
Les tests *in vitro*, alternative aux tests *in vivo* dans la recherche d'activités biologiques dans les produits industriels

Application à deux activités : l'activité satiante et l'activité opioïde

Lucie CATIAU, Rozenn RAVALLEC, Naima ARROUME, Didier GUILLOCHON

** IUTA – Université Lille 1*

Laboratoire ProBioGEM, Polytech'Lille

Boulevard Langevin-BP 179 59653 621 Villeneuve d'Ascq Cedex

lucie.catiou@polytech-lille.net ; rozenn.ravallec-ple@univ-lille1.fr ; naima.arroume@univ-lille1.fr ; didier.guillochon@univ-lille1.fr

Sections de rattachement : 64

Secteur : Secondaire

RÉSUMÉ.

Les scientifiques ont établi, au cours de la dernière décennie, que de nombreux peptides et protéines alimentaires (d'origine animale ou végétale) possédaient des activités biologiques spécifiques, en plus de leur valeur exclusivement nutritionnelle.

*La mise en évidence de molécules actives dans les matières premières alimentaires est une voie nouvelle de valorisation pour les entreprises et représente des potentialités dans l'alimentation fonctionnelle. Le développement de tests *in vitro* permet de déterminer et de discriminer de manière rapide l'action d'une molécule pour une activité déterminée, et dans un système délimité.*

*Dans le contexte socio-économique actuel, deux activités potentielles ont été privilégiées et leur dosage *in vitro* ont fait l'objet d'une étude. Ces dosages visent pour le premier à mettre en évidence une activité sur le contrôle de la prise alimentaire que l'on appellera « satiante » et pour le second, une activité que l'on appellera « anti-stress » mise en évidence par la voie des peptides opioïdes.*

*MOTS-CLÉS : activité biologique, test *in vitro*, satiété, anti-stress.*

1. Introduction

Les récentes avancées scientifiques ont démontré la multiplicité des activités biologiques trouvées dans les protéines et peptides alimentaires, ce rôle s'additionnant à celui de valeur nutritionnelle (Korhonen et al, 2003 ; Ferrari et al, 2003 ; Zaloga et al, 2004). Certains de ces peptides sont obtenus par l'hydrolyse des protéines, utilisant des procédés chimiques ou enzymatiques, issues de sources variées de matériel dont le lait, les protéines de soja, et d'autres sources animales ou végétales, et devant conduire à des produits hypoallergéniques (Sampson, 2004). Ces peptides semblent avoir une influence positive sur l'absorption du calcium, la régulation du cholestérol (Nagaoka, 2001). De plus, de nombreux peptides semblent également avoir des propriétés antimicrobiennes (Nedjar-Arroume et al, 2008), et pourraient donc influencer les mécanismes de défense du corps humain, ou pourraient être utilisés comme stabilisateurs contre les microorganismes pour les aliments.

Ils pourraient également donc avoir des applications dans les traitements pour la pression sanguine, les défaillances cardiaques, l'infarctus du myocarde, aussi pour le diabète. Les peptides bioactifs semblent également influencer la réduction du stress par des effets opioïdes.

De nombreuses relations entre les structures et les activités peptidiques ont été développées pour l'évaluation du rôle biologique des peptides. Grand nombre d'effets sont attribués à la séquence spécifique en acides aminés

des peptides isolés. De récents développements en protéomique pourraient aider à la clarification de l'activité et du rôle des biopeptides.

La mise en évidence de l'activité de molécules à activité biologique peut être abordée à différents niveaux de la séquence d'évènements aboutissant à la réponse biologique ; parmi ces évènements : l'interaction du ligand avec ses récepteurs stéréospécifiques sur la cellule-cible, la transduction du signal qui induit une variation du taux d'un ou de plusieurs messagers intracellulaires suivie d'une modification du métabolisme de la cellule-cible, des effets biologiques plus globaux au niveau périphérique.

Le principe fondamental d'un essai biologique réside dans la mise en évidence de la réponse tissulaire ou cellulaire consécutive à l'interaction d'une molécule agoniste avec son récepteur. En comparant l'effet d'un agoniste supposé à celui déjà connu de différentes drogues (ou combinaison de différentes drogues), des déductions peuvent être faites en ce qui concerne les propriétés de la molécule testée.

L'avantage du test biologique *in vitro* réside dans le fait que l'on mesure un effet physiologique résultant ; le récepteur est ainsi mis en jeu dans son état natif et fonctionnel. Cependant, l'un des inconvénients de ce test est que la réponse biologique résulte d'une série complexe d'évènements biochimiques ; il est donc difficile, dans ce cas, d'interpréter la réponse comme étant consécutive à une seule action de la molécule testée, la mesure effectuée n'étant pas une mesure directe de l'interaction ligand-récepteur.

Dans le contexte socio-économique actuel, deux activités potentielles ont été privilégiées et leur dosage *in vitro* ont fait l'objet d'une étude. Ces dosages visent pour le premier à mettre en évidence une activité « satiante » du produit, et pour le second, une activité « anti-stress ».

2. Matériels et méthodes

2.1. Test *in vitro* de mise en évidence d'une activité satiante

Il s'agit d'un test de stimulation de la sécrétion des CCK8 par les cellules adhérentes STC1. Les cholecystokinines (CCK) et les gastrines constituent une famille d'homologues d'hormones peptidiques, qui sont tous deux des ligands physiologiques pour les récepteurs gastrine et CCK-B. Les peptides CCK sont produits dans les cellules entéroendocrines I de l'intestin supérieur et sont principalement localisées sous leur forme octapeptidique au niveau du cortex cérébral (Beinfeld, 1995). La sécrétion de cette hormone est liée à la présence de certaines denrées alimentaires, en particulier de peptides, d'acides aminés et de calcium et est inhibée lorsque le pH de l'estomac devient acide (inférieur à 3).

2.1.1. La lignée cellulaire STC-1

La lignée cellulaire pluri-endocrine STC-1 est dérivée d'une tumeur endocrine développée au niveau de l'intestin grêle d'une souris double transgénique exprimant le promoteur de l'insuline de rat pour le « samian virus 40 large T » et pour le « polyoma virus small T antigen ».

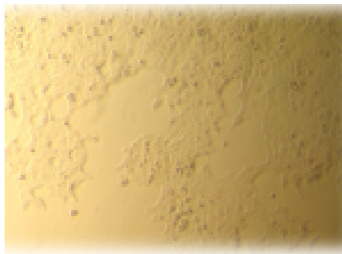


Figure 1. Cellules STC-1 – Observation microscopique (droite) ; Cellules STC-1 – croissance par adhérence sur le fond de la boîte – Milieu DMEM (gauche)

C'est un modèle cellulaire répandu d'étude des phénomènes de libération de CCK dans l'intestin. Les cellules adhérentes sont été en culture dans un milieu liquide sur boîte contenant de l'antibiotique, de l'acide glutamique et du sérum bovin fœtal. Les boîtes sont placées dans un incubateur à 37°C, 5% CO₂.

Les cellules sont ensuite repiquées en microplaques 24 puits afin de permettre la mise en contact des cellules avec le produit, un puits pouvant servir au test d'un produit. Les cellules sont préalablement rincées avec un tampon physiologique, puis mise en contact avec le produit à tester pendant une durée déterminée, durée pendant laquelle, si le produit a une activité satiante, les cellules libèreront les CCK8. Ensuite, le surnageant de chaque puits est récupéré et centrifugé, et servira au dosage des CCK8.



Figure 2. Cellules STC-1 – croissance en microplaques

2.1.2. Dosage des CCK

Le principe du dosage repose sur la compétition entre les molécules marquées à l'iode 125 (CCK8 sulfate ou gastrine) et les molécules contenues dans les standards ou les échantillons à doser vis-à-vis d'un nombre donné et limité de sites anticorps antimolécules. A la fin du dosage, la quantité de molécules marquées liées à l'anticorps est inversement proportionnelle à la quantité de molécules non marquées présentes dans l'essai.

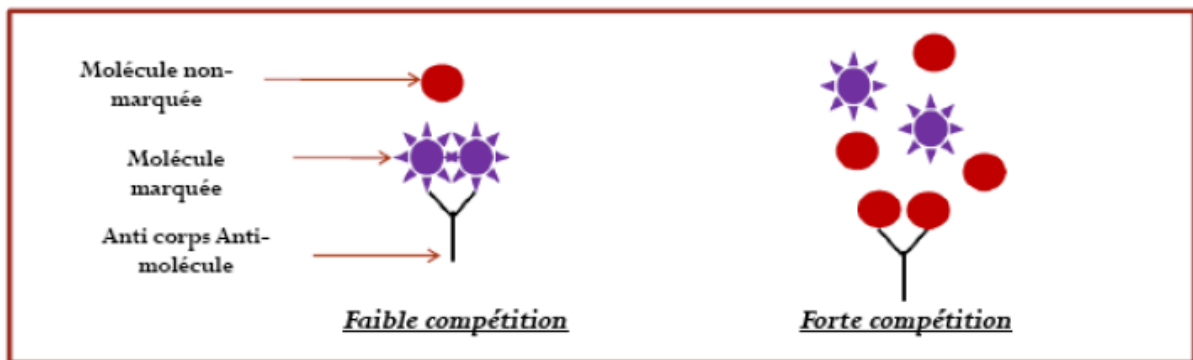


Figure 3. Principe du dosage des CCK

Deux kits de dosage ont été utilisés :

- Le kit EURIA-CCK, pour le dosage spécifiquement des CCK dans les échantillons
- Le kit GASK-PR, pour le dosage non spécifique des gastrines et molécules analogues dans les échantillons.

2.2. *Test in vitro de mise en évidence d'une activité antistress*

Ce test est basé sur la mesure de la fixation spécifique sur les récepteurs opioïdes présents sur les membranes de cerveau de rat. Ces membranes possèdent les différentes classes de récepteurs opioïdes. Le système opioïdier est en effet composé de récepteurs opioïdes (μ pour morphine, δ pour déférent, κ pour ketocyclazocine) et de leurs ligands endogènes : les peptides opioïdes endogènes. Le principe consiste en la reconnaissance du site, sur lequel le ligand vient se lier, et l'effecteur responsable du transfert de l'accrochage en un événement intracellulaire biochimique qui conduira à une réponse biologique telle qu'un effet relaxant, un effet analgésique,...

2.2.1. *Préparation des homogénats de cerveau de rat*

Les rats sont guillotinés, les cerveaux prélevés, broyés et lavés pour en récupérer les membranes. Les protéines sont dosées



Figure 4. A gauche : guillotinage des rats – A droite : cerveau prélevé de rat

2.2.2. *Dosage de l'activité opioïde*

Le principe de ce test est de mettre en compétition vis-à-vis des récepteurs opioïdes présents sur les membranes de cerveau de rat, un ligand tritié avec l'échantillon à tester.

Les membranes sont lavées et ne restent donc sur le filtre que les molécules accrochées aux récepteurs.

Et c'est donc le ligand radioactif accroché aux récepteurs, non occupés par l'échantillon, qui est dosé par radioactivité.

Pour le test, 2 inhibiteurs de peptidases sont ajoutés afin d'éviter toute dégradation, à la fois des membranes, mais également de l'échantillon à tester. Un ligand tritié (ici, la naloxone) est ajouté, et permet de lire, après extraction de la radioactivité par le liquide de scintillation, la radioactivité retenue sur les récepteurs. Ensuite, l'échantillon ou le standard est également ajouté. Les membranes sont ajoutées en dernier parce que ce sont elles qui amorcent la réaction.

Les tubes sont placés au bain marie à 30°C pendant 25 minutes. Le milieu réactionnel est ensuite filtré sur des filtres en microfibre de verre, grâce à une unité de filtration permettant de filtrer 12 incubations en une opération. Les membranes sont lavées avec du tampon physiologique. La radioactivité retenue par le filtre est extraite par le liquide de scintillation. La radioactivité est mesurée par le compteur à scintillation.

3. **Résultats et discussion**

3.1. *Effet satiant*

3.1.1. *Résultats de l'effet satiant de l'albumine d'œuf, dosé par les 2 kits : Gask-Pr et CCK-Euria*

La molécule testée est l'albumine d'œuf, connue dans la littérature pour avoir un effet sur la satiété et plus particulièrement sur la libération des CCK. Il est ici préparé et testé à 3 concentrations : 0,5%, 1% et 2%.

Le témoin négatif est le tampon seul.

Les calculs sont faits par rapport à celui-ci, en effet, le tampon seul est considéré comme ne provoquant aucune sécrétion de CCK par les cellules.

$B/T \times 100$ est donc le taux de sécrétion des CCK dosé par le kit (B étant la sécrétion dosée de notre échantillon).

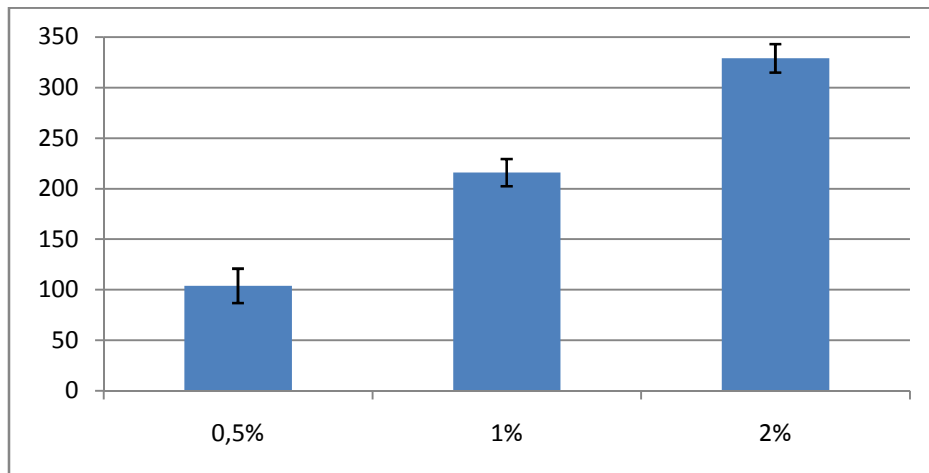


Figure 5. Histogramme présentant les résultats obtenus avec l'albumine d'œuf dans le test CCK avec le kit Gask-Pr

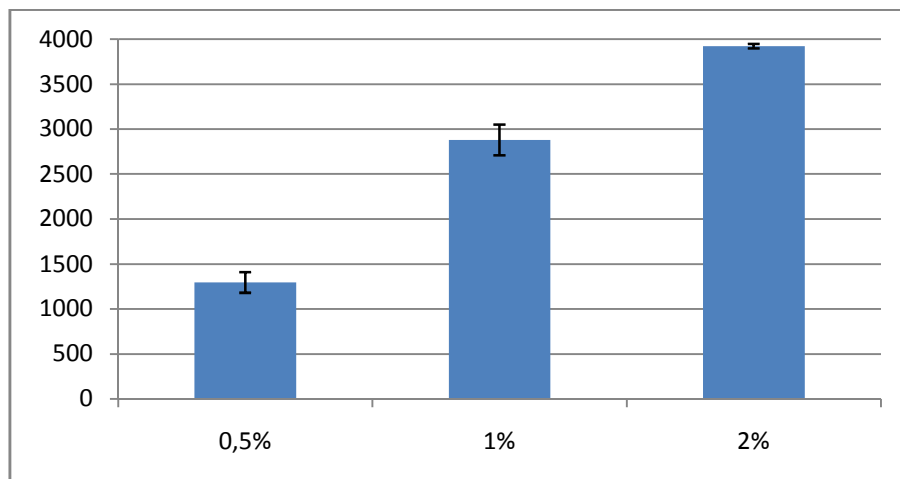


Figure 6. Histogramme présentant les résultats obtenus avec l'albumine d'œuf dans le test CCK avec le kit Euria-CCK

On remarque sur cet histogramme que la réponse de l'albumine d'œuf par rapport au témoin est positive, il y a sécrétion de CCK par les cellules.

La seconde chose que l'on peut noter, c'est l'existence d'un effet dose, en effet, plus la concentration de l'échantillon augmente, et plus la sécrétion des CCK par les cellules augmente également.

Ce test permet donc non seulement de mettre en évidence l'activité biologique de l'échantillon, mais également de le faire proportionnellement à sa concentration.

On remarque également une plus grande sensibilité dans le kit Euria-CCK, kit plus onéreux et plus spécifique.

La corrélation des 2 kits a donc été réalisée pour savoir s'il était scientifiquement possible d'utiliser le kit Gask-Pr pour nos expérimentations, moins onéreux.

3.1.2. Corrélation des 2 kits : Gask-Pr et Euria-CCK

Cette corrélation a été faite en utilisant les standards de chacun des kits, respectivement la gastrine et les CCK8 pour les kits Gask-Pr et Euria-CCK

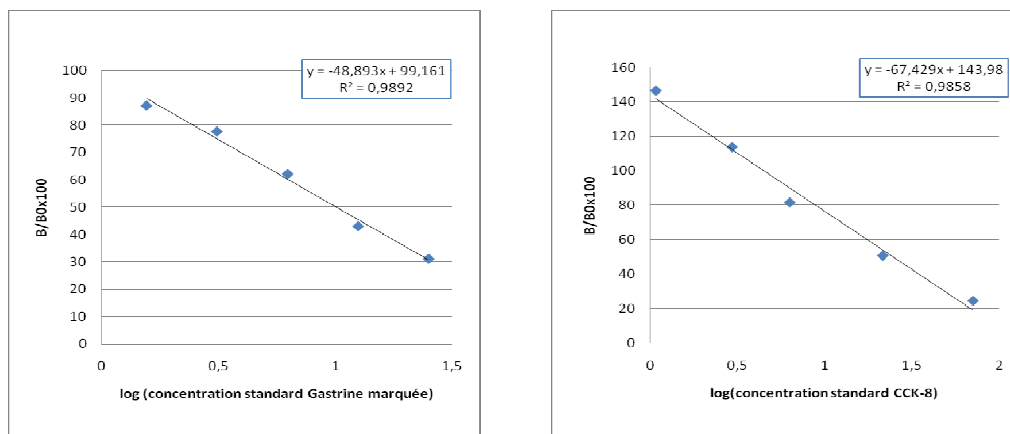


Figure 7. A gauche, gamme étalon (Gastrine marquée) pour le kit Gask-PR ; à droite, gamme étalon (CCK8 marqué) pour le kit Euria CCK

A partir des deux droites étalons de chacun des kits, les B/B0x100 ont été recalculés et tracés l'un en fonction de l'autre :

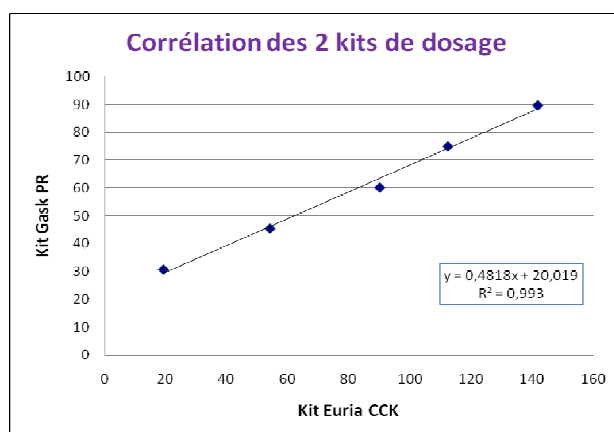


Figure 8. Droite de corrélation des 2 kits

Ceci nous permet d'obtenir à nouveau une droite, indiquant que ces 2 kits sont bel et bien corrélés et qu'il est donc possible d'utiliser scientifiquement l'un ou l'autre des kits pour la réalisation de nos tests. Nous continuons donc avec le kit Gask-PR, moins onéreux.

3.2. Effet antistress

L'échantillon testé ici est la naloxone, opioïde alcaloïde synthétique. Il est préparé à différentes concentrations et mis en contact avec les membranes.

Le dosage radioactif mesurant la radioactivité résiduelle, notre témoin négatif sera l'échantillon ne contenant que l'analogue tritié (soit pas de naloxone – 0nM).

Ensuite, les calculs sont faits par rapport à ce témoin négatif : plus la molécule s'accrochera sur les récepteurs opioïdes, moins l'analogue tritié s'accrochera et donc moins la radioactivité mesurée sera importante. Ce qui est montré ci-après :

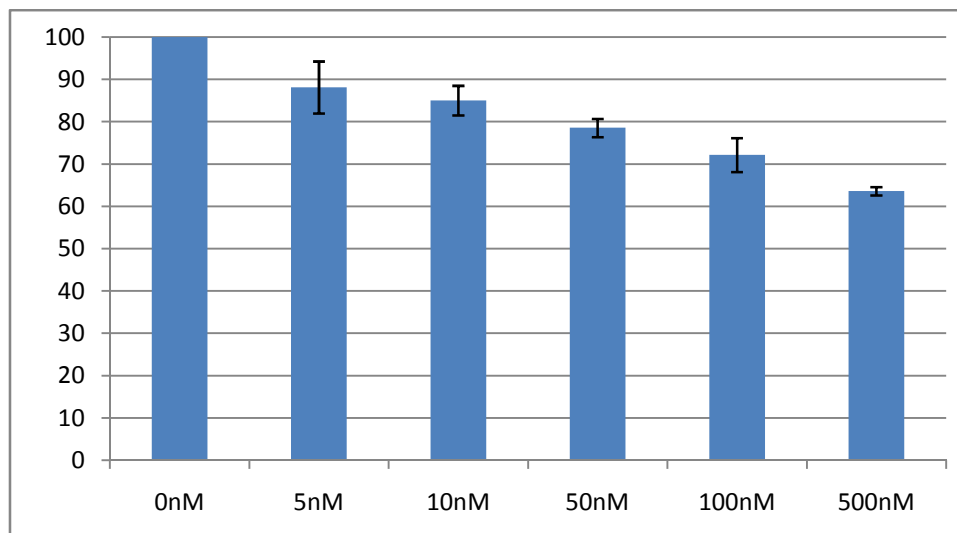


Figure 9. Histogramme présentant la réponse sur les récepteurs opioïdes des membranes de cerveau de rat en fonction de la concentration en naloxone

Il apparaît clairement sur cet histogramme, que plus la quantité de molécule opioïde en présence est importante, et plus la mesure de radioactivité diminue, ce qui signifie que les molécules se sont liées aux récepteurs opioïdes présents sur les membranes de cerveau de rat. Cet histogramme montre également que le test permet une discrimination des échantillons, en effet ceux-ci réagissent différemment en fonction de leur concentration ou de leur composition.

4. Conclusion

Même si le test *in vivo* reste la seule preuve indiscutable de l'activité biologique d'un produit, il reste coûteux et difficile à mettre en place dans un objectif de purification des molécules actives. Dans ce contexte, les tests *in vitro* permettent une discrimination rapide et relativement simple des activités biologiques en apportant également des informations essentielles sur les mécanismes mis en jeu.

Cette étude montre donc l'intérêt de deux tests de screening pouvant permettre la caractérisation de molécules d'intérêt répondant à des problèmes actuels que sont le surpoids (voire l'obésité), et le stress.

Bibliographie

- C.K.Ferrari, E.A.Torres. "Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging." *Biomed. Pharmacother.*, 57: 251-260, 2003
- H. Korhonen, A. Pihlanto. "Food derives bioactive peptides-opportunities for designing future foods". *Curr. Pharm. Des.*, 9: 1297-1308, 2003
- S. Nagaoka, Y.Futamura, K.Miwa, T.Awano, K.Yamauchi, Y.Kanamaru, T.Kojima, T.Kuwata. "Identification of a novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β -lactoglobulin". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 281: 11-17, 2001
- N.Nedjar-Arroume, V.Duvois-Delval, E.Y.Adje, F.Krier, P.Mary, M.Kouach, G.Briand, D.Guillochon. "Bovine hemoglobin: an attractive source of antibacterial peptides." *Peptides.*, 29(6): 969-977, 2008
- H.A.Sampson. "Update on food allergy." *J Allergy Clin Immunol.*, 113: 805-819, 2004
- G.P.Zaloga, R.A.Siddiqui. "Biologically active dietary peptides." *Mini. Rev. Med. Chem.*, 4: 815-821, 2004