
Obtention de peptides actifs après modification structurale de l'hémoglobine bovine : Cas de quelques alcools

Estelle Y. Adje, Naïma N. Arroume *, Didier Guillochon *

* IUTA de Lille

Laboratoire de Procédés Biologiques Génie Enzymatique et Microbien
Polytech'Lille-Lille I, BP 179, 59653 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

adje_esty@yahoo.fr, Naïma.Arroume@univ-lille1.fr, didier.guillochon@univ-lille1.fr

Sections de rattachement : 64

Secteur : Secondaire

RÉSUMÉ. L'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine engendre des peptides présentant des activités biologiques diverses. Le mécanisme d'hydrolyse mis en jeu passe par la dénaturation totale de la protéine. L'hydrolyse enzymatique d'une protéine met en jeu un grand nombre de réactions parallèles et successives (réactions composites). Aussi, pour un degré d'hydrolyse donnée de la protéine la nature et la concentration des séquences peptidiques intermédiaires sont sous control cinétique. L'objectif de ce travail consiste à développer une approche afin de faciliter l'obtention de peptides actifs structurés. La stratégie d'étude inclue l'utilisation de solvants structurants permettant de réaliser une hydrolyse ménagée de l'hémoglobine bovine par la pepsine. La réalisation d'une telle hydrolyse passe nécessairement par l'analyse de l'effet de ces solvants sur la structure native des protéines mis en jeu. Dans cet travail, les analyses spectroscopiques telles que la spectrophotométrie, la spectrophotométrie et le dichroïsme circulaire, montrent que l'utilisation de Méthanol 40%, d'éthanol 30%, de propanol 20% ou de butanol 10% (v/v), permet de conserver la structure secondaire de l'hémoglobine mais aussi d'effectuer un réarrangement de sa structure tertiaire afin d'aboutir à un schéma d'hydrolyse différent de ceux connu jusqu'à lors et permettant d'obtenir des peptides antimicrobiens.

MOTS-CLÉS : Peptides actifs, hémoglobine bovine, pepsine, hydrolyse, structure tertiaire et secondaire.

1. Introduction

L'hémoglobine est une protéine tétramérique de structure globulaire de 64500 Daltons. Elle est constituée de deux chaînes alpha et de deux chaînes bêta. L'hémoglobine a été décrite par Ivanov et al comme une source de peptides actifs (Ivanov 1997). L'obtention de ces peptides peut se faire par extraction in vivo ou de manière in vitro, après hydrolyse. En 1986, Brant et al ont montré que l'hydrolyse de l'hémoglobine permet d'obtenir une série de peptides ayant des activités opioïdes : les hémorphines. Depuis, plusieurs peptides à activité diverses ont été obtenus à partir de l'hydrolyse des chaînes alpha et bêta de l'hémoglobine.

En 1952, Linderstrom-Lang a démontré que l'hémoglobine native est hydrolysée immédiatement en peptides de petites tailles, alors que celle de l'hémoglobine dénaturée procède plutôt par la formation et le clivage d'une succession de peptides intermédiaires plus ou moins stables (Linderstrom-Lang 1952).

Notre objectif est de rechercher de nouveaux concepts et méthodes permettant d'améliorer la préparation de peptides amphiphiles cationiques actifs par hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine. L'une des stratégies utilisées est d'effectuer une hydrolyse ménagée de l'hémoglobine en modifiant sa structure tertiaire tout en conservant les structures secondaires grâce à l'utilisation de solvants comme les alcools. La compréhension du mécanisme d'hydrolyse de l'hémoglobine en présence de solvants passe nécessairement par l'étude de l'effet des solvants sur la structure native de la protéine. Ce travail s'inscrit dans le cadre du suivi de l'hydrolyse ménagée de l'hémoglobine bovine par la pepsine à travers l'analyse des variations structurales de l'hémoglobine durant cette hydrolyse. L'une des premières étapes de ce suivi est l'étude du changement conformationnel de l'hémoglobine bovine en présence de solvants tel que le méthanol, l'éthanol, le propanol ou le butanol.

Les alcools ont la capacité de déstabiliser la structure tertiaire des protéines (dénaturation de la protéine) et de stabiliser la structure secondaire de la protéine (le méthanol et d'autres alcools courts) (Liu et al 2003). L'augmentation de la chaîne hydrocarbonée entraîne une augmentation de l'habilité dénaturante de l'alcool vis-à-vis des protéines (Jansson et al 2005). La stabilité de la conformation native et des structures en hélice des protéines dépend de plusieurs variables comme la température, le pH, la force ionique et la composition en solvant. Les études réalisées par Conio et al en 1970 sur la poly-L-ornithine et l'acide poly-L-glutamique ont permis d'établir que l'ordre selon lequel les alcools stabilisent au mieux la conformation des structures en hélice alpha est butanol > propanol > éthanol > méthanol (Conio et al 1970). Cependant l'effet de ces alcools est contraire à celui observé pour les grosses molécules comme le collagène et le tropocollagène (Bianchi et al 1970).

L'effet des alcools résulte de la faible polarité des solvants. Cette polarité affaiblit les liaisons hydrophobes qui stabilisent la structure globale de la protéine, mais renforce simultanément des interactions électrostatiques telles que les liaisons hydrogènes responsables de la conformation des structures secondaires renforçant donc ces structures. Alternativement, les effets de la faible polarité peuvent être interprétés en termes d'énergie libre des groupes de protéine d'eau et de solvants.

Les solvants organiques miscibles à l'eau tels que l'acétone et l'éthanol entraînent une précipitation des protéines. Cette précipitation est due à leur faible constante diélectrique qui serait à l'origine d'une diminution du pouvoir de solvatation des solutions aqueuses. La précipitation varie en fonction de la nature de l'alcool, de la longueur de la chaîne aliphatique et du nombre de groupement hydroxyles greffés sur cette chaîne. Les concentrations élevées de substances organiques solubles dans l'eau interfèrent avec les forces hydrophobes qui stabilisent les structures protéiques et ceci à cause de leur propres interactions hydrophobes avec l'eau. Les substances organiques ayant plusieurs groupements hydroxyles comme l'éthylène glycol ou même le saccharose sont cependant des agents dénaturants médiocres car leur possibilité d'établir des liaisons hydrogènes les rend moins apte à déstabiliser la structure de l'eau (Roger B. Gregory; 1995).

2. Matériels et méthodes

Préparation des échantillons. La solution mère d'hémoglobine a été dissoute dans l'eau distillée puis dosée par la méthode Drabkin (Crosby et al., 1954). La concentration d'hémoglobine pour les analyses spectroscopiques est de 3 μM ou de 18,6 μM . Ces solutions sont préparées dans du tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1M pH 5,5 avec ou sans méthanol 40%, éthanol 30%, propanol 20% et de butanol 10% (v/v). L'hémoglobine dénaturée 1% est obtenue par ajout d'urée 6M dans la même solution tampon que précédemment.

Mesure de l'absorbance. Les mesures d'absorption sont effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu. L'absorbance des solutions d'hémoglobine a été effectuée dans l'UV-Visible, entre 200-800 nm, avec 3µM d'hémoglobine.

Mesure de la fluorescence. L'étude de la fluorescence de l'hémoglobine a été effectuée à l'aide de la spectrophotométrie avec 3µM d'échantillon. La longueur d'onde d'excitation était de 290 nm, l'émission est suivie entre 300-800 nm.

Mesure du dichroïsme circulaire. Le suivi des structures de l'hémoglobine a été effectué à l'aide d'un spectropolarimètre JASCO. Des cuves de 0,01mm ont été utilisées pour l'analyse des structures secondaires de 188-250 nm avec une concentration d'hémoglobine de 3µM. L'analyse des structures tertiaires a été effectuée avec 18,6 µM, dans des cuves de 5mm.

L'ellipticité molaire est calculée selon la formule [1]

$$[\theta] = 3300 \text{ \AA; } [\theta] \text{ est exprimée en degré/cm.decimoles d'acides aminés} \quad [1]$$

$$\text{Le pourcentage d'hélice alpha} = [\theta]_{222} (1 - (2,57 / (\text{nombre d'acides aminés} - 1))) \times 100 \text{ (Greenfield, 1996).}$$

3. Résultats et discussion

3.1. Hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine en absence et en présence d'alcool

3.1.1. Hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine en absence d'alcool

L'hydrolyse de l'hémoglobine bovine (1%) par la pepsine a été réalisée en condition native et en condition dénaturante (en présence d'urée 6 M) en milieu tampon acide acétique /acétate de sodium 0,1 M et à pH 5,5 et à 23°C. La réaction d'hydrolyse est arrêtée à différents temps d'hydrolyse par ajout de tampon borax 0,32 M, pH 12,5. Les hydrolysats sont ensuite analysés par HPLC après différents temps d'hydrolyse. Les profils chromatographiques de quelques temps d'hydrolyse de l'hémoglobine dans les deux conditions (native et dénaturante) (figures non présentées), montrent qu'au cours de l'hydrolyse en condition native, les premiers peptides apparaissent dès le début de l'hydrolyse (1min). Ces mêmes peptides demeurent durant toute l'hydrolyse mais seule la concentration de ces peptides augmente il s'agit d'un mécanisme d'hydrolyse de type « one by one », de plus les chaînes (á et â) du tétramère demeurent durant l'hydrolyse. Comme décrit par Linderstrom-Lang K en 1952, l'hydrolyse des protéines à l'état natif se fait suivant un mécanisme de type « one by one » (Linderstrom-Lang K, 1952). L'hydrolyse de l'hémoglobine bovine réalisée par plusieurs auteurs à pH 4,5, en condition native suit ce même mécanisme (Dubois et al 2005, Arroume et al 2006, Froidevaux et al 2001). En effet en conditions natives à pH 5,5 la molécule protéique a une conformation très proche de celle à pH 7. Cependant même si la structure tertiaire est légèrement modifiée, l'accessibilité de l'enzyme reste faible. L'enzyme hydrolyse donc une mole d'hémoglobine à la fois ce qui conduit à la production de peptides finaux de petites tailles.

Par contre en présence d'urée, en condition dénaturante, dès le début de l'hydrolyse, apparaissent des peptides intermédiaires de taille plus grande, qui sont ensuite hydrolysés en peptides finaux de plus petite taille. Il s'agit d'un mécanisme « zipper ». De plus les chaînes á et â du tétramères sont tout de suite entièrement hydrolysés par la pepsine. Les mêmes résultats ont précédemment été obtenus par plusieurs auteurs mais à un pH d'étude de 4,5, permettant ainsi l'obtention de peptides actifs (Arroume et al 2008, Dubois et al 2005, Choïnard et al 2002, Froidevaux et al 2001). Le mécanisme « zipper » est aussi confirmée à pH 5,5 en présence d'urée 6M.

En effet, en présence d'urée, la dissociation de la protéine en deux hétérodimères, favorise l'accessibilité de l'enzyme pour son substrat (hémoglobine). Il s'en suit donc une libération de peptides intermédiaires de grande taille dès le début de l'hydrolyse.

3.1.2. Hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine en présence d'alcool

Une étude cinétique de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine a été réalisée en présence du méthanol, de l'éthanol, du propanol et du butanol aux concentrations de 1, 10, 20, 30% et 40%, en milieu tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1 M pH 5,5. Les hydrolysats obtenus sont ensuite séparés par HPLC. L'analyse chromatographique montre que quelque soit l'alcool utilisé on observe une hydrolyse de la protéine. Cette hydrolyse se traduit par l'apparition de peptides dont la concentration dépend du pourcentage et du type d'alcool présent.

La figure 1 montre les résultats de l'analyse chromatographique des hydrolysats de 2,5 min. Ces profils chromatographiques présentent l'intensité d'absorption à 215 min des hydrolysats (peptides, chaîne alpha, chaîne bêta et hème) en fonction du temps de rétention sur la colonne chromatographique. Dès les premiers temps

d'hydrolyse (2,5min), les premiers pics de peptides apparaissent à 10% de butanol ; ces mêmes pics sont présents à partir de 20% de propanol puis à 30% d'éthanol et aussi à 40% de méthanol alors qu'ils étaient absents en absence d'alcool. Il ya donc un effet complémentaire de l'alcool sur les protéines (hémoglobine et pepsine) entre la longueur de la chaîne aliphatique et la concentration.

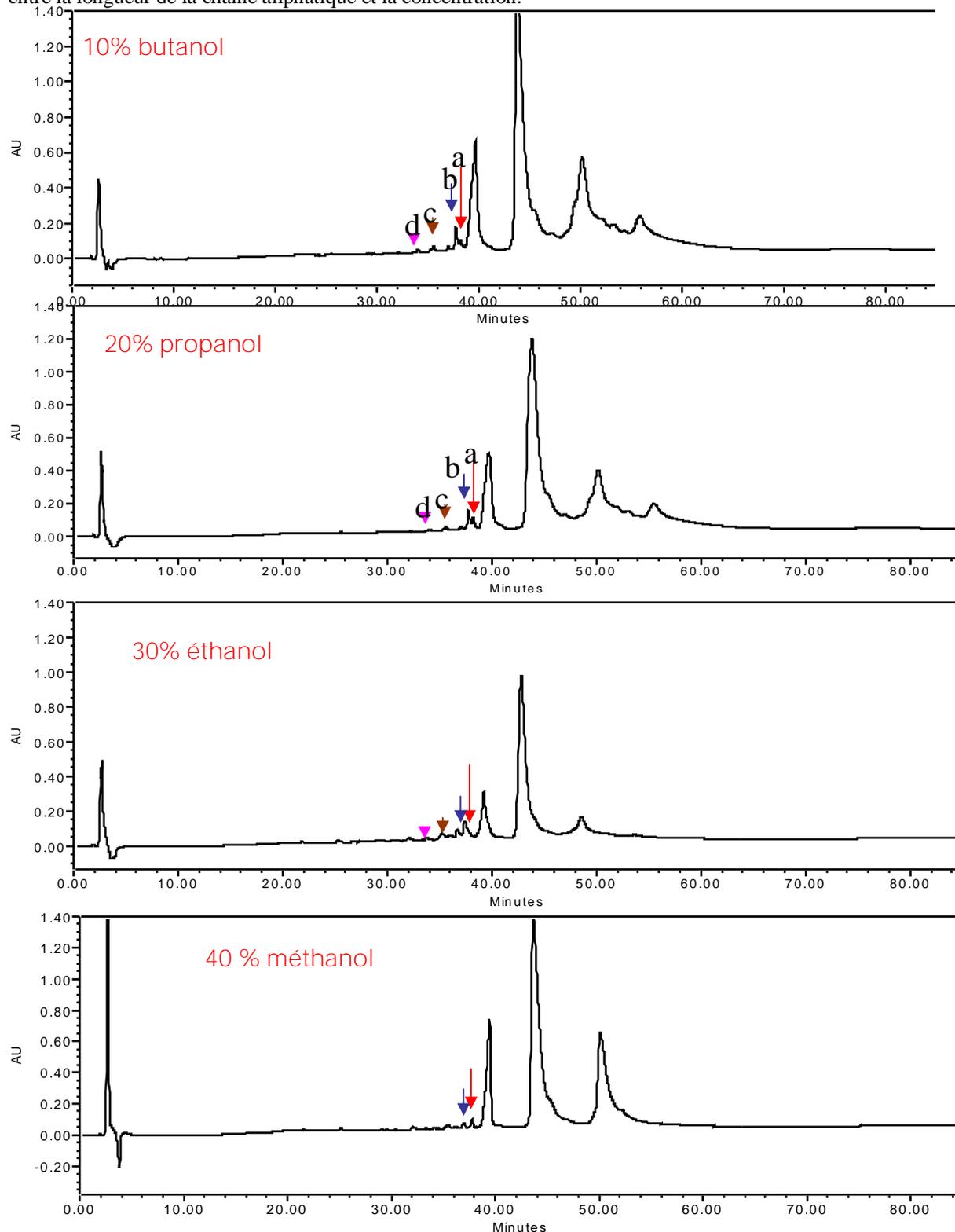


Figure 1: Profils chromatographiques des hydrolysats (2,5min) de l'hémoglobine native en présence de différents alcools à concentration variable dans un tampon acétique/acétate de sodium 0, 1M pH 5,5.

Comme le montre les profils chromatographiques précédents, les hydrolysats 2,5 minutes permettent d'obtenir des peptides ayant un temps de rétention supérieur à 30 minutes. Ces peptides ne sont obtenus qu'en présence de 10% de butanol, 20% de propanol, 30% d'éthanol et de 40% de méthanol. Le mécanisme d'hydrolyse serait donc différent de celui qui se produit lors de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine en condition native (one by one) et en condition dénaturé (zypper). Afin de le comprendre il serait donc utile de suivre la variation structurale de l'hémoglobine et de la pepsine, lors de l'ajout des solvants.

3.2. Etudes spectrales de l'hémoglobine bovine en présence d'alcools de concentrations définies

Etude structurale par fluorescence

Une étude plus approfondie de l'effet du méthanol, de l'éthanol, du propanol et du butanol à concentration respectivement de 40, 30, 20 et 10%, est réalisée par spectrophotométrie UV-visible, dichroïsme circulaire et spectrofluométrie afin de caractériser les variations structurales de l'hémoglobine bovine. L'étude spectrofluorimétrique a été réalisée à une longueur d'onde d'excitation de 290 nm. L'émission de la fluorescence est enregistrée de 300-800 nm. La concentration d'hémoglobine après ajout de solvant a été déterminée à l'aide de spectrophotomètre. L'analyse a été réalisée sur 3 μM d'échantillon. La figure 2 représente l'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde. L'intensité d'émission entre 300-400 nm augmente avec l'ajout de solvants. Les concentrations d'alcool choisies entraînent donc une augmentation de l'intensité d'émission du Trp- α 37, sauf dans le cas de l'emploi de 40% de méthanol où une diminution de cette intensité est observée. L'exposition du tryptophane est plus important en présence de propanol et de butanol puisque l'intensité d'émission est beaucoup plus grande que celle obtenue dans le cas de la protéine native ; la structure protéique s'éloigne de celle native et se rapproche de celle à l'état dénaturé.

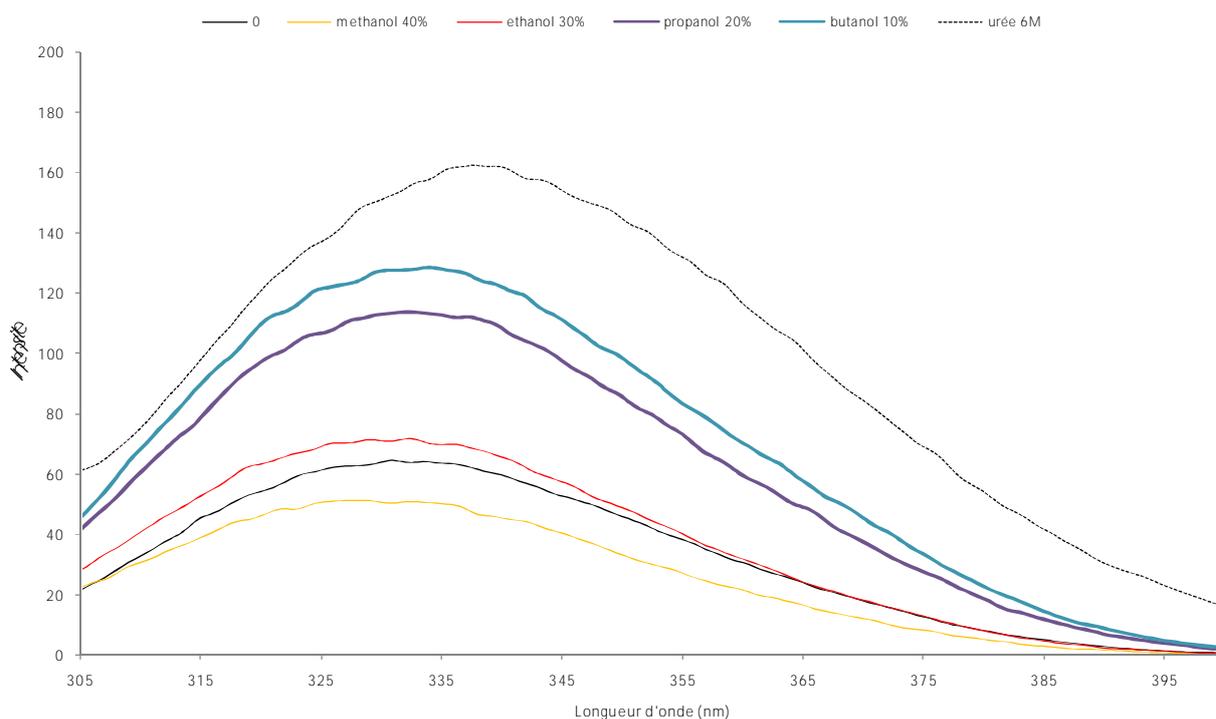


Figure 2: Spectre de fluorescence de l'hémoglobine (3 μM) bovine en présence d'alcools, d'urée et en absence de solvants

Etude structurale par dichroïsme circulaire

Les études de dichroïsme circulaire sont réalisées de 188-250 nm pour le suivi des structures secondaires avec une concentration protéique de 3 μM puis de 250-600 nm pour le suivi des structures tertiaires avec une concentration de 18,6 μM . La figure 3 représente l'intensité de l'ellipticité molaire [θ] ou [θ] en fonction de la longueur d'onde.

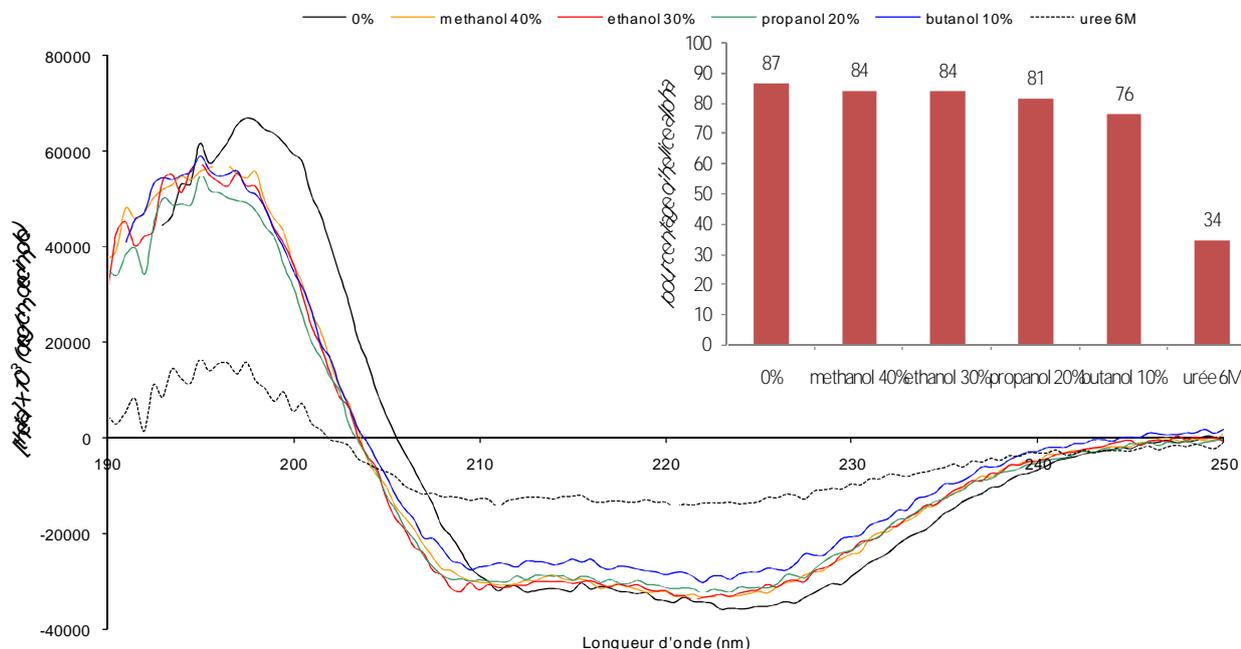


Figure 3 : Dichroïsme circulaire (180-250nm) de l'hémoglobine bovine (3 μM) en présence d'alcools, sous forme native et dénaturée dans du tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1 M pH 5,5.

Le spectre de dichroïsme montre que l'ellipticité molaire à 208-222 nm ne varie pas en présence de solvant. Le pourcentage d'hélice initialement à 87%, est le même (84%) en présence de 40% de méthanol et de 30% d'éthanol. Il subit une légère baisse en présence de 20 % de propanol et atteint 71% en présence de butanol. Les structures secondaires de l'hémoglobine en présence de ces alcools ne varient que très peu. L'écart moyen n'étant que de 2,9% entre chaque pourcentage.

La figure 4 représente l'intensité de l'ellipticité molaire [θ] ou [θ] en fonction de la longueur d'onde de 245-525 nm.

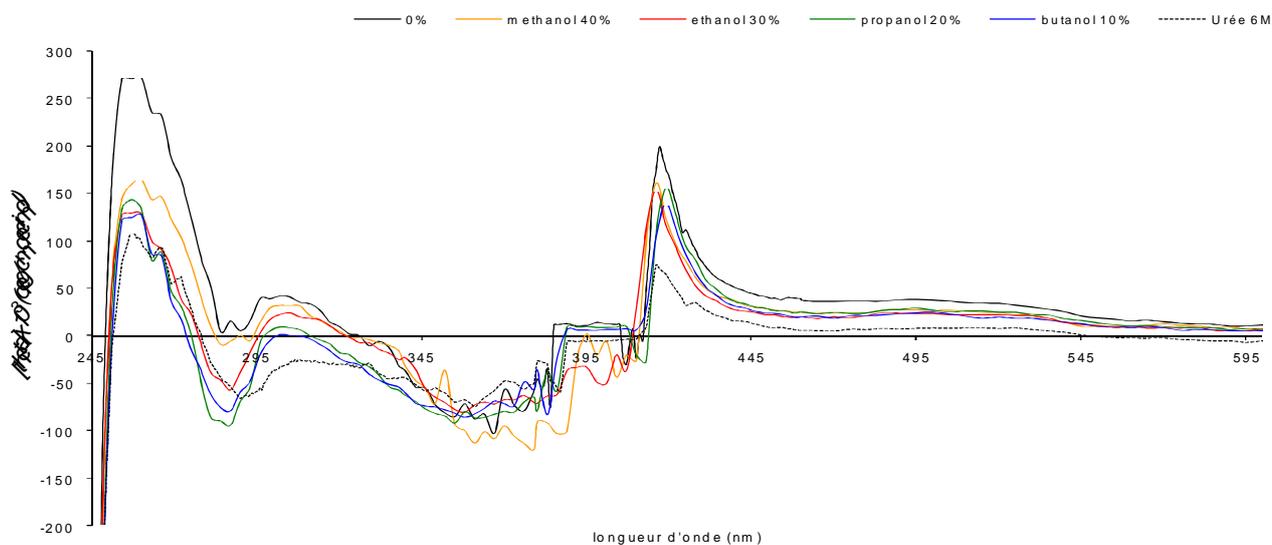


Figure 4 : Dichroïsme circulaire de l'hémoglobine bovine (18,6 μM) en présence d'alcools, sous forme native et dénaturée dans du tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1 M pH 5,5.

Les analyses effectuées dans l'UV proche (245-300 nm) montrent que l'hémoglobine en présence de 40% de méthanol, 30% d'éthanol, 20% de propanol et 10 % de butanol, a la même longueur d'onde d'ellipticité maximale positive (260 nm) que les deux témoins (hémoglobine dénaturée par l'urée 6M et hémoglobine native) avec des intensités plus faibles que celle de l'hémoglobine native mais supérieures à celle de l'hémoglobine dénaturée. Un effet Cotton négatif à 390 nm, du à la chaîne bêta de l'hémoglobine, est aussi été observé en présence des différents solvants comme dans le cas de la protéine à l'état natif avec des intensités quasi identiques. Cependant dans le visible, en présence d'éthanol et de méthanol, la longueur d'onde maximale d'ellipticité positive est située à 415 nm et en présence de propanol et de butanol cette longueur d'onde est de 420 nm ; tandis qu'elle est de 417 nm dans le cas de l'hémoglobine native. Dans le cas de l'éthanol et du méthanol, l'ellipticité de la chaîne alpha de l'hémoglobine l'emporte sur celle de la chaîne bêta, tandis que dans le cas du propanol et du butanol l'effet contraire est observé. L'hémoglobine native quant à elle présente l'ellipticité issue de la contribution des deux chaînes (alpha et bêta).

4. Obtention des peptides actifs

Les peptides ont été purifiés en plusieurs étapes par HPLC en phase inverse. Les fractions récupérées ont été identifiées et caractérisées par ESI-MS/MS. Les peptides actifs ont montré une activité antimicrobienne vis à vis de quatre souches bactériennes : *Micrococcus luteus* A270, *Listeria innocua*, *Escherichia coli* et *Salmonella enteridis*

PICS	FRAGMENTS	Activités biologiques	Références
1	a 99-105	Antimicrobienne (a 99-106)	Arroume et al 2008
	a 100-105	Antimicrobienne (a 99-106)	Arroume et al 2008
2	a 99-106	Antimicrobienne	Arroume et al 2008
	a 137-141	Opiotide	Zhao et al, 1997
3	a 1-32	Antimicrobienne	Arroume et al 2008
4	a 107-128	Antimicrobienne (a 110-128)	Arroume et al 2008
	a 3-36 (+1)	Potentiellement antimicrobienne	
5	a 1-33	Antimicrobienne (a 1-32)	Arroume et al 2008
		Potentiellement antimicrobienne	
	a 73-105 (+1)		
6	B 79-104 (0)	Identifier	
7	a 67-105 (+1)	Potentiellement antimicrobienne	
	B 1-30	Antimicrobienne	Arroume et al 2008
	a 86-109 (+5)	Potentiellement antimicrobienne	
8	B 77-125 (-1)	Identifier	
9	a 107-133	Antimicrobienne	Arroume et al 2008
10	a 1-46	Antimicrobienne (a 1-32)	Arroume et al 2008
	a 110-141	Antimicrobienne (a 107-141)	Arroume et al 2008
	a 107-136	Antimicrobienne	Arroume et al 2008
11	a 107-141	Antimicrobienne	Arroume et al 2008
	B 114-145	Antimicrobienne	Arroume et al 2008
12	a 106-141	Antimicrobienne (a 107-141)	

Tableau 1 : Récapitulatif des peptides obtenus après 2,5 min d'hydrolyse en présence de solvants.

5. Conclusion

La structure secondaire de l'hémoglobine bovine est conservée lors de l'ajout d'alcool ; sa structure tertiaire se trouve entre celle à l'état dénaturée (urée 6M) et celle à l'état natif. Ce réarrangement a permis l'obtention de peptides actifs lors de l'hydrolyse pepsique suivant un mécanisme différent de ce qui avait été observés jusque là par différents auteurs (Linderstrom-Lang, 1965 ; Froidevaux et al 2000, Nedjar-Arroume et Al 2008). Les études chromatographiques ont permis d'isoler 12 fractions, de ces fractions, 21 peptides ont été identifiés par spectrométrie de masse.

L'une des caractéristiques importante des peptides antimicrobiens est la charge globale de ces peptides. En effet, la charge globale positive de ces peptides confère à la molécule, la capacité d'interagir avec les membranes bactériennes. La plupart des peptides identifiés possèdent une activité antimicrobienne connue.

Bibliographie

Bianchi E., Rampone R., Tealdi A., Ciferri A. The Role of Aliphatic Alcohols on the Stability of Collagen and Tropocollagen. *The Journal of Biological Chemistry*. 1970 ; 245; 13: 3341-3345.

Brantl V, Gramsch C, Lottspeich F, Mertz R, Jaeger KH, Herz A. Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins, *Eur J Pharmacol*, 1986; 125(2):309-10

Choisnard L, Froidevaux R, Nedjar-Arroume N, Lignot B, Vercaigne-Marko D, Krier F, Dhulster P, Guillochon D. Kinetic study of the appearance of an anti-bacterial peptide in the course of bovine haemoglobin peptic hydrolysis. *Biotechnol Appl Biochem*. 2002 p. 187-94

Conio G., E. patrone, S. Brighetti The effect of aliphatic alcohols on the helix-coil Transition of Poly-L-ornithine and poly-L-glutamic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 1970; 245; 13: 3335-3340.

Dubois V., Nedjar-Arroume N., D. guillochon The influence of pH on the appearance of active peptides in the course of peptic HYdrolysis of Bovine hemoglobin. *Prep Biochem Biotechnol*, 2005; 35(2):85-102.

Froidevaux R, Krier F, Nedjar-Arroume N, Vercaigne-Marko D, Kosciarz E, Ruckebusch, C, Dhulster P, Guillochon D. Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. *FEBS Lett* 2001; 491:159-163.

Ivanov VT, Karelin AA, Philippova MM, Nazimov IV, Pletnev VZ. Hemoglobin as a source of endogenous bioactive peptides: the concept of tissue-specific peptide pool, vol. 43. John Wiley & Sons, Inc. *Biopoly*, 1997; 171-188.

Jansson H., Bergman R., Swenson J., Relation between solvent and protein Dynamics as Studied by dielectric spectroscopy. *J. Phys. Chem. Biol.*, 2005. 109: P. 241434-24141.

Linderstrom-Lang K. the initial stages in the breakdown of proteins by enzymes. Proteins and enzyme III. Lanes medical lectures. *Stanford university press California*, 1952, Vol 6. P 53-72.

Liu H. L., Hsu C. M., the effects of solvent and temperature on the structural integrity of monomeric melittin by molecular dynamics simulations; *Chemicals Physics Letters*, 2003, 375: p 119-125

Nedjar-Arroume N, Dubois-Delval V, Miloudi K, Daoud R, Krier F, Kouach M, Briand G, Guillochon D. Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. *Peptides*. 2006 p. 2082-9.

Nedjar-Arroume N, Dubois-Delval V, Adje EY, Traisnel J, Krier F, Mary P, Kouach M, Briand G, Guillochon D, Bovine hemoglobin: an attractive source of antibacterial peptides, *Peptides*, 2007. doi:10.1016/j.peptides.2008.01.011

Roger B. Gregory;. *Protein-solvent interactions*. 1995, 296-3009

Zhao QY, Molina P, Piot JM. Peptic peptide mapping by HPLC, on line with photodiode array detection, of a haemoglobin hydrolysate produced at pilot-plant scale from an ultrafiltration process. *J Liq Chrom Rel Technol* 1997 ; 20 : 1717-1739.