivement). L'étude menée chez le rat a montré en outre, que l'administration orale de ce peptide à des concentrations comparables à celles détectées dans un yaourt induit l'expansion des cellules à mucus et de Paneth le long de l'intestin grêle. Ces effets étaient associés à une augmentation de l'expression des mucines MUC2 et MUC4 et de facteurs antibactériens (lysozyme, rdefa5).

En conclusion : le peptide beta-CN(94-123), identifié dans les yaourts, est un nouveau peptide à effet santé ciblant le tractus intestinal. Grâce à son action sur les cellules à mucus et de Paneth, il pourrait maintenir ou restaurer l'homéostasie intestinale et jouer un rôle important dans la protection contre les agents délétères présents dans la lumière

**Mardi 2 octobre - 17H20**

**Lucas J.C. VAN LOON** - *Maastricht University*

Aging is accompanied by a progressive loss of skeletal muscle mass and strength, leading to the loss of functional capacity and an increased risk of developing chronic metabolic disease. The age-related loss of skeletal muscle mass is attributed to a disruption in the regulation of skeletal muscle protein turnover, resulting in an imbalance between muscle protein synthesis and degradation. As basal (fasting) muscle protein synthesis rates do not seem to differ substantially between the young and elderly, many research groups have started to focus on the muscle protein synthetic response to the main anabolic stimuli, i.e. food intake and physical activity. Recent studies suggest that the muscle protein synthetic response to food intake is blunted in the elderly.

The latter is now believed to represent a key factor responsible for the age-related decline in skeletal muscle mass. Physical activity and/or exercise stimulate post-exercise muscle protein accretion in both the young and elderly. However, the latter largely depends on the timed administration of amino acids and/or protein. Prolonged resistance type exercise training represents an effective therapeutic strategy to augment skeletal muscle mass and improve functional performance in the elderly.

The latter shows that the ability of the muscle protein synthetic machinery to respond to anabolic stimuli is preserved up to very old age. Though there has been much research on the impact of dietary co-intervention to maximize the impact of exercise training in young athletes, much less work has been performed in the elderly population. Research is warranted to elucidate the interaction between nutrition, exercise, and the skeletal muscle adaptive response at a more advanced age. The latter is needed to define effective strategies that will maximize the impact of exercise intervention to attenuate and/or reverse the loss of muscle mass and function with aging and, as such, support healthy aging.

## LES BIOPEPTIDES ANXIOLYTIQUES ISSUS DU LAIT, LEUR BIODISPONIBILITÉ ET LEUR ACTIVITÉ

**Mardi 2 octobre - 17H40**

**Yves LE ROUX** - Université de Lorraine, ENSAIA

**Laurent MICLO** - Université de Lorraine, IUT NANCY-BRABOIS

Les peptides bioactifs, issus de l'alimentation, pourraient être des signaux capables de moduler la physiologie du consommateur et font l'objet de nombreux travaux. La connaissance de leur action *in vivo* est cruciale pour valider l'emploi de ces molécules comme aliments fonctionnels dans une démarche de prévention et constitue aussi une demande des organismes en charge de l'attribution des allégations. Si de nombreux peptides ont été mis en évidence *in vitro*, peu de travaux se sont attachés à l'étude de leur devenir dans l'organisme, le plus souvent parce que la fonction biologique portée par ces peptides était modifiée *in vivo*. *A contrario*, l'étude de l' $\alpha$ -casozépine ( $\alpha$ -CZP), peptide anxiolytique *in vivo*, mis en évidence à Nancy (Miclo *et al.*, 2001), est intéressante car il pourrait agir au niveau du système nerveux central et se doit donc de franchir les différentes barrières biologiques pour atteindre sa cible. L' $\alpha$ -CZP, correspondant au fragment 91-100 de la caséine  $\alpha_{S1}$  bovine, présente un profil benzodiazépine-mimétique sans les effets secondaires occasionnés par ces molécules thérapeutiques. C'est un peptide avec une activité originale, puisqu'un nombre réduit de peptides présente une telle activité de réduction du stress (notamment la  $\beta$ -lactotensine).

Les activités anxiolytique et potentiellement anticonvulsante de l' $\alpha$ -CZP semblent s'exercer au niveau du SNC, impliquant que le peptide actif franchisse les différentes barrières biologiques afin d'atteindre sa cible. Les résultats obtenus avec ces peptides suggèrent que des peptides alimentaires pourraient franchir en quantité physiologiquement active la barrière intestinale, considérée comme le point critique pour leur biodisponibilité.

La biodisponibilité intestinale de l' $\alpha$ -CZP a été évaluée dans des publications récentes (Cakir-Kiefer *et al.*, 2011a et b). Il a été montré *in vitro* que l' $\alpha$ -CZP en présence de protéases gastriques et pancréatiques était presque totalement hydrolysée en donnant un fragment résistant : le fragment 91-97 de la caséine  $\alpha_{S1}$ . Cet heptapeptide, dénommé Lactazen<sup>®</sup>, présente une activité anxiolytique mesurée sur modèle rat dans trois tests. L'étude sur modèle Caco-2 de l' $\alpha$ -CZP et du Lactazen<sup>®</sup> a montré qu'ils sont capables de traverser la monocouche avec une perméabilité apparente augmentée et une hydrolyse diminuée en présence de sels biliaries. Bien qu'un transfert paracellulaire de ces peptides soit privilégié, d'autres voies ne sont pas exclues.

Le mode d'action de ces peptides demeure inconnu. Un hydrolysats contenant l' $\alpha$ -CZP, présente une activité anticonvulsante et anxiolytique chez le rat et le peptide actif a été caractérisé par compétition avec du flunitrazépam tritié pour le site benzodiazépine du récepteur GABA<sub>A</sub>. De fait, cette voie d'action est privilégiée. Néanmoins, alors que le diazépam et l' $\alpha$ -CZP présentent une activité biologique similaire dans une même gamme de concentration, le rapport d'IC<sub>50</sub> entre les deux molécules est de 10.000. Le récepteur GABA<sub>A</sub> présente de nombreux sous-types et il se pourrait que l' $\alpha$ -CZP ne cible qu'un sous-type particulier, ce qui pourrait expliquer l'absence d'effets secondaires. Ce sous-type pourrait être présent en faible quantité avec une fonction pharmacologique significative ou le flunitrazépam, ayant servi à réaliser la compétition, pourrait n'avoir qu'une faible affinité pour le sous-type de récepteur GABA<sub>A</sub>. Il a été montré que l'ocinaplon déplace le flunitrazépam avec une d'IC<sub>50</sub> de l'ordre du  $\mu$ molaire alors que son action *in vivo* chez le rat est comparable à celle du diazépam avec une action sensible au flumazénil. Si cette voie ne s'avérait pas être impliquée, d'autres voies ne sont pas à exclure : voie des opiacés, voie sérotoninergique, voie dopaminergique... qui pourraient agir seules ou en cascade.

## DEVELOPMENT OF NEW SCREENING TOOLS TO EVALUATE BIOACTIVE PEPTIDES WITH ACE AND CCK1R ACTIVITY

---

**Mardi 2 octobre - 18H00**

**John VAN CAMP<sup>2</sup>, Dorien Staljanssens<sup>1,2</sup> & Guy Smagghe<sup>1</sup>**

*1 : Laboratory of Agrozoology, Department of Crop Protection, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Ghent, Belgium*

*2 : Laboratory of Food Chemistry and Human Nutrition, Department of Food Safety and Food Quality, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Ghent, Belgium*

First, we report on different screening tools to evaluate the anti-hypertensive mechanisms of food derived bioactive peptides, using bovine gelatin hydrolysate (Bh2) as a case study. A thermolysin hydrolysate of Bh2 (Bh2t) showed high in vitro ACE inhibitory (ACE-I) activity, and a marked in vivo blood pressure-lowering effect in spontaneously hypertensive rats (SHR). In contrast, Bh2 showed no effect in SHR, confirming the need for extra thermolysin hydrolysis. Gastro-intestinal and mucosal digestion gave differences in ACE-I activity between Bh2 and Bh2t, which were neutralized after further ultrafiltration (3 kDa) to simulate absorption. An angiotensin I-evoked contractile response in isolated rat aortic rings was inhibited by Bh2t, but not by Bh2, suggesting ACE inhibition as the main underlying antihypertensive mechanism for Bh2t. Using mass spectrometry, seven small peptides, AG, AGP, VGP, PY, QY, DY and IY or LY or HO-PY were identified in Bh2t, and quantified relatively to Bh2. As these peptides showed ACE-I activity and were more prominent in Bh2t than in Bh2, the current data provide evidence that these contribute to the antihypertensive effect of Bh2t.

Second, we report on a new screening tool to evaluate the direct interaction of bioactive peptides with the cholecystokinin (CCK receptor type 1 (CCK1R), located on vagal afferents in the gastrointestinal tract, and active to induce a feeling of satiety. Bioactive peptides, released from food proteins by enzymatic hydrolysis, are promising candidates to bind directly to the CCK1R, thereby mimicking the effect of CCK. Such peptides can be used as satiating ingredients for the development of functional foods as an aid in the battle against obesity. We set up a cell-based bioassay using CHO cells expressing the CCK1R to screen for such peptides. Protein hydrolysates from soy showed potential to activate the CCK1R. Subsequently, those hydrolysates have been separated in different molecular weight fractions using size exclusion gel filtration chromatography. Different fractions obtained showed significant in vitro CCK1R activity.

More information can be found in:

*Herregods, G., Van Camp, J., Morel, N., Ghesquire, B., Gevaert, K., Vercruyssen, L., Dierckx, S., Quanten, E. & Smagghe, G. (2010). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of gelatin hydrolysates and identification of bioactive peptides. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 552-558.*

*Staljanssens, D., De Vos, W., Willems, P., Van Camp, J. & Smagghe, G. (2012). Time-resolved quantitative analysis of CCK1 receptor-induced intracellular calcium release. Peptides, 34, 219-225.*

*Staljanssens, D., Van Camp, J., Billiet, A., De Meyer, T., Al Shukor, N., De Vos W.H. & Smagghe, G. (2012). Screening of soy and milk protein hydrolysates for their ability to activate the CCK1 receptor. Peptides, 34, 226-231.*

**Mercredi 3 octobre - 8H30**

**Pascal VANDEKERCKOVE** - *Lesaffre International*

Dès l'initiation du projet de recherche et développement d'un actif, il convient de tenir compte d'un environnement réglementaire dense qui influe sur tous les aspects du développement produit (R&D, production, mise sur le marché).

La R&D doit anticiper les attentes des instances réglementaires pour les futurs dossiers AMM et s'assurer que les travaux sont conduits selon les bonnes pratiques de laboratoire ou d'étude clinique. Dans le domaine allégation santé, les modèles et protocoles expérimentaux, la plupart du temps mis au point pour tester des médicaments, doivent souvent être adaptés à l'évaluation d'actif destinés à l'alimentation. En particulier, le choix des biomarqueurs est très important. La démonstration du mode d'action fait aussi partie des exigences de l'expertise des dossiers de même que la caractérisation des produits (composition, structure, méthodes d'analyse, produits de dégradation, etc.).

Même si elle ne leur est pas spécifique, la production des actifs est tout aussi réglementée que ce soit dans le domaine notamment de la sécurité des travailleurs ou de la protection de l'environnement (réglementations OGM, REACH, solvants alimentaires, etc.).

Au niveau de la mise sur le marché, le domaine d'utilisation fixe la réglementation qui s'applique :

- Denrées alimentaires pour les compléments alimentaires à allégations nutritionnelles ou santé et les ingrédients fonctionnels, les additifs et les auxiliaires technologiques avec certains textes législatifs qui viennent se superposer comme par exemple les directives Novel Food ;
- Aliments pour animaux, notamment pour les additifs et les ingrédients nutritionnels ;
- Médicaments (actif) ;
- Cosmétique (ingrédients) ;
- Réglementation des produits phytosanitaires (actif).

Les dossiers de demande d'autorisation de mise sur le marché ou d'inscription à la liste des actifs ou ingrédients autorisés ont une structuration globalement similaire en 3 volets : Caractérisation, efficacité et toxicologie.

## ADOPTION DE LA PREMIÈRE LISTE D'ALLÉGATIONS DE SANTÉ GÉNÉRIQUES AUTORISÉES, QUELLES CONSÉQUENCES ?

---

**Mercredi 3 octobre - 9H00**

**Julie UNZEITIG - DGCCRF**

La Commission européenne a récemment adopté la première liste d'allégations de santé génériques autorisées. Ce nouveau dispositif devrait modifier en profondeur la communication destinée au consommateur dans le domaine des aliments santé.

Si ce texte européen engendre des conséquences majeures en terme de communication des entreprises alimentaires, il impacte aussi considérablement toute la stratégie d'innovation, de recherche et de développement de ces même entreprises.

Cette liste positive n'est pas exhaustive et ouvre la voie à de nouvelles allégations. Le dispositif européen mis en place est exigeant. Il peut par conséquent apparaître utile voire essentiel de bien le connaître afin d'orienter et d'optimiser au mieux les stratégies de recherche et de développement dans la perspective de l'obtention de nouvelles autorisations d'allégations

**Mercredi 3 octobre - 9H15**

**Jean-Luc GARRIGUE** - *Mérieux Nutrisciences (BIOAGRI)*

La société exige que les produits chimiques soient «sans danger». Cette exigence est encadrée par une législation spécifique pour la sécurité des produits chimiques, variable selon l'utilisation industrielle finale (chimie, cosmétique, alimentation, médicament).

Les premières étapes de l'évaluation de la sécurité d'un produit chimique reposent sur l'identification et la caractérisation des dangers liés aux ingrédients individuels qui le composent.

Il est d'usage de considérer que les données humaines sur la toxicité des ingrédients sont plus pertinentes pour l'évaluation de la sécurité chez l'homme que ceux obtenus à partir de l'exposition d'animaux de laboratoire. Toutefois, les expositions contrôlées de l'homme aux substances potentiellement dangereuses sont évidemment limitées par des considérations éthiques. Ainsi, lorsque des données cliniques ou épidémiologiques ne sont pas disponibles, comme pour des nouveaux produits chimiques de synthèse, les informations doivent être obtenues à partir d'essais in vitro (lorsque des méthodes validées sont disponibles) ou in vivo chez l'animal selon des protocoles spécifiques décrits dans les Lignes Directrices OCDE, en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire et dans des laboratoires accrédités.

Différentes approches réglementaires existent en fonction des secteurs d'utilisation des ingrédients chimiques. Dans l'Union Européenne, elles ont d'abord été décidées au niveau national, mais la plupart sont aujourd'hui harmonisées à l'échelle européenne, comme le règlement pour les produits chimiques concernant l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques (REACH) ou les ingrédients cosmétiques (Règlement Cosmétique).

Nous décrirons brièvement quelles substances chimiques sont concernées par REACH et par le Règlement Cosmétique et quelle est la démarche préclinique requise dans chaque cas pour identifier et caractériser les dangers pour la santé humaine.

## CARACTÉRISATION ET QUANTIFICATION DE PEPTIDES POUR LA PROTÉOMIQUE QUANTITATIVE : ASPECTS MÉTROLOGIQUES

---

**Mercredi 3 octobre - 9H30**

**Vincent DELATOUR** - *Laboratoire National de métrologie et d'Essais (LNE)*

En France, la réforme de la biologie médicale rendra obligatoire l'accréditation par le COFRAC de tous les laboratoires (publics comme privés) selon la norme ISO EN 15189 d'ici quelques années. Ce référentiel implique l'utilisation de procédures validées et dont les résultats doivent être raccordés à un étalon national ou international par le biais d'une chaîne de traçabilité métrologique ininterrompue.

Cette exigence de traçabilité est commune avec celles de la directive 98/79/CE de l'UE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro, qui impose que les valeurs associées aux matériaux d'étalonnage et de contrôle de la qualité soient traçables aux méthodes de référence et aux matériaux de référence certifiés disponibles. Partant du constat qu'il n'existe à l'heure actuelle qu'un nombre très limité de méthodes de référence à l'échelle nationale, le LNE - Laboratoire National de Métrologie et d'Essais - s'est engagé depuis plusieurs années à améliorer la disponibilité de méthodes de référence pour les principaux biomarqueurs utilisés en biologie clinique.

Ces travaux ont pour objectif d'assurer la traçabilité métrologique des résultats à des références reconnues internationalement et permettre la comparabilité des résultats dans le temps et d'un laboratoire à l'autre, même s'ils utilisent des techniques différentes. Les méthodes de référence permettent d'assigner des valeurs de référence non seulement aux matériaux d'étalonnage et aux matériaux de référence certifiés mais aussi aux échantillons de contrôle de la qualité, permettant ainsi d'évaluer la justesse des méthodes utilisées en routine dans les laboratoires de biologie médicale. Les méthodes de référence d'ordre supérieur reposent la plupart du temps sur la dilution isotopique associée à la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse (IDMS), qui est une méthode de haute exactitude permettant d'obtenir de très faibles incertitudes de mesures.

Dans le cas de biomarqueurs protéiques, l'état de l'art consiste à quantifier certains peptides issus de la digestion enzymatique de la protéine d'intérêt et qui sont caractéristiques de cette dernière. L'étalonnage repose sur des solutions de peptides standards et leurs homologues marqués avec des isotopes stables, dont la concentration et la pureté doivent être connues avec la plus faible incertitude possible.

A travers un exemple de projet portant sur la quantification d'une protéine ayant un intérêt en diagnostic, cette communication décrira les enjeux relatifs à la quantification absolue de protéines et de peptides par IDMS, les besoins actuels et émergents dans ce domaine, les aspects relatifs à la traçabilité des mesures, les outils analytiques nécessaires et la détermination des incertitudes de mesure

*Mercredi 3 octobre 9H45*

**Camille NOURY** - *Pharmanager Development, Angers*  
**Adrien SCHEFFER**, *Biofortis*

### **Qu'est-ce qu'un (bio)marqueur ?**

Un (bio)marqueur est une caractéristique mesurable de manière objective liée à un processus normal ou non.

Dans le cadre de l'évaluation des allégations de santé, les biomarqueurs ne se limitent pas seulement aux marqueurs biologiques, mais aussi à d'autres approches comme les mesures physiques, les questionnaires et les échelles d'évaluation entre autres.

### **Pourquoi s'intéresser aux biomarqueurs ?**

Le règlement 1924/2006/CE impose l'évaluation systématique des allégations de santé, au préalable de leur utilisation.

Trois points sont indispensables à l'obtention de l'autorisation d'une allégation de santé : un ingrédient bien caractérisé, un effet physiologique bénéfique et une relation de cause à effet établie entre l'ingrédient et l'effet allégué au sein d'une population adéquate. La vérification de ce dernier point passe par la conduite d'études cliniques humaines dont l'objectif est de démontrer des variations significatives de biomarqueurs après intervention.

À cette fin, et pour guider les industriels, l'EFSA a organisé une série de consultations publiques sur des thématiques spécifiques : fonction intestinale et immunitaire ; satiété, contrôle du poids et glycémie ; santé cardiovasculaire ; santé buccale, articulaire et osseuse ; fonction cognitive et performances physiques. À l'issue de ces consultations et sur la base des avis déjà rendus, l'EFSA a publié des documents d'orientation constituant des pistes pour la mise en place des études cliniques et donc la sélection de populations pertinentes et de marqueurs d'intérêt.

### **Quelques exemples ?**

Divers peptides (peptides du lait, du lactosérum, de collagène, de poissons et mycoprotéines) ont été soumis, sans succès, à évaluation par l'EFSA dans des thématiques diverses : cardiovasculaire, management du poids, articulation, fonction cognitive et immunité.

Ainsi, dans ses recommandations concernant la tension artérielle, l'EFSA attend la preuve d'une réduction à court et à long terme, avec un suivi par des méthodes validées et acceptées.

De même, pour une allégation relative à la satiété, l'EFSA indique que son évaluation n'est recevable que dans le cadre d'une allégation plus générale sur la perte de poids prolongée dans le temps.

Concernant le maintien d'articulations saines, les paramètres liés à la structure ou à la fonction articulaire pourraient être évalués, notamment par la mesure de l'interligne articulaire et l'évaluation de la mobilité, rigidité et inconfort par des questionnaires. Les athlètes ayant des douleurs articulaires pourraient constituer une population d'étude recevable.

Concernant les fonctions neurologiques et cognitives, des échelles d'évaluation de l'anxiété comme celle d'Hamilton peuvent être utilisées afin de montrer une réduction de l'anxiété. Ceci pourrait être bénéfique chez des personnes souffrant d'anxiété modérée.

### **Conclusion.**

Malgré les documents d'orientation de l'EFSA, le choix de biomarqueurs pertinents reste un point complexe face à la difficulté de montrer un bénéfice santé chez un individu sain.

**Mercredi 3 octobre - 10H15**

**Elisabeth GOIDIN** - *Roquette Frères*

Jusqu'à présent les auxiliaires technologiques ne font pas l'objet d'une réglementation particulière en Europe lors de la fabrication de denrées destinées à l'alimentation humaine. Par contre la France dispose d'un arsenal complet de dispositions réglementaires rendant systématique l'obligation d'autorisation de tous les auxiliaires technologiques pour chaque utilisation prévue.

En 2006, un arrêté donnait la liste fixe des auxiliaires technologiques qui pouvaient être utilisés dans les industries agroalimentaires

La France pour des raisons de droits communautaires, s'est vue obligée par la cour européenne de justice de modifier sa réglementation et aujourd'hui :

le décret n°2011-509 du 10 mai 2011 fixe les conditions d'autorisation et d'utilisation des auxiliaires technologiques, l'arrêté du 7 mars de la même année donne les lignes directrices pour la constitution des dossiers en vue de leur autorisation mais il n'en demeure pas moins que l'arrêté du 19 octobre 2006 ainsi que ces amendements restent applicables.

Ces modifications, nous le verrons, s'appliquent dans un cadre bien précis.

Parmi les auxiliaires technologiques, se trouvent un certain nombre d'enzymes, l'utilisation et l'autorisation de ces derniers se trouvent, elles, régies par le règlement (CE) N° 1331/2008.

Ce règlement s'est vu compléter en 2011 par le règlement (CE) N° 234/2011 pour sa mise en application, tout enzyme avant que d'être autorisé devra être évalué au travers d'un dossier déposé auprès de l'EFSA.

En résumé : un enzyme non autorisé ne pourra pas être utilisé (action du fabricant), l'application devra également être connue et autorisée par les autorités compétentes (action commune avec l'utilisateur), et c'est bien l'autorité compétente qui lui donnera son statut d'auxiliaire ou d'additif (action d'étiquetage). Encore une fois tant que l'application n'en est pas effective en France, c'est l'arrêté de 2006 version consolidé qui s'applique.

**Mercredi 3 octobre - 10H30**

### **Christophe RIPOLL - NATURALPHA**

Le marché mondial des ingrédients alimentaires connaît un essor important depuis les 10 dernières années en raison d'une demande accrue de l'industrie agroalimentaire de solutions technologiques et d'actifs Santé.

Les hydrolysats de protéines et les peptides, en raison de leurs effets bénéfiques sur la santé humaine, présentent un potentiel intéressant pour le développement de nouveaux produits dédiés au marché de la Nutrition-Santé. Si à ce jour la plupart des investigations ont été réalisées sur des hydrolysats de protéines et de peptides issus du lait ou d'origine marine, de nombreux programmes de R&D cherchent à identifier et à valoriser de nouvelles sources protéiques animales et végétales, notamment à partir de coproduits.

Lors du développement d'un nouveau produit alimentaire, il est de la responsabilité de l'industriel à l'origine de la production de l'ingrédient candidat de s'assurer de son innocuité pour l'homme. Il est donc primordial d'intégrer très en amont lors de la mise en place du projet R&D, la problématique de son statut réglementaire, notamment vis-à-vis du Règlement (CE) n° 258/97 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires.

Ce règlement qui encadre la mise sur le marché d'ingrédients alimentaires définit un nouvel aliment comme : tout aliment/ingrédient alimentaire pour lequel la consommation humaine est restée négligeable dans la Communauté Européenne avant le 15 mai 1997, et relevant d'une des catégories suivantes :

- contenant des OGM
- produit à partir d'OGM, mais n'en contenant pas
- présentant une structure moléculaire primaire nouvelle ou délibérément modifiée
- composés de micro-organismes, de champignons ou d'algues isolés à partir de ceux-ci
- composés de végétaux ou isolés à partir de ceux-ci, ou d'ingrédients alimentaires isolés à partir d'animaux (sauf ceux obtenus par des techniques traditionnelles de multiplication/reproduction et ayant un historique de consommation alimentaire sûr).
- auxquels a été appliqué un procédé de production non couramment utilisé, lorsque ce procédé entraîne dans la composition /structure des aliments – ingrédients alimentaires des modifications significatives de leur valeur nutritive, de leur métabolisme ou de leur teneur en substances indésirables.

Dans le cadre de ce règlement, il est nécessaire de faire la preuve que l'ingrédient alimentaire nouveau ne présente aucun danger de consommation, qu'il ne doit pas ni induire le consommateur en erreur ou différer, dans sa composition, des aliments et des ingrédients alimentaires qu'il remplace au point que sa consommation normale induirait des effets nutritionnels indésirables. L'autorisation de mise sur le marché fait l'objet d'une procédure d'évaluation (complète ou simplifiée) par la commission européenne.

Un aliment non « nouveau » peut être commercialisé, sans évaluation préalable, sous réserve de respecter les obligations légales s'appliquant aux niveaux communautaire et national. L'entreprise concernée doit cependant être en mesure de délivrer les éléments prouvant que la consommation humaine de cet aliment n'était pas négligeable avant le 15 mai 1997 dans la Communauté Européenne.

Sur la base de ces critères, il est donc évident que les choix par l'industriel de la source protéique, de la technologie d'hydrolyse vont avoir des conséquences importantes sur la structure, la durée et le budget de son projet R&D et sur la mise sur le marché de son ingrédient.

Durant la présentation, nous ferons une revue des critères à prendre en compte pour évaluer le statut « nouvel aliment » de l'ingrédient, des éléments à fournir pour la procédure d'évaluation, en s'appuyant notamment sur l'exemple du dossier Valtyron®.

**Mercredi 3 octobre - 10H45**

**Claire GAUDICHON** - *AgroParisTech*

Un nombre croissant d'aliments font l'objet d'allégations nutritionnelles et de santé. En 2006, l'UE a adopté un règlement concernant l'utilisation des allégations nutritionnelles et de santé portant sur les denrées alimentaires (le Règlement 1924/2006 concernant les allégations nutritionnelles et de santé portant sur les denrées alimentaires ; et le Règlement 353/2008 et son rectificatif 1169/2009 de la Commission fixant les dispositions d'exécution relatives aux demandes d'autorisation d'allégations de santé). Ces règlements établissent des règles harmonisées au niveau de l'Union pour l'utilisation des allégations nutritionnelles et de santé basées sur des profils nutritionnels. Un des objectifs clés de ce règlement est de garantir que toute allégation figurant sur l'étiquette d'un aliment vendu au sein de l'UE soit claire et justifiée par des preuves scientifiques objectives. L'EFSA est chargée de vérifier le bien-fondé scientifique des demandes d'allégations introduites et ses conclusions sont utilisées comme fondement scientifique par la Commission européenne et les États membres pour l'autorisation ou non de l'utilisation des allégations.

Les allégations de santé fonctionnelles génériques au titre de l'article 13.1 du règlement UE portent sur le rôle d'un nutriment ou d'une autre substance dans la croissance, le développement et les fonctions de l'organisme, les fonctions psychologiques et comportementales, l'amaigrissement et le contrôle du poids, la satiété ou la réduction de la valeur énergétique du régime alimentaire. Les nouvelles allégations fonctionnelles au titre de l'article 13.5 du règlement UE concernent les allégations basées sur des preuves scientifiques nouvellement établies et/ou qui contiennent une demande de protection de données relevant de la propriété exclusive du demandeur et leur autorisation est accordée au cas par cas, après évaluation par l'EFSA d'un dossier scientifique. Les allégations relatives à l'article 14 du règlement UE font référence à la réduction d'un risque de maladie ou au développement et à la santé infantiles et leur autorisation est accordée au cas par cas, après évaluation par l'EFSA d'un dossier scientifique.

La validation d'une allégation santé doit fournir une série d'éléments scientifiques objectifs concernant la caractérisation de l'aliment ou de l'ingrédient concerné, la validation des fonctions ciblées et des bio-marqueurs utilisés par rapport à un bénéfice pour la population concernée, la démonstration de l'effet allégué chez l'homme dans une population représentative de la population ciblée par l'allégation, et une explication du mécanisme par lequel l'aliment ou l'ingrédient concerné agit sur la ou les fonctions ciblées.

Les études précliniques sont en général réalisées *in vitro* et *in vivo* sur des modèles animaux. Ces études servent de point de départ pour montrer l'existence d'un effet de l'aliment ou d'un principe actif présent dans l'aliment. Elles doivent aussi permettre, dans la plupart des cas, à proposer des mécanismes des effets observés, et peuvent être antérieures ou postérieures aux études cliniques. Elles servent aussi à raisonner un protocole clinique, en sélectionnant les produits les plus efficaces, dans une fenêtre d'observation optimale, avec le souci d'obtenir une puissance statistique suffisante, mais tout en maîtrisant les coûts qui sont un frein important à la conduite de ces études chez l'Homme. Les paramètres qui répondent le mieux aux produits testés peuvent être sélectionnés sur la base de ces études. Les études précliniques peuvent aussi servir à s'assurer de l'absence de risque toxicologique.

Le passage des études précliniques aux études cliniques peut s'avérer difficile, et la transposition des effets obtenus chez l'Homme n'est pas garantie. En effet, les études chez l'animal sont réalisées dans des conditions très contrôlées qui réduisent la variabilité et de surcroît, des différences entre espèces ne sont pas rares, y compris lorsque les modèles sont appropriés. Pour exemple, l'effet

hypolipémiant et amaigrissant de certains CLA, spectaculaire chez le rongeur, a toutes les peines à être reproduit chez l'Homme.

La conduite d'études cliniques est encadrée ; tout protocole doit avoir obtenu l'agrément du Comité de Protection des Personnes et l'autorisation de L'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ex AFSSAPS). Le promoteur doit s'acquitter d'une taxe et souscrire une assurance, et confier l'étude à un investigateur, en général un médecin. Pour l'obtention d'une allégation, un point critique est le respect des bonnes pratiques d'études cliniques, telles que le choix de groupes témoins appropriés, un protocole en aveugle associé à un plan d'intervention et un traitement statistique adaptés, une analyse préalable de puissance sur les critères primaires de l'étude. Sont privilégiées lorsque cela est possible les études en cross-over et double aveugle pour les études d'intervention, et les études longitudinales pour les études observationnelles. Les standards permettant de définir le niveau de preuve apporté par l'étude sont similaires aux standards des études médicales et pharmaceutiques, mais il faut garder à l'esprit que les études nutritionnelles ne peuvent pas toujours être calquées sur ces standards. Formuler un placebo d'un supplément vitaminique ou minéral est possible, mais cela peut s'avérer compliqué lorsque les produits testés sont des aliments. Par exemple, tester le bénéfice d'une supplémentation en poisson ne peut se faire en comparaison d'un placebo. De même, le cross-over peut s'avérer impossible pour des longues périodes d'intervention, ou risque au minimum d'alourdir l'étude en termes de taille de population à recruter et de suivi. Concernant la population à recruter pour l'étude, les critères d'inclusion sont parfois évidents, comme par exemple lorsque l'on veut tester l'effet d'un produit hypocholestérolémiant, mais ils peuvent être très difficiles à appréhender. L'exemple des produits revendiquant un effet immunostimulant en est une parfaite illustration. Quelle population, en bonne santé, devra-t-on recruter pour montrer le bénéfice du produit ? Les cibles particulières se sont multipliées au cours des 2 dernières décennies dans les études cliniques visant à prouver le renforcement des défenses naturelles par un supplément, telles que les personnes fragilisées sur le plan gastro-intestinal par la prise d'antibiotiques, les séniors en période hivernale, les nourrissons atteints de diarrhée aiguë, les personnes sous protocole vaccinal ou encore sous traitement par radiothérapie ... mais on ne peut que constater que l'obtention d'allégations de santé reste dérisoire au regard des efforts de recherche déployés. Quant aux critères de jugement, ils sont particulièrement déterminants. Ainsi, concernant le maintien ou le développement de la masse musculaire, on ne peut malheureusement pas se contenter de prouver qu'un produit stimule la synthèse protéique, ce qui a été à maintes fois montré avec des ingrédients riches en leucine, mais que la masse musculaire est réellement maintenue (pour les personnes âgées par exemple) ou augmentée (pour les sportifs), critère la plupart du temps insensible aux suppléments nutritionnels. La prévention de la sarcopénie est d'ailleurs une parfaite illustration de la complexité à raisonner ces études en termes de protocole, de population cible, de modalité et de fenêtre d'administration, de témoins, etc...

Pour compliquer le tableau, un produit alimentaire qui ne serait pas exactement conforme, pour des raisons technologiques, organoleptiques, ou autres, au produit dont l'effet aurait été prouvé dans une étude clinique, peut ne pas bénéficier de l'allégation de santé. En outre, les profils nutritionnels définissent les exigences nutritionnelles globales auxquelles doivent satisfaire les aliments afin de pouvoir faire l'objet d'allégations nutritionnelles et de santé spécifiques. L'utilisation de profils nutritionnels vise à éviter une situation où des allégations nutritionnelles ou de santé pourraient induire les consommateurs en erreur quant à la qualité globale d'un aliment, lorsqu'ils s'efforcent de faire des choix sains dans le cadre d'une alimentation équilibrée.

En conclusion, l'obtention d'allégations de santé requiert un investissement important pour mettre en œuvre les études précliniques et cliniques. Les allégations proposées doivent être cohérentes avec les critères de jugement choisis dans les études et la population chez qui l'effet a été démontré. Les aspects méthodologiques ont une importance capitale dans l'obtention de ces allégations.

# Résumés des Posters

## **Relation entre l’Affinité d’un Acide Aminé pour un Ion métallique Immobilisé et sa Bioactivité : Etude à l’Echelle Moléculaire d’un Procédé de Séparation Sélectif de type IMAC**

**Latha-Selvi Laetitia CANABADY-ROCHELLE - CNRS**

A l’heure actuelle, les peptides présentant un intérêt potentiel sur le plan nutritionnel, pharmaceutique ou cosmétique, sont séparés selon des propriétés physico-chimiques déterminées, telles leur masse molaire, leur taille (nombre de résidus d’acides aminés, géométrie spatiale), leur charge (liée au potentiel isoélectrique), leur caractère hydrophile/hydrophobe ou encore leur affinité (KD) vis-à-vis d’un ion métallique immobilisé. Les peptides issus de l’hydrolyse de protéines du tourteau de colza, co-produit industriel provenant de l’extraction d’huile, semblent prometteurs en tant qu’agents nutraceutiques voire ingrédients fonctionnels du fait de leur fort pouvoir antioxydant lié à la présence élevée en résidus histidine. L’objectif de cette étude est de séparer des peptides d’intérêt en fonction de leur bioactivité.

À l’heure actuelle, cette approche n’est pas appliquée aux procédés de séparation préparatifs. Aussi, l’originalité de ce travail repose sur la séparation sélective de peptides selon leurs bioactivités en établissant une relation spécifique entre l’affinité d’un peptide vis-à-vis d’un ion métallique immobilisé (KD) et son activité anti-oxydante (pouvoir antioxydant) par le biais de ses propriétés physico-chimiques. La modélisation de la relation affinité / propriétés physico-chimiques ainsi que de la relation propriétés physico-chimiques / bioactivité, permettra, in fine, de modéliser l’affinité d’un peptide pour un ion métallique immobilisé en fonction de son pouvoir anti-oxydant.

Dans un premier temps, cette démarche a été validée sur certains acides-aminés libres ; c’est le cas pour l’histidine, la cystéine et le tryptophane (triade de Porath ayant une affinité connue pour les ions métalliques M<sup>2+</sup>) ainsi que pour l’alanine et la glycine (acides aminés contrôles). L’affinité pour un ion métallique immobilisé (KD) a été mesurée expérimentalement par des isothermes de sorption réalisées en batch et le pouvoir anti-oxydant a été déterminé par la méthode de l’ABTS

## État de structuration des protéines : un nouveau paramètre de contrôle de la protéolyse enzymatique

**Claudia NIOI - CNRS**

Le procédé de protéolyse enzymatique est un procédé désormais bien connu pour la valorisation des protéines issues d'agro-ressources, afin d'obtenir des hydrolysats / peptides à haute valeur ajoutée qui peuvent être employés notamment dans les domaines des nutraceutiques et de la cosmétique.

Actuellement, les paramètres de contrôle de procédés sont : les caractéristiques hydrolytiques liées à la spécificité ou non de l'enzyme utilisé, le pH et la température de réaction. Ces paramètres, qui définissent les conditions opératoires essentielles affectent la cinétique réactionnelle et les caractéristiques physico-chimiques des mélanges peptidiques obtenus. Par ailleurs, il est connu que ces paramètres opératoires impactent aussi l'état structural initial de la protéine, substrat de la réaction. Cet aspect structural n'est actuellement pas maîtrisé ni pris en compte pour le contrôle du procédé de protéolyse. Dans ce contexte, l'enjeu de cette étude est de quantifier et de qualifier l'effet de l'état structural de la protéine afin d'évaluer son effet sur la cinétique du procédé d'hydrolyse. Pour cela, les protéines modèles choisies sont les napines, des albumines, extraites du tourteau de colza. Le choix s'est porté sur ce type de protéines en vertu de leur faible taille moléculaire (de l'ordre de 14 kDa) et parce qu'elles disposent d'une activité anti-microbienne.

Pour répondre à cet objectif, une première étape de l'étude a conduit à observer l'impact des conditions opératoires (pH et température) sur les structures secondaire et tertiaire des napines qui ont été évaluées par les techniques de dichroïsme circulaire et de fluorescence. Par la suite, la protéine a été placée dans le réacteur, à pH et température fixés, en absence d'enzyme, pendant une certaine durée dite « phase d'incubation » (période de temps au cours de laquelle s'établit une modification structurale de la protéine correspondant à une « dénaturation »). Les cinétiques de protéolyse issue d'un substrat initial obtenu à différents états de structuration ont été comparées. Les résultats montrent que ce nouveau paramètre de contrôle a une influence sur le procédé d'hydrolyse conduisant à une modification de l'activité enzymatique et de la vitesse de réaction.

L'originalité de cette étude repose sur la qualification et la quantification de l'état structural de la protéine pour le contrôle du procédé de protéolyse enzymatique. Parallèlement, l'impact de ce nouveau paramètre sur la composition des mélanges obtenus et sur les propriétés fonctionnelles des hydrolysats produits a été étudié.

## **Use of electrodialysis with ultrafiltration membrane for the simultaneous enzymatic hydrolysis production and fractionation of bioactive peptides from beta-lactoglobulin**

**Laurent BAZINET** - *Université Laval*

The hydrolysis of  $\beta$ -lactoglobulin protein and the fractionation of generated peptides were performed in one step in an EDUF cell. After 240 min of treatment, amongst the 30 peptides peaks detected in the  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysate which corresponded to 30 peptides, respectively, 16 and 4 peptides were detected in the anionic and cationic peptide recovery compartment.

Amongst these 16 peptides, 2 hypocholesterolemic peptides, 3 antihypertensive peptides and 1 antibacterial peptide were recovered and concentrated with migration rates ranged between 5.5 and 66.0%.

Amongst the 4 cationic peptides, the peptide sequence ALPMHIR, identified as lactokinin and known to exert an important antihypertensive effect, was recovered and concentrated.

At our knowledge, it was the first time that hydrolysis was conducted under an electric field to simultaneously separate anionic and cationic peptides produced

## **Préparation à l'échelle pilote d'un hydrolysate pepsique décoloré et actif de l'hémoglobine : Source de peptides antibactériens**

**Naïma NEDJAR-ARROUME** - *Laboratoire de Procédés Biologiques Génie Enzymatique et Microbien (ProBioGEM)*

Trente peptides antibactériens ont été obtenus et identifiés à partir de l'hydrolysate pepsique de l'hémoglobine purifiée ou du cruor. La plupart sont des peptides intermédiaires. Ces peptides sont issus des chaînes alpha ou bêta de l'hémoglobine et classés en plusieurs familles. Dans un contexte de sécurité alimentaire et de protection des denrées à l'aide de produits naturels, ces peptides antimicrobiens dérivés de l'hémoglobine bovine ou porcine pourraient être intéressants comme moyen de conservation pour le stockage et la distribution des produits de la filière bovine ou porcine.

Toutefois la couleur rouge et l'amertume des hydrolysats empêchent leurs applications en alimentation humaine et animale. Une étude de la décoloration et de la diminution de l'amertume de ces hydrolysats a été réalisée pour faciliter leurs utilisations. Nous avons suivi la cinétique d'hydrolyse de l'hémoglobine (bovine ou porcine) par la pepsine et nous avons fait varier les paramètres d'hydrolyses tels que le pH et le type d'hémoglobine hydrolysée. L'hémoglobine dénaturée se décolore mieux que l'hémoglobine native. De plus, à pH 3,5 l'hémoglobine est naturellement transformée en hémoglobine dénaturée. C'est également sur cette solution que la meilleure décoloration a été obtenue.

Ensuite, l'amertume a été étudiée. Elle est en relation avec le degré d'hydrolyse. En effet, plus celui-ci est élevé plus la poudre se révèle amère. Ceci s'explique par le fait que de petits peptides amers se forment pour des temps d'hydrolyse assez longs.

## Voie de valorisation de l'hémoglobine bovine : modélisation de la cinétique enzymatique des peptides antimicrobiens

**Karima HEDHILI** - *Laboratoire de Procédés Biologiques Génie Enzymatique et Microbien (ProBioGEM)*

Au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine, l'ensemble des chemins réactionnels aboutissant à la formation des peptides est étudié en fonction du degré d'hydrolyse de la protéine. Les réactions protéasiques sont des réactions composites avec de nombreuses réactions parallèles et séquentielles qui se traduisent par des cinétiques et des mélanges peptidiques complexes évoluant au cours de l'avancement de la réaction. Les peptides actifs se trouvent généralement parmi les populations de peptides transitoires dont la séquence et la concentration sont sous contrôle cinétique. Ces études cinétiques et leurs modélisations permettront d'optimiser l'obtention d'un peptide actif particulier.

Plusieurs peptides bioactifs (analgésique, opioïdes, antimicrobiens,...) sont obtenus par hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine. Récemment, trente peptides antibactériens ont été obtenus. L'hydrolysate est donc un mélange d'un très grand nombre de peptides actifs.

La préparation de peptides à activités biologiques ou des fractions peptidiques enrichies en ces peptides à partir de protéines issues de l'agriculture présente alors un grand intérêt : en industries alimentaires, en pharmacologie, dans le domaine des aliments-santé ou dans le domaine de l'hygiène et de la sécurité alimentaire (comme ingrédients stabilisants des préparations alimentaires).

Un modèle mathématique de l'hydrolyse contrôlée pour l'obtention de ces peptides antimicrobiens est réalisé afin d'optimiser cette voie de valorisation. Un système d'équations différentielles a permis de modéliser l'ensemble des réactions parallèles et consécutives qui ont eu lieu au cours de l'hydrolyse. Une optimisation basée sur le modèle proposé a permis d'identifier les constantes cinétiques des réactions étudiées. Les résultats obtenus et le modèle proposé offrent la possibilité de contrôler le procédé d'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine.

## Influence de la microfluidique sur la modulation de la cinétique enzymatique

Rénato FROIDEVAUX - *Laboratoire ProBioGEM*

Les micro-réacteurs représentent un nouvel outil pour l'ingénierie des enzymes. Dans ce contexte, nous avons montré que l'écoulement laminaire dans des microcanaux influence la sélectivité cinétique de la réaction enzymatique impliquant l'hémoglobine et la pepsine. Les conditions réactionnelles (pH, température, concentration en réactants, temps de séjour...) étaient les mêmes dans les études en mode « batch » et « microfluidique », de manière à comparer les cinétiques d'hydrolyse à partir de l'analyse des profils chromatographiques d'hydrolysats peptidiques obtenus par HPLC de phase inverse.

En mode batch, l'hémoglobine est rapidement et complètement hydrolysée pour donner des peptides transitoires. Linderstrøm-Lang a développé un modèle pour expliquer ces phénomènes fréquemment observés lors de l'hydrolyse des protéines globulaires, appelé mécanismes « zipper » et « one by one ». Dans le mode microfluidique, de l'hémoglobine intacte reste dans le microréacteur et de petits peptides avec de faibles temps de rétention, combiné avec l'absence de peptides intermédiaires, montrent que la réaction enzymatique procède différemment qu'en mode batch, probablement en raison de l'écoulement microfluidique et des propriétés de diffusion de l'enzyme, du substrat et des peptides générés pendant la réaction.

Des simulations de diffusion et de mélange enzyme/substrat à l'intérieur du microsystème ont été réalisées avec le logiciel COMSOL, afin de prédire les concentrations de substrat et d'enzyme grâce à l'équation d'advection / diffusion. Enfin, un algorithme stochastique a été utilisé pour modéliser la cinétique d'hydrolyse du substrat en modes microfluidique et batch.

Cette étude démontre une nouvelle approche dans la modulation de la sélectivité de la catalyse enzymatique conduisant à un contrôle de la cinétique de réaction. Actuellement, certains paramètres physico-chimiques et de conception du microréacteur sont étudiés en mode microfluidique afin de déterminer leur influence sur la sélectivité de la réaction par rapport au mode batch.

## **Production and resistance of bioactive peptides from bovine hemoglobin during an in vitro simulated digestion.**

Jordan DEGUINES, Benoit CUDENNEC, Pascal DHULSTER and **Rozenn RAVALLEC**

*ProBioGEM, IUT A, Polytech'Lille, Villeneuve d'Ascq, France.*

The upgrading of food by-product in order to generate functional molecules that can play a role in the constitution of healthy ingredients is a major research challenge. One significant issue induced by the assimilation of these functional molecules in the body is their future throughout the whole digestion.

In this context, an in vitro simulation of the human gastrointestinal digestion was performed with native bovine hemoglobin in order to produce, identify and analyze the resistance of the generated bioactive peptides exerting potential anti-hypertensive activity in the gastrointestinal tract. Hydrolysates were obtained by the successive action of gastrointestinal endopeptidases. The samples, obtained at different times of the digestion, were analyzed by reversed-phase HPLC, enabled to follow the evolution of the peptidic population. These analyses allowed to demonstrate the production, during the intestinal phase, of peptides different from those usually obtained by the enzymatic hydrolysis of hemoglobin by the pepsin. These new peptides were generated during the first 15 minutes of hydrolysis after the action of pancreatin. The size and mass of peptides were determined respectively by FPLC and HPLC/MS.

The presence of bioactive peptide in hydrolysates was demonstrated by their ability to inhibit the activity of the Angiotensin I Converting Enzyme (ACE).

The simulated in vitro digestion reproduces hydrolysis conditions similar to physiological processes of an in vivo digestion and is an alternative to the conventional production of biologically active peptides while avoiding the potential harmful side effects.

## Fractionnement de peptides issus de l'hydrolyse des caséines par les protéases de surface de *Lactobacillus*

**Salima ROUDJ** ; BENOZZA.,S; ZADI-KARAM.,H et KARAM., N.E

*Laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie, Université d'Oran-Sénia, Oran, Algérie*

*salimaroudj06@yahoo.fr*

La voie de production des peptides biologiquement actifs est la protéolyse par les enzymes digestives (pepsine, trypsine) ou par voie fermentaire. Certaines bactéries lactiques (*Lactococcus* et *Lactobacillus*) génèrent ces peptides à partir de protéines laitières grâce à leurs protéases liées à la paroi ou intracellulaires.

Dans un objectif de produire, de caractériser et d'identifier les peptides à activité biologique, notre étude préliminaire a porté sur l'hydrolyse des caséines par les protéases liées à la surface des cellules de deux souches de lactobacilles BH14 et CHTD27 isolées de lait de chamelle et l'analyse par méthodes électrophorétique et chromatographique des hydrolysats générés. L'activité des protéases liées à la surface des cellules bactériennes et l'activité d'une enzyme digestive la trypsine ont été examinées sur la caséine totale en solution.

L'hydrolysats obtenu par la souche CHTD27 est plus enrichi en peptides (15,32 mU de Tyrosine) comparativement à la souche BH14 (10,42 mU de Tyrosine). Les caséines ont montré une sensibilité plus grande à la trypsine (72,39 mU de Tyrosine).

L'analyse électrophorétique des hydrolysats a montré que les caséines sont totalement hydrolysées par les cellules de la souche CHTD27 comme par la trypsine alors que, pour la souche BH14 l'intensité de la réaction d'hydrolyse reste faible.

L'analyse des hydrolysats par chromatographie sur couche mince a permis de mettre en évidence 9 peptides de Rf différents allant de 0,10 à 0,83 dans le cas de l'hydrolyse par la trypsine. Parmi eux deux peptides, de Rf 0,48 et 0,72 sont aussi retrouvés dans les hydrolysats obtenus avec les cellules des souches BH14 et CHTD27. Par ailleurs, les hydrolysats obtenus avec les cellules de la souche BH14 et de la souche CHTD27 ont révélé 3 peptides communs aux deux souches, de Rf 0,24 ; 0,64 et 0,67.

L'hydrolysats obtenu par la souche BH14 s'est distingué par la présence de 2 peptides de Rf 0,33 et 0,47. La chromatographie liquide à haute performance en phase inverse très utilisée pour la séparation des peptides a permis de définir le contenu des hydrolysats. 6 pics ont été révélés dans l'hydrolysats obtenu par la souche CHTD27 (1,047 ; 1,189 ; 2,176 ; 2,490 ; 2,829 ; 3,149) et 5 pics d'élution pour l'hydrolysats obtenu par la souche BH14 (1,043 ; 1,215 ; 2,197 ; 2,595 ; 2,775) avec des temps de rétention différents.

Par cette étude nous avons montré que les deux souches possèdent des protéases de surface capables d'hydrolyser in vitro la caséine totale à des sites de coupure différents, conduisant à des profils peptidiques distincts.

Mots clés : Protéases de surface ; *Lactobacillus* ; hydrolysats de caséines ; électrophorèse ; chromatographie sur couche mince ; chromatographie liquide à haute performance en phase inverse.

## Caractérisation structurale de peptides composants un hydrolysat protéique complexe

**Marie ROBERT** - FRE3484-CNRS INEE-Laboratoire de Biologie des Mollusques Marins et Ecosystèmes Associés

Les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles des hydrolysats protéiques dépendent essentiellement de leur profil de poids moléculaire, de leur abondance peptidique et des caractéristiques physico-chimiques des peptides qui les composent.

Dans un objectif de caractérisation structurale d'hydrolysats protéiques complexes, le principal challenge est la mise en place d'une méthodologie reproductible permettant la détermination de profils peptidiques d'hydrolysats protéiques en spectrométrie de masse, qui pourront ensuite être exploités pour l'identification des peptides (séquence en acides aminés, protéine d'origine) à partir des données génomiques disponibles. La forte abondance peptidique des hydrolysats impose de réaliser une étape d'extraction suivie d'une première étape de séparation dans le but de caractériser l'ensemble des peptides présents dans l'hydrolysat en spectrométrie de masse (MALDI-TOF/TOF).

Trois méthodes d'extractions peptidiques (acide à froid et à 100°C et acétone à froid) ont été combinées dans le but d'avoir une vue la plus exhaustive possibles des peptides composant l'hydrolysat. A l'issue de cette étape, la performance de plusieurs méthodes de séparation (en fonction de l'hydrophobicité, de la charge ou du point isoélectrique) ont été comparées.

Les analyses réalisées à partir d'un pool des trois extraits ne permettent pas d'obtenir de résultats exploitables après une première séparation en exclusion stérique ou en phase inverse. L'élimination de l'extrait à l'acétone, suspecté d'être riche en lipides, se traduit par un gain significatif du niveau de peptides détectés. Ainsi, les analyses réalisées après une première étape de séparation en phase inverse se traduisent par la détection de 600 m/z dans la gamme de masses 800-4000 Da et par l'identification d'une dizaine de peptides grâce aux données génomiques disponibles.

Le même échantillon soumis à une électrophorèse préparative (séparation en fonction du point isoélectrique) en première étape de séparation permet cette fois de détecter environ 9000 m/z. Corrélativement, près de 300 peptides ont pu être identifiés avec les mêmes données génomiques. L'électrophorèse préparative constitue donc une alternative performante pour l'analyse de matrices peptidiques complexes en spectrométrie de masse.

## Immobilisation d'enzymes par la technologie des plasmas froids

Rénato FROIDEVAUX - *Laboratoire ProBioGEM*

La polymérisation par plasmas froids est adaptée à la conception d'une interface entre les composants biologiques et des transducteurs physiques, qui sont les deux parties principales d'un Bio-MEMS. Les films polymérisés par plasma peuvent jouer un rôle important dans le contrôle et la manipulation de composants biologiques, tout en conservant leur activité. Dans ce contexte, nous avons étudié une méthode novatrice d'immobilisation d'enzymes grâce à un traitement par plasma froid : la  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal) a été utilisée comme cette étude. L'enzyme devra conserver son activité mais également présenter une stabilité au cours du temps (absence de relargage, activité stable).

La fabrication des revêtements bio-actifs est réalisé en utilisant un traitement en post-décharge d'un flux de Plasma d'azote et le 1,1,3,3-tétraméthylsiloxane (TMDSO) qui présente de bonnes propriétés de polymérisation ainsi qu'une toxicité très faible. Les caractéristiques du procédé et du produit final visent à inclure en une seule étape et grâce à un traitement rapide, une distribution homogène de l'enzyme dans les revêtements de polymère, une conservation de l'activité après immobilisation et une utilisation limitée de solvant. Différentes méthodes de dépôt ont été testées; l'enzyme déposée soit directement sur le support, soit sur une première couche de polymère recouverte ensuite par un dépôt, soit l'enzyme dans le polymère liquide injecté dans le réacteur et déposé sur le support. Les activités ont été mesurées en fonction du temps de dépôt du polymère, des quantités d'enzyme déposées, de la nature du support, du mode d'alimentation en substrat. La stabilité de l'activité enzymatique est déterminée grâce à l'étude de la conversion de l'ortho-nitrophényl- $\beta$ -galactoside (o-NPG) en ortho-nitrophénol (o-NP) après plusieurs séquences de lavage de l'échantillon. Enfin, nous avons étudié l'état de surface du revêtement déposé par microscopie à force atomique et microscopie électronique à balayage afin d'examiner sa topographie et son aspect après exposition à des tests d'activité différents. La technologie des plasmas froids a permis en une seule étape d'immobiliser la  $\beta$ -Gal tout en conservant son activité enzymatique. Actuellement, nous étudions la distribution de l'enzyme dans le revêtement de polymère. Ainsi, l'optimisation du processus d'immobilisation et une meilleure compréhension de l'effet des propriétés des revêtements sur l'activité enzymatique permettra le développement de nouveaux revêtements biofonctionnels pour des applications spécifiques. De plus, n'ayant recours qu'à très peu d'éléments chimiques, cette méthodologie de dépôt et d'immobilisation peut très bien s'inscrire dans les « Green Technologies ».

## Conception de membranes hydrophobes par fonctionnalisation en C18 : application pour la séparation de biomolécules de nature protéique

Romain KAPEL<sup>1\*</sup>, Hacène LOUNI<sup>1</sup>, Lætitia CANABADY-ROCHELLE<sup>1</sup>, Andreea PASC<sup>2</sup>, Carole LAINE<sup>3</sup>, Ivan MARC<sup>1</sup>

*\*Auteur correspondant : romain.kapel@ensic.inpl-nancy.fr*

*1 : Laboratoire Réaction et Génie des Procédés - UPR CNRS 3349, 13 rue du bois de la Champelle, 54500 Vandœuvre-Lès-Nancy, France*

*2 : Laboratoire Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes, Equipe Physico-chimie, Université de Lorraine, UHP, case 79, BP 239F, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy*

*3 : Amer-Sil S.A., 61 rue d'Olm, L-8281 Kehken, Luxembourg*

A l'heure actuelle, les peptides présentant un intérêt potentiel dans les différents domaines d'application, sont séparés par chromatographie liquide selon des propriétés physico-chimiques caractéristiques tels leur taille-poids moléculaire (Da), leur charge, leur affinité et/ou leur indice d'hydrophobie. Or, certains facteurs limitent l'utilisation de colonnes chromatographiques telle leur difficulté de mise en œuvre, leur faible productivité et un coût élevé des phases stationnaires.

Aussi, des procédés de séparation de biomolécules par membranes chromatographiques sont développés. L'objectif de cette étude est (1) de fonctionnaliser une membrane commerciale (Amer-sil, Kehlen, Luxembourg) par des groupements octadecyl afin de la rendre hydrophobe et (2) d'étudier son affinité à l'égard de biomolécules hydrophobes, telles que le tryptophane (acide aminé hydrophobe) et l'albumine bovine sérique (BSA), une protéine de référence. Après fonctionnalisation des particules de silice incluses dans la membrane par des groupements octadecyl (C18) par substitution nucléophile, le lavage de la membrane a été nécessaire afin d'éliminer les groupements C18 physi-sorbés.

Différents solvants (eau, toluène, et éthanol) ainsi qu'un traitement aux ultrasons ont été testés afin de déterminer les conditions optimales de lavage permettant la désorption des C18 adsorbés physiquement sans pour autant dénaturer la membrane. L'efficacité de lavage a été corrélée à des mesures de pertes de masse et les solvants récupérés après lavage ont été analysés par IRTF afin d'identifier les molécules désorbées. La membrane a été caractérisée par des mesures de porosimétrie au Hg afin de déterminer la taille des pores avant et après traitement aux ultrasons.

L'hydrophobie de la membrane a été caractérisée par des mesures d'angle de contact. Le lavage à l'éthanol (15 mn, agitation douce) s'avère être la méthode de lavage optimale. Dans une seconde étape, l'étude d'adsorption a été réalisée en conditions statiques, à l'équilibre thermodynamique. Les membranes hydrophobes obtenues par fonctionnalisation par des C18 adsorbent trois fois plus de BSA qu'une membrane hydrophobe conventionnelle.

## Séparation sélective de peptides et d'acides aminés par des membranes cationiques de nanofiltration à base de poly(étherimide)

Sana GASSARA<sup>1,2</sup>, Raja Ben Amar<sup>2</sup>, André Deratani<sup>1</sup>

*1 : Institut Européen des Membranes, Université Montpellier 2, cc 47, 2 Place E. Bataillon, 34095 Montpellier cedex 5, France.*

*2 : Faculté des Sciences de Sfax, Laboratoire des Sciences des Matériaux et Environnement, route de Soukra km 4-3018 Sfax, Tunisia.*

Les peptides cationiques présentent un large spectre d'activité antibactérienne et antifongique, voire antivirale. Ils sont caractérisés généralement par une longueur de 12 à 50 acides aminés et une charge nette positive en raison d'un excès de base des résidus lysine et arginine sur leurs chaînes. En plus, les acides aminés positifs sont très utilisés comme matières premières et ingrédients actifs dans l'industrie pharmaceutique, alimentaire, chimique et biotechnologiques. Les hydrolysats protéiques issus des réactions enzymatiques sont très riches en fractions peptidiques et acides aminés cationiques. Vu la petite taille et la l'état de charge de ces solutés, la nanofiltration (NF) et l'ultrafiltration (UF) basse sont des procédés bien adaptés pour leur séparation à partir d'un hydrolysats et leur purification.

Le but de ce travail est d'évaluer l'applicabilité de nouvelles membranes de nanofiltration chargées positivement pour l'extraction sélective des peptides et des acides aminés. Ces membranes sont obtenues par une modification chimique de membranes d'ultrafiltration en poly(étherimide) par le poly(éthylèneimine). La rétention de peptides et d'une série d'acides aminés a été déterminée à partir de solutions modèles en fonction de la pression appliquée, du pH et de la concentration de la solution d'alimentation. En bon accord avec l'effet Donnan, la rétention des solutés dépend de la concentration et de la charge ionique. Les solutés chargés positivement comme L-arginine et L-lysine sont retenus sélectivement comme attendus. La rétention minimale a été observée au point isoélectrique de la couche active (pH 9.4).

## **Stacking of ultrafiltration membranes with different molecular weight cut-offs on the production of glucose captation bioactive flaxseed peptide fractions by electro dialysis with ultrafiltration membranes**

**Laurent BAZINET** - *Université Laval*

A flaxseed protein hydrolysate (FPH) was fractionated by electro dialysis with ultrafiltration membranes (EDUF) for the recovery of specific peptides. The cell configuration was composed of ion-exchange membranes and two ultrafiltration membranes with different molecular weight cut-offs (20 and 50 kDa).

This configuration allowed the recovery of two specific cationic peptide fractions (KCl-F1 and KCl-F2). After 360 min of treatment, EDUF allowed concentration of the 300-400 and 400-500 Da molecular weight range peptides in the KCl-F1 and KCl-F2 fractions compared to the initial FPH. Amino acid analysis showed that His, Lys and Arg were especially concentrated in the KCl-F1 and KCl-F2 compartments.

Finally, glucose-transport assay demonstrated that the KCl-F2 fraction increased glucose uptake in L6 cells. Consequently, the stacking of ultrafiltration membranes with two different molecular weight cut-offs in an electro dialysis cell allowed the recovery and the concentration of more specific peptide fractions and, amongst peptide fractions recovered, specific peptide sequence(s) increased glucose uptake in L6 cell.

## Anti-diabetic soy peptides fractions recovered by membrane processes: comparison of UF and EDUF.

Cyril ROBLET<sup>1,2</sup>, Jean AMIOT<sup>1,2</sup>, Geneviève PILON<sup>2,3</sup>, Charles LAVIGNE<sup>2,3</sup>, André MARETTE<sup>2,3</sup>, Laurent BAZINET<sup>1,2\*</sup>

1 : Department of Food Sciences and Nutrition, Université Laval, Quebec, (QC), Canada

2 : Institute of Nutraceuticals and Functional Foods (INAF) Université Laval, Quebec, (QC), Canada

3 : Centre de recherche sur les maladies lipidiques, Centre Hospitalier de l'Université Laval, Quebec, (QC), Canada

\*Corresponding author: laurent.bazinet@fsaa.ulaval.ca

Many soybean compounds have been identified for their health benefits and since a few decades, research interests were focused on soy peptides. However, few fractions have already been identified for their metabolic activities. In this context, two kinds of separation technologies (pressure-driven, ultrafiltration (UF); electrically-driven, electrodialysis with ultrafiltration membranes (EDUF)) were compared for their potential to separate bioactive soy peptides. Moreover, two conditions were studied for each technology: for UF technology, two membrane configurations were studied (a 10 kDa spiral wound membrane (SW) and a 10 kDa hollow fiber membrane (HF)), while two electric strength/UF membrane cut-off ratios were investigated in EDUF (5 V/10 kDa vs 50 V/100 kDa). After separations, fractions were tested in vitro for their glucose up-take activities, using L6 muscular cells.

In spite of composition differences revealed by LCMS analysis, no effect was reported neither for HF configuration nor for EDUF at 5 V/10 kDa. However, significantly increased glucose uptakes were measured in cells treated with SW fractions (at 1 mg/ml) and EDUF 50 V/100 kDa fractions (at 1 µg/ml), with a dose/effect correlation, indicating a potential anti-diabetic effect. Moreover, it was demonstrated by western blot experiments that the AMPk pathway, one of the major non-insulino dependent glucose uptake pathway, was activated by the 50 V/100 kDa EDUF fractions. Hence, it appeared that EDUF treatment used at 50 V/100 kDa would be a convenient mean for isolating and concentrating in vitro anti-diabetic peptides from soy hydrolysate, more efficiently than UF technology.

## Cryptides marins et syndrome métabolique : quels modes d'action ?

**Yesmine BEN HENDA** et S. Bordenave-Juchereau

*Laboratoire LIENSs, UMR CNRS 7266, Approches Moléculaires Environnement Santé*

*Site Marie Curie, UFR Sciences Technologies Santé*

*Université de La Rochelle F-17042.*

L'intérêt des consommateurs pour la relation entre alimentation et santé s'est accru ces dernières années. Ils sont désormais conscients qu'un mode de vie sain combiné à la consommation d'aliments fonctionnels contribue à une bonne santé et au bien être.

Les ressources marines bénéficient d'une bonne image auprès du public. Leur exploitation raisonnée intégrant la valorisation des coproduits, devient indispensable. D'autant plus que ceux-ci constituent un réservoir considérable de substances actives, en particulier, de peptides bioactifs. Ces cryptides (peptides initialement dissimulés au cœur des protéines) sont libérés à partir de protéines marines lors de la digestion ou lors de procédés protéolytiques industriels. Ils modulent le métabolisme de l'être humain, peuvent prévenir et pourraient traiter certaines maladies comme l'hypertension, l'obésité, le diabète, le cancer, les maladies cardiovasculaires, inflammatoires et immunitaires.

La valorisation des fractions protéiques marines est donc d'un intérêt industriel considérable. Intégrés dans la formulation de produits, ils confèrent image et fonctionnalité.

Dans ce contexte, nous nous intéressons aux cryptides marins capables de cibler des pathologies du syndrome métabolique : hypertension, diabète et obésité. Nous caractérisons les modes d'action de di et tri peptides synthétiques précédemment identifiés comme inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine sur d'autres enzymes impliquées dans la génération d'angiotensine II : Cathepsines D et G... Leur potentiel antidiabétique est mesuré via l'inhibition des alpha-amylases et alpha-glucosidases intervenant dans l'augmentation de la glycémie post prandiale.

Une étude des voies de modulation de la différenciation adipocytaire, première étape menant à l'obésité, exercée par ces cryptides est menée en parallèle. Leur potentiel cytotoxique et antiprolifératif a été évalué in vitro sur adipocytes humains immortalisés, tout comme leur influence sur la teneur des adipocytes en lipides totaux. La modulation de l'expression de marqueurs enzymatiques et génétiques de différenciation adipocytaire par les cryptides marins est étudiée. Les marqueurs protéiques sont la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPDH), la phosphatase alcaline et la lipoprotéine lipase (LPL). Les expressions des gènes spécifiques sont visualisées après extraction de l'ARNm total des cellules, suivit d'une RT-Q-PCR. Les résultats obtenus seront détaillés et commentés dans le poster.

## Activites d'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 1 d'hydrolysats de peaux de poisson.

Anis Labidi, Yesmine Ben Henda, Ingrid Fruitier et **Stéphanie BORDENAVE-JUCHEREAU**

*Laboratoire LIENSs, UMR CNRS 7266, Approches Moléculaires Environnement Santé*

*Site Marie Curie, UFR Sciences Technologies Santé*

*Université de La Rochelle F-17042.*

L'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 1 (ECA) constitue une voie de réduction de l'hypertension artérielle. Des peptides ont été identifiés comme inhibiteurs de cette enzyme et représentent une alternative intéressante aux inhibiteurs chimiques tels que le Captopril et l'Enalapril aux effets secondaires parfois marqués. Les coproduits de diverses industries (laitières, viande, produits de la mer...) sont une source non négligeable de protéines peu valorisées. L'hydrolyse enzymatique de ces protéines génère des produits aux propriétés fonctionnelles pouvant concerner le secteur de la santé et notamment des peptides inhibant l'ECA.

Dans le cadre du projet BIOTECMAR, nous avons hydrolysé de la peau de poissons plats par du Protamex® après solubilisation dans de l'acide acétique 0,1M en contrôlant ou non le pH de la réaction. Les peptides générés ont été caractérisés en termes d'inhibition de l'ECA au moyen de deux substrats différents.

Nos résultats montrent qu'une simple solubilisation des peaux dans l'acide acétique 0,1M suffit à libérer des molécules inhibant l'ECA mais qu'une hydrolyse est nécessaire pour augmenter cette activité. Les concentrations inhibant 50% de l'activité de l'enzyme varient de 1,32µg/ml à 350µg/ml en fonction du substrat utilisé et en fonction du temps d'hydrolyse.

Une comparaison commentée de ces valeurs sera présentée dans le poster et discutée à la lumière des derniers résultats en cours d'obtention.

Ces travaux ont été réalisés et financés dans le cadre du programme BIOTECMAR, contrat n° 2008-1/032 avec le soutien de l'Union Européenne et du programme « ERDF - Atlantic Area ».

## Effect of *in vitro* simulated digestion on peptidic profiles and CGRP-like activity of fish protein hydrolysates (FPH)

**Benoit CUDENNEC**<sup>1</sup>, Oscar MARTINEZ<sup>2</sup>, Thibault CARADEC<sup>1</sup>, Pascal DHULSTER<sup>1</sup> and Rozenn RAVALLEC<sup>1</sup>

*1 : ProBioGEM, IUT A, Polytech'Lille, Villeneuve d'Ascq, France.*

*2 : Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN, CSIC), Madrid, Spain.*

The new European rules which prohibit all the rejections at sea will oblige the fishermen to store on the boat by-products and non-commercial species of fish. The enzymatic hydrolysis is for a long time a well-known upgrading way for the production of biologically active peptides. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) is a neuropeptide possessing a wide variety of physiological effects. One of the most important functions of CGRP is to regulate blood flow to various organs by its potent local vasodilatory actions. Last years, several studies have showed that fish by-products hydrolysates (FPH) could be a suitable source of CGRP-like molecules and have important applications in functional foods. However, their biological effects would be limited by the action of gastro-intestinal proteases. The aim of this study was to determine the effect of an *in vitro* simulated digestion on molecular weight profiles and CGRP-like peptides content of FPH.

FPH was produced by French SME from cooked heads of siki (*Centroscyrnus coelolepis*). A two stage digestion simulating human gastric and intestinal phases was carried out. The chromatographic profiles (SEC-FPLC), the peptide concentration, and the immunoreactive CGRP-like molecules content of FPH, determined by radio-immunoassay (RIA), were followed during the gastro-intestinal digestive process.

Results showed that the digestive process did not highly affect the peptidic population and the biological activity of the FPH. According to this conclusion, the production and the commercial use of biological active peptides generated by the hydrolysis of by-products protein could be considered of great interest in the development of functional foods.

Supported by a grant from the PSDR Grand Ouest and by the European Community: Atlantic Area Programme BIOTECMAR n° 2008-1/032.

## **Activités antioxydante et inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I d'un lait de chamelle fermenté par une souche protéolytique de *Streptococcus thermophilus***

**Jean-Michel GIRARDET** - UR AFPA, équipe Protéolyse et Biofonctionnalités des Protéines et des Peptides

Le dromadaire (*Camelus dromedarius*) revêt une importance socio-économique essentielle dans de nombreuses régions arides et semi-arides du monde et le lait camelin est un composant important pour l'alimentation humaine dans ces régions. Il est, par exemple, plus riche que le lait bovin en vitamine C et en acides gras insaturés et, comme le lait humain, il ne contient pas de beta-lactoglobuline, protéine majeure du lait bovin connue pour son pouvoir allergisant important. Ce lait peut être consommé cru ou plus généralement fermenté (le kéfir). Lors de la fermentation, les protéines sont hydrolysées et libèrent des séquences peptidiques qui pourraient présenter des activités biologiques bénéfiques en terme de prévention pour la santé. La souche LMD-9 de *Streptococcus thermophilus*, la bactérie lactique la plus employée en industrie agro-alimentaire après *Lactococcus lactis*, possède une protéase de surface PrtS capable d'hydrolyser les caséines alphas1, alphas2 et beta du lait bovin et de libérer des peptides dont certains ont été identifiés comme possédant des activités antioxydante, antihypertensive, immunomodulante, antibactérienne et mitogénique. Nous avons utilisé cette souche afin de fermenter du lait de chamelle et d'isoler un hydrolysats peptidique généré par PrtS. Cet hydrolysats a été fractionné par ultrafiltration à un seuil de coupure de 10 kDa puis de 3 kDa et les fractions peptidiques obtenues ont été caractérisées par spectrométrie de masse. Deux activités biologiques ont été recherchées au sein de ces fractions : (i) l'activité antioxydante, qui a été testée en déterminant le pouvoir séquestrant du cation radicalaire de l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) ou ABTS et (ii) l'activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) qui a été testée en déterminant l'hydrolyse du substrat synthétique hippuryl-histidyl-leucine par chromatographie liquide à haute performance. Ce travail rapporte l'effet antiradicalaire ou inhibiteur de l'ECA des peptides générés dans le lait de chamelle fermenté par la souche LMD-9 et discute de l'efficacité de ces peptides en fonction de la distribution de leur taille moléculaire. La production d'un lait camelin fermenté présentant un bénéfice pour la santé est un enjeu important pour les populations des régions désertiques.

## Inhibition de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine I par des peptides issus de protéines du lait bovin : Etude des interactions moléculaires par la technologie Biacore

**Céline CAKIR-KIEFER** - *Unité de Recherche « Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux », Equipe « Protéolyse et Biofon*

L'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine I (ECA ; EC 3.4.15.1) appartient au système rénine-angiotensine qui joue un rôle clé dans le maintien de la pression artérielle. En effet, l'ECA, une métalloprotéase à zinc à activité peptidyl dipeptidase qui possède deux sites actifs fonctionnels, catalyse la conversion de l'angiotensine I, un décapeptide inactif, en angiotensine II, un puissant vasoconstricteur. De plus, l'ECA catalyse la dégradation de la bradykinine, un vasodilatateur, en un peptide inactif. L'inhibition de cette enzyme est une des voies utilisées pour le traitement médical de l'hypertension artérielle malgré les nombreux effets secondaires décrits.

Les peptides antihypertenseurs issus de protéines alimentaires constituent un bon moyen de prévention puisqu'ils peuvent permettre de retarder l'apparition de l'hypertension artérielle, voire de réduire une hypertension artérielle modérée sans présenter aucun effet secondaire. Les nombreux peptides inhibiteurs de l'ECA issus de protéines alimentaires décrits dans la littérature présentent une très grande hétérogénéité de taille et de séquence, ce qui rend leur mode d'action difficile à comprendre.

Aucune relation structure-activité n'étant clairement établie, l'objectif de ce travail est de déterminer le type d'interaction de peptides inhibiteurs issus de protéines de lait bovin avec l'ECA et de mieux comprendre leur affinité pour l'enzyme en fonction de leur séquence. Ces peptides peuvent se fixer soit au niveau d'au moins un des sites actifs de l'ECA soit en dehors du site actif.

Pour cette étude, une approche expérimentale par résonance plasmonique de surface a été entreprise en utilisant la technologie Biacore. Un travail précédent effectué au laboratoire a permis d'isoler, à partir d'un hydrolysat trypsique de caséine alphas2 bovine, les peptides FALPQYLK et FALPQY dont les IC50 sont de 4,3  $\mu$ M (Tauzin et al., 2002). L'ECA recombinante humaine purifiée à homogénéité a été fixée sur une puce carboxyméthyl dextran (CM5).

L'accessibilité des sites actifs de l'enzyme a été vérifiée en utilisant le tripeptide VPP, le peptide inhibiteur sélectif pEGLPPRPKIPP (pE : pyroglutamyl) d'un des deux sites ainsi que le captopril. Les peptides sélectionnés ont ensuite été injectés et les constantes de vitesses d'association et de dissociation, ainsi que la stœchiométrie des interactions ont été mesurées.

L'étude a donc porté sur l'interaction de l'ECA avec les peptides FALPQYLK, FALPQY ainsi que leurs dérivés FALP, LPQY, LP et FALA qui nous ont permis d'étudier l'importance des extrémités C- et N-terminales, l'importance de la taille du peptide et de la présence d'un résidu prolyl au niveau de la séquence peptidique.

## Hydrolyse pepsique de la caséine bovine : Obtention de peptides à activité antimicrobienne

Faiza ADOUI<sup>b</sup>, Chataigne G.<sup>a</sup>, Chihib N.<sup>a</sup>, Dhulster P.<sup>a</sup>, Zidoune M.N.<sup>b</sup>, Nedjar-Arroume N.<sup>a</sup>

*a : Laboratoire ProBioGEM, Université Lille Nord de France, Polytech'Lille, Av. Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq, France*

*b : Laboratoire de Nutrition et de Technologie Alimentaire (LNTA). Equipe : Transformation et Elaboration des Produits alimentaires (TEPA). Institut de la Nutrition de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (I.N.A.TA.A.), 25000 Constantine. Algérie*

Mots-clés : caséine bovine, hydrolyse pepsique, peptides antimicrobiens.

Après plusieurs décennies d'emploi de molécules de synthèse divers problèmes de santé publiques se sont posés et ont incité les chercheurs à s'orienter vers l'étude des molécules d'origine naturelle. C'est ainsi que l'intérêt s'est porté sur les protéines alimentaires comme source de molécules bioactives. Parmi ces dernières figurent les peptides antimicrobiens qui vue leur action peuvent être utilisés dans différents domaines tels que l'industrie alimentaire, pharmaceutique, cosmétiques et autres. Pour l'obtention de ces molécules actives plusieurs protéines ont fait l'objet d'étude. Cependant se sont principalement l'hémoglobine, les protéines de l'œuf [3] et les protéines du lait qui ont suscités plus d'intérêt. Toutefois, ces études consistaient, principalement, à l'obtention, la purification et l'identification des peptides actifs. En effet, très peu d'études ont traités leur application.

Ainsi et dans le but de préparer des peptides antimicrobiens pour leur étude dans la conservation des aliments, nous avons étudié l'obtention de peptides actifs par hydrolyse pepsique de la caséine bovine. Plusieurs peptides actifs ont ainsi été séparés de l'hydrolysate pepsique très hétérogène par RP-HPLC et analysés en LC-MS et en MALDI-TOF. Les peptides obtenus sont issus principalement de la région C-terminale de la caséine  $\alpha_2$ . Toutefois des peptides issus de l'hydrolyse de la caséine  $\alpha_1$  ont également été identifiés. Les fractions collectées, renfermant ces peptides, ont montré une activité antimicrobienne contre quatre souches bactériennes comprenant les bactéries à Gram positif et à Gram négatif : E. coli, L. innocua, B. Subtilis et S. aureus.

## Effet du serocolostrum, du lait et du lactoserum camelins et de leurs hydrolysats pepsiques sur la croissance de *Listeria innocua*

Zeineb JRAD<sup>1</sup>, Isabelle ADT<sup>2</sup>, Halima EL-HATMI<sup>1</sup>, Samira ARROUM<sup>1</sup>, Pascal DEGRAEVE<sup>2</sup>, Coralie DUPAS-FARRUGIA<sup>2</sup>, Touhami KHORCHANI<sup>1</sup>, Nadia OULAHAL<sup>2</sup>

1 : *Laboratoire d'Élevage et de Faune Sauvage, Institut des Régions Arides, Médenine, Tunisie*

2 : *Laboratoire de Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires (BioDyMIA), Equipe Mixte d'Accueil Université Lyon 1-ISARA Lyon n°3733, Bourg en Bresse, France*

Le lait et le colostrum camelins diffèrent de leurs équivalents bovins notamment par leurs compositions en protéines sériques. Par exemple, la teneur en lactoferrine, protéine connue pour ses propriétés antimicrobiennes, est 30 à 100 fois plus importante chez les camélidés que chez les bovidés.

L'étude de l'effet antimicrobien de colostrum, lait et lactosérum camelins lyophilisés puis dissous dans du bouillon cœur cervelle à des concentrations entre 10 et 40 g/L vis-à-vis de différentes bactéries pathogènes ou apparentées – *Listeria innocua* –, a montré que le colostrum possède le potentiel antimicrobien le plus important. Ainsi, le suivi de culture semi-automatique par spectrophotométrie à 600 nm (sur 24 h) a permis d'observer une inhibition dose-dépendante de la croissance de *L. innocua* LRGIA 01 par le lait, le sérocolostrum et le lactosérum camelins. A 40 g/L, le sérocolostrum a provoqué une inhibition plus importante (50%) de la croissance de *L. innocua* LRGIA01 que le lactosérum (20 %) et surtout le lait (12%). Du fait de sa richesse en lactoferrine et du fort potentiel antimicrobien de cette protéine, une purification de cette dernière à partir du colostrum camelin a été entreprise afin de déterminer son potentiel anti *L. innocua* LRGIA01. Les premiers essais ont permis de montrer que la lactoferrine cameline purifiée est capable d'inhiber la croissance de cette bactérie à la concentration de 5 g/L. Des résultats similaires ont été obtenus avec de la lactoferrine bovine.

Des hydrolyses des lactoferrines cameline et bovine par de la pepsine (hydrolyses réalisées in vitro à 37°C et pH 2, rapport E/S : 3/100 (m/m), pendant 4h), ont ensuite été effectuées et l'activité anti-*Listeria innocua* des hydrolysats testée. Les deux hydrolysats obtenus présentent une activité anti-*Listeria innocua* à une concentration de 1 g/L soit à une concentration 5 fois plus faible que celle de leurs protéines natives respectives. Il a été montré que l'hydrolyse pepsique de la lactoferrine bovine génère notamment de la lactoferricine, un peptide cationique antimicrobien issu de l'extrémité N-terminale de la lactoferrine dont l'activité est supérieure à celle de la protéine dont il est issu. Une comparaison des extrémités N-terminales des lactoferrines bovine et cameline montre une certaine variabilité. A ce jour, les fragments peptidiques de la lactoferrine cameline responsables de l'activité anti-*Listeria innocua* des hydrolysats pepsiques restent à identifier afin de déterminer si leur activité peut être attribuée à une lactoferricine ou un autre peptide. Cela constitue le premier objectif des travaux en cours.

## Le peptidome exocellulaire de *Lactococcus lactis* révèle une protéolyse de surface importante et suggère l'existence de phénomènes de communication cellulaire.

Alain Guillot<sup>1</sup>, Mylène Boulay<sup>2</sup>, Christophe Gitton<sup>2</sup>, Véronique Monnet<sup>1,2</sup> & Vincent Juillard<sup>2</sup>

(1) PAPPSO et (2) Peptides et Communication Bactérienne, UMR 1319 MICALIS, INRA, 78352 Jouy-en-Josas cedex.

La communication entre bactéries au sein d'une population est un phénomène général, mais encore largement méconnu. Chez les bactéries à Gram-positif, elle est le fait de peptides de communication produits par la bactérie. Ces séquences peptidiques ont deux origines : soit elles sont présentes au sein d'une séquence protéique bactérienne, soit elles sont le fruit de la transcription de courtes séquences codantes. Les peptides de communication doivent s'accumuler dans le milieu exocellulaire, sous forme mature et au-delà d'une concentration seuil, pour pouvoir être perçus par les bactéries environnantes et déclencher une réponse adaptative. Les peptides de communication connus aujourd'hui ont pour la plupart été identifiés par une approche spécifique, développée dans le cadre de l'étude de la réponse qu'ils conditionnent.

L'objectif de ce travail est d'identifier de façon la plus exhaustive possible le peptidome de *Lactococcus lactis*, c'est-à-dire l'ensemble des peptides s'accumulant dans le milieu de culture. Une attention particulière est portée aux peptides issus de l'hydrolyse de séquences spécifiant l'exportation d'une protéine comme aux peptides issus de la traduction de petits gènes, sources potentielle de peptides de communication.

Une première étape a consisté à ré-analyser la séquence du génome de la souche *L. lactis* IL1403 à l'aide du logiciel SHOW (<http://migale.jouy.inra.fr>), afin de prédire les séquences codantes de petite taille (180 bp ou moins), dont le nombre est largement sous-estimé dans les banques publiques. 385 séquences codant des peptides putatifs comprenant de 10 à 60 acides aminés (inclus) ont ainsi été prédites, soit 5 fois plus que ce qui l'était jusqu'à présent.

Pour caractériser le peptidome exocellulaire de *L. lactis* IL1403, une méthodologie spécifique a été développée : culture dans un milieu chimiquement défini initialement dépourvu de peptides jusqu'en fin de phase exponentielle de croissance ; isolement des peptides, enrichissement et double séparation chromatographique avec identification par spectrométrie de masse. De l'ordre de 2000 séquences peptidiques distinctes ont été identifiées, correspondant à environ 350 protéines différentes. Ces peptides proviennent pour l'essentiel (60%) de protéines de surface, ce qui révèle une activité protéolytique de surface intense. La construction de mutants d'enzyme protéolytiques est en cours pour en identifier les acteurs.

Parmi ces peptides figurent des fragments de séquences spécifiant l'exportation de 4 lipoprotéines (OptA, YvdF, YjgC et PmpA) et de 5 protéines secrétées (Usp45, YrbB, pi301, PspB et PotD). De l'ordre d'une dizaine de peptides issus de la traduction de petites séquences codantes ont également été identifiés, dont plus de la moitié ne figurent pas dans les banques de données. Certaines de ces séquences codantes sont localisées à proximité immédiate d'un régulateur transcriptionnel. Cela pourrait suggérer une implication de ces petits peptides dans des mécanismes de communication cellulaire, hypothèse qui est actuellement à l'étude.

## **L'hydrolyse enzymatique du lactosérum bovin sous micro-ondes diminue l'allergénicité de la BLG chez le modèle animal d'allergie.**

**Kamel-Eddine EL MECHERFI - UNIVERSITE D'ORAN ALGERIE**

Les allergies représentent un véritable problème de santé publique. Le traitement de cette affection repose sur un régime d'éviction des protéines du lait de vache et l'administration de préparations adaptées et représentées par des hydrolysats de protéines lactées ou autres (riz, collagène). Cependant, aucun de ces hydrolysats n'évite la présence de protéines intactes et une activité antigénique résiduelle persiste toujours.

Le but de ce travail est d'évaluer l'impact d'un traitement technologique par les micro-ondes combiné à une hydrolyse enzymatique par les enzymes digestives (trypsine/chymotrypsine et la pepsine) de la b-lactoglobuline (BLG) et a-lactalbumine (ALA) bovines, sur leur allergénicité chez la souris BALB/c par exploration de leur immunoréactivité contre les IgE humaines d'enfants allergiques aux PLV.

Les différents effets des micro-ondes sur l'hydrolyse enzymatique tryptique et chymotryptique des deux allergènes majeurs du lait, et sur leur immunoréactivité contre les IgE anti-BLG et anti-ALA, ainsi que l'existence d'une éventuelle anaphylaxie locale après stimulation des fragments intestinaux de la souris BALB/c montés en chambre de Ussing avec les différents hydrolysats produits sous micro ondes ont été étudiés.

Les résultats obtenus montrent que les micro-ondes accélèrent les réactions enzymatiques des deux protéines de lactosérums bovins en obtenant des taux d'hydrolyse des protéines plus élevés par rapport à ceux obtenus sous chauffage conventionnel. La b-lactoglobuline généralement résistante à l'hydrolyse pepsique a été hydrolysée au bout de 3 minutes sous micro-ondes à 200W Watts à hauteur de 42%, alors qu'elle est restée très résistante à cette même hydrolyse dans les conditions de chauffage conventionnel.

Les résultats de l'immunoréactivité des hydrolysats du lactosérum contre les IgE humaines évaluée par test-ELISA compétitif ont montrés que les hydrolysats de lactosérum obtenus sous micro-ondes à 200 Watts avec de la pepsine présentaient une très faible reconnaissance par les IgE anti-BLG et anti-ALA comparés à ceux de l'hydrolyse conventionnelle. En chambre de Ussing, la stimulation avec les hydrolysats de BLG obtenus sous micro-ondes ne produisait pas d'augmentation du courant de court circuit (Isc) comparés aux hydrolysats obtenus dans les conditions conventionnelles. Par contre, les hydrolysats de l'a-la produits sous micro ondes ou dans les conditions conventionnelles stimulent significativement ( $p < 0,001$ ) l'Isc qui traduit une présence d'anaphylaxie locale.

Les résultats obtenus sur l'hydrolyse enzymatiques menée sous micro-ondes sont très encourageants et intéressants rendant compte sur la possibilité d'utilisation des micro-ondes comme traitement physique pour déstabiliser les protéines alimentaires les plus résistantes à la digestion enzymatique et sa capacité à diminuer leur allergénicité

# Partenaires



**Ingredia Group** est une société appartenant à la Coopérative *La Prospérité Fermière* qui regroupe 1200 producteurs de lait dans le Nord - Pas de Calais.

Basée à Arras, mais fortement internationalisée (sites de production, partenariats, bureaux commerciaux), Ingredia génère un CA d'environ 400 M€ en transformant plus de ½ milliard de litres de lait annuellement.

Elle est organisée en trois business units (commodités laitières, ingrédients et mixes fonctionnels pour l'alimentaire, ingrédients et bioactifs nutritionnels et de santé).

Ses compétences d'excellence sont le séchage, le mélange et les séparations membranaires.

Son effectif est de 400 personnes dont 15% se consacrent à l'innovation.

Ingredia exporte dans 120 pays.



# ROQUETTE

*Offering the best of nature™*

**Roquette**, groupe familial français de dimension internationale, a pour activité la transformation de matières premières végétales : maïs, blé, pomme de terre, pois et micro algues.

Figurant parmi les 5 leaders mondiaux de l'industrie amidonnière, il offre à ses clients une large gamme de produits et solutions dans les domaines de la nutrition humaine, de la pharmacie-cosmétologie, du papier-carton ondulé, de la chimie-bioindustrie, et de la nutrition animale.

Présent dans plus de 100 pays, Roquette réalise un chiffre d'affaires de plus de 3 milliards d'euros. Le Groupe compte plus de 7 800 personnes.

Son développement axé sur la chimie du végétal et la nutrition santé, est fondé sur une stratégie privilégiant le long terme, l'innovation et la volonté d'entreprendre.

Sa mission : "servir les femmes et les hommes en offrant le meilleur de la nature".

***Roquette**, a French family group with an international dimension, processes renewable raw materials: maize, wheat, potatoes, peas and micro-algae.*

*Among the 5 global leaders in the starch manufacturing industry, it offers its customers a wide range of products and solutions in the fields of human nutrition, pharmacy-cosmetology, paper-board, chemistry-bioindustry and animal nutrition.*

*Present in over 100 countries, Roquette has a turnover of over 3 billion euros. The group employs more than 7 800 staff.*

*Its development, focused on nutrition and health and plant-based chemistry, is based on a strategy giving preference to the long-term, innovation and the commitment to achieve.*

*Its mission: « Serve men and women by offering the best of nature ».*

