



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Ecole Doctorale : Sciences et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits et Environnement

 **THESE**

Présentée pour l'obtention du grade de :

Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine

Spécialité : Sciences Agronomiques

Par **Frédérique BALANDRAS**

Etude *in vitro* de la sensibilité de l' α -casozépine, décapeptide à activité benzodiazépine mimétique, à diverses protéases et peptidases du tractus gastro-intestinal. Etude comportementale chez le rat Wistar de l'activité anxiolytique de certains produits de dégradation de l' α -casozépine par la pepsine.

Membres du jury :

LEONIL Joëlle, Directeur de Recherche, INRA, Rennes

ROUSSET Monique, Directeur de Recherche, INSERM, Paris

CHEVALOT Isabelle, Directeur de Recherche, ENSAIA-INPL, Nancy

MONTAGNE Lucile, Maître de Conférence,

GAILLARD Jean-Luc, Professeur, UHP, Nancy

LAURENT François, Professeur, ENSAIA-INPL, Nancy

RYCHEN Guido, Professeur, ENSAIA-INPL, Nancy

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Examineur

Examineur

REMERCIEMENTS

Cette thèse est le fruit d'un long travail de collaboration entre deux laboratoires, l'ancien Laboratoire des Sciences Animales (ENSAIA) et le laboratoire Biosciences des Aliments (UHP) qui désormais ne font plus qu'un, l'URAFPA.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes, professeurs, collègues, familles et amis qui m'ont aidée et soutenue lors de ces années.

Je remercie Monsieur le Professeur François Laurent de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, permis de débiter ce travail et toujours soutenue auprès de l'Ecole Doctorale.

Je remercie à très juste titre Monsieur le Professeur Jean-Luc Gaillard pour m'avoir également accueillie dans son laboratoire. Merci d'avoir su trouver le temps et le courage de m'accompagner jusqu'au terme de ce travail.

Je remercie sincèrement Monsieur Guido Rychen, directeur de l'URAFPA, de participer à la finalisation de ce travail.

J'adresse mes remerciements à Mesdames les Directeurs de Recherches Joëlle Léonil (Science et Technologie du Lait et de l'Oeuf, Rennes) et Monique Rousset (Centre de Recherche des Cordeliers, Paris) qui me font l'honneur d'examiner et de juger ce travail.

Mes très sincères et amicaux remerciements vont à Messieurs Yves Le Roux et Laurent Miclo, Maîtres de Conférences forts patients. Plus que votre aide, vos idées et vos critiques constructives pendant la réalisation de ce travail, je vous suis particulièrement reconnaissante pour votre soutien et pour avoir su me faire partager vos passions pour la recherche et l'enseignement.

La maîtrise de la culture cellulaire a été le résultat de multiple collaborations et pour cela je tiens à remercier très chaleureusement Anne Blais (Agroparistech, Paris), j'ai beaucoup apprécié mes séjours dans vos locaux, et surtout votre grande disponibilité et gentillesse, Hervé Schohn (Laboratoire de Biologie du Développement, UHP, Nancy) pour sa grande disponibilité, Monique Rousset (Institut de Recherche des Cordeliers, Paris), Nadine Pavlov (IUT, UHP, Nancy), et enfin Isabelle Chevalot et Jean Louis Goergen (LSGC, ENSAIA, Nancy).

Merci également à Claire qui rend la culture cellulaire joyeuse, et à Servane.

Merci à Daniel Mollet (Science et Technologie du Lait et de l'Oeuf, Rennes) pour avoir effectué, avec une grande rapidité, les analyses en spectrométrie de masse.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien financier de l'Institut National de la Recherche Agronomique et de la Région Lorraine et par le financement d'un demi poste d'ATER (IUT, UHP, Nancy) pour lequel je tiens à remercier Monsieur le Professeur Jean Brun-Bellut.

La collaboration avec Madame le Professeur Marie Trabalon (Physiologie du Comportement, UHP, Nancy) qui nous a apporté ces connaissances du comportement animal et nous a permis de mener à bien l'ensemble des tests réalisés *in vivo*. Merci également à Caroline Suter et Christian Vogel et pardon à tous ces animaux sacrifiés, pauvres bêtes, n'est ce pas Anaïs.

Je remercie également Didier Desor, Henry Schroeder et Nicolas Violle avec toute ma sympathie.

Il m'aura fallu du temps pour venir à bout de ce travail et de ce fait j'ai rencontré **énormément** de personnes qui m'ont apportée du réconfort par les discussions, les rires, les repas partagés et les soirées endiablées. Grâce à vous, ces années se sont déroulées dans un cadre de travail très agréable (peut-être trop) !!

Un grand merci à l'ensemble des personnes permanentes de l'URAFPA, tous sites confondus : les poissons, les rats-poules-cochons-chèvres (les micropolluants), et les caséines-peptides-activité. Il serait trop long de nommer chacune des personnes avec lesquelles j'ai partagé tant de moments. Merci à Chantal et Emilie pour votre aide.

Un grand merci aux personnes du service informatique, Olivier (à fond l'AMAP), Adrien (alias grenouille) et Evelyne. Et aussi au « bodymass » team, l'innovation diabolique vaincra !!

Je n'oublierai jamais tous les bons moments partagés (et bureaux pour certains et certaines) avec les anciens et futurs anciens thésards de l'URAFPA et des autres laboratoires de l'INPL : Kahina, Claire L, Sophie L., Adrian, Sophie G., Samira, Rami (je sais, tu n'es pas ancien thésard), David L., Abdou, Delphine, Aurélie, Wessam et sa femme (pour la rime), Muriel, Sylvie, Emeline, Fayçal, Angélique, Agnès, Anaël, Nicolas....

Je voudrais faire quelques « spéciales dédicaces ».

MERCI Catherine pour ta grande joie de vivre, ton écoute, ton efficacité, ta jovialité, ta sportivité (me faire courir au bad !). Ton rire et son dédoublement (caché au fond de ta poche) resteront gravés dans mes tympanes. Tout évoquer serait trop long alors encore mille mercis pour tout.

Soph', même si nous ne partageons plus les mêmes points de vue sur la vie (blague), je garde toujours en mémoire les heures passées à manger des M n' Ms et à « refaire le monde ...des sciences».

Toutes deux dans la même galère de fin de thèse, Aude, que serais-je devenue au 3^e sans toi ? Je t'apprécie énormément, tu me fais souvent rire et parfois malgré toi. Je te souhaite tout le bonheur que tu mérites.

Non je n'oublie ma Mag ! Que de souvenirs, il serait indécent d'en faire la liste tant elle est longue. Mais quand même, les cours à Metz (« entre les dents »), les *teu teu teu je je je* bien entendu, Fabrice : aqua-standing boujour !, Boulaincourt, le vin blanc pétillant, ta grossesse, votre petit Louis...la vie ensemble à Nancy ! Même si vous avez décidé de partir loin, pour juste un peu de soleil en plus, et des moutons dans le jardin, et que cela fait 2 ans que je vous promets de venir vous voir, je sais que nous resterons toujours amies. Nous avons encore eu la preuve lors de ta venue à Nancy pour ta soutenance, que la distance et tes nouveaux amis, au demeurant forts sympathiques, n'altèrent en rien la qualité de notre amitié!! Je vous embrasse les Peter-Anouilh.

Je tiens à remercier le « groupe Hydrocell » de me permettre de poursuivre mon travail dans le domaine de la recherche.

Qu'il me soit permis d'associer à ces remerciements toutes les personnes non citées qui d'une façon ou d'une autre ont participé à mes travaux.

« Il y a stress chaque fois qu'un individu est sollicité par son environnement et doit s'adapter : Cette sollicitation peut être bonne ou mauvaise. »

Près de 450 millions de personnes seraient directement concernées par le stress dans le monde. En France, on estime ce chiffre à 4 millions, soit près **d'1 personne sur 15.**

Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé)

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	1
LISTE DES TABLEAUX	3
LISTE DES FIGURES	5
INTRODUCTION	9
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	10
I. PEPTIDES BIOACTIFS ISSUS DES CASEINES BOVINES	11
I.1. Méthodes d'obtention et domaines de fonctionnalité	11
I.1.1. Peptides potentiellement actifs au niveau du système nerveux	11
I.1.2. Peptides potentiellement actifs au niveau du système digestif	14
I.1.2.1. Les caséinophosphopeptides (CPPs)	14
I.1.2.2. Le glycomacropéptide	15
I.1.3. Peptides potentiellement actifs au niveau du système cardiovasculaire	16
I.1.3.1. Peptides anti-thrombotiques	16
I.1.3.2. Peptides anti-hypertenseurs	16
I.1.4. Peptides potentiellement actifs au niveau du système immunitaire	20
I.1.5. Peptides anti-bactériens	20
II. L'α-CASOZEPINE, PEPTIDE BENZODIAZEPINE-MIMETIQUE, ISSU DE L'HYDROLYSE TRYPSIQUE DE LA CASEINE α_{s1} BOVINE	21
II.1. Le système GABAergique	21
II.2. Activité d'un l'hydrolysate trypsique de caséine α_{s1} bovine	21
II.3. L'α-casozépine	23
II.3.1. Etudes <i>in vitro</i>	23
II.3.2. Etudes <i>in vivo</i>	24
II.3.3. Relation structure-fonction	24
III. LA BIODISPONIBILITE DES PEPTIDES AU SEIN DE L'ORGANISME APRES ADMINISTRATION ORALE	24
III.1. Le tractus gastro-intestinal, barrière enzymatique	26
III.1.1. Impact des protéases et peptidases du tractus gastro-intestinal sur les peptides exogènes	26
III.1.1.1. Digestion gastrique	26
III.1.1.2. Digestion par les enzymes pancréatiques	26
III.1.1.3. Les peptidases de la bordure en brosse	27
III.1.1.4. Les peptidases intracellulaires	29
III.2. L'épithélium intestinal, barrière physique	29
III.2.1. Composition cellulaire et rôle de l'épithélium intestinal	30
III.2.2. Les différentes voies d'absorption des peptides à travers l'épithélium intestinal	35
III.2.2.1. La voie paracellulaire	36
III.2.2.2. La voie transcellulaire	38
IV LES MODELES D'ETUDE DE L'ABSORPTION INTESTINALE	40

IV.1. Les modèles d'étude <i>in vivo</i>	43
IV.2. Les modèles d'étude <i>ex vivo</i> et <i>in vitro</i>	43
IV.2.1. La chambre de Ussing	44
IV.2.2. Les modèles cellulaires	44
IV.3. Le modèle cellulaire Caco-2	44
IV.3.1. Description du modèle	44
IV.3.1.1. Différenciation biochimique	46
IV.3.1.2. Différenciation morphologique	46
IV.3.2. Les limites et les variations du modèle Caco-2	48
IV.3.3. Amélioration du modèle Caco-2 : la co-culture	49
IV.3.4. Exemple d'études de transfert de peptides employant le modèle Caco-2	49
CONCLUSION	52
OBJECTIFS DU TRAVAIL	54
MATERIEL ET METHODES	56
I. PURIFICATION DES PEPTIDES DE SYNTHÈSE	57
II. HYDROLYSE DE L'α-CASOZEPINE PAR LES ENZYMES GASTRIQUES ET PANCREATIQUES	58
II.1. Hydrolyse de l'α-casozépine par la pepsine (EC 3.4.23.1)	58
II.2. Hydrolyse par la trypsine (EC 3.4.21.4), l'α-chymotrypsine (EC 3.4.21.1) et la Corolase PP®	58
II.3. Simulation d'hydrolyse gastrique puis pancréatique	59
III. HYDROLYSE DE L'α-CASOZEPINE PAR LES VESICULES MEMBRANAIRE DE BORDURE EN BROSSE D'INTESTIN DE RAT WISTAR	59
III.1. Obtention des vésicules membranaires de bordure en brosse d'intestin de rats Wistar	59
III.2. Hydrolyse de l'α-casozépine et du fragment F97 par les VMBB	60
IV. ANALYSES STATISTIQUES DES RESULTATS DES HYDROLYSES GASTRIQUE, PANCREATIQUE ET INTESTINALE	63
V. LE MODELE CELLULAIRE Caco-2	63
V.1. Les différents clones de la lignée parentale Caco-2	65
V.2. Entretien des cultures	65
V.2.1. Composition du milieu de culture	65
V.2.2. Ensemencement et passage des cellules	65
V.2.3. Congélation et décongélation des cellules	66
V.3. Caractérisation du modèle Caco-2 en culture sur filtres par l'établissement d'indicateurs de différenciation	67
V.3.1. Résistance électrique transépithéliale	67
V.3.2. Tests de caractérisation biochimique	67
V.3.2.1. Mesure de l'activité de la phosphatase alcaline	68
V.3.2.2. Mesure de la concentration en protéines	68

V.4. Etude du transfert	69
V.5. Etude de la dégradation des peptides d'intérêt	70
VI. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE EN PHASE INVERSEE	71
VII. SPECTROMETRIE DE MASSE	72
VIII. ETUDES COMPORTEMENTALES <i>IN VIVO</i>	72
VIII.1. Enfouissement Défensif Conditionné	72
VIII.1.1. Principe	72
VIII.1.2. Protocole et dispositif	72
VIII.1.3. Traitements	73
VIII.2. Open Field et Labyrinthe en Croix Surélevé	73
VIII.2.1. Principe	73
VIII.2.2. Protocole et dispositif	75
VIII.2.3. Traitements	77
VIII.3. Boîte Claire/Obscure	77
VIII.3.1. Principe	77
VIII.3.2. Protocole et dispositif	79
VIII.3.3. Traitements	79
VIII.4 Traitements statistiques	79
CHAPITRE I : ETUDE DE L'HYDROLYSES <i>IN VITRO</i> DE L'α-CASOZEPINE PAR UN SYSTEME ENZYMATIQUE D'ORIGINE GASTRIQUE ET/OU PANCREATIQUE	81
I. ETUDE DE L'HYDROLYSE DE L'α-CASOZEPINE PAR LA PEPSINE	82
I.1. Etude de la dégradation de l'α-casozépine par la pepsine à pH 2,0	82
I.2 Etude de la dégradation de l'α-casozépine par la pepsine à pH 4,0	82
I.3. Caractérisation des fragments de l'α-casozépine libérés par la pepsine à pH 2,0 et à pH 4,0	84
II. ETUDE DE L'HYDROLYSE DE L'α-CASOZEPINE PAR CERTAINES PEPTIDASES PANCREATIQUES	87
II.1 Etude de la dégradation de l'α-casozépine par l'α-chymotrypsine	87
II.2 Etude de la dégradation de l'α-casozépine par la trypsine	87
II.3 Etude de la dégradation de l'α-casozépine par la Corolase PP®	90
II.4. Simulations de dégradation gastrique puis pancréatique	93
II.4.1. Etude de l'hydrolyse pepsique de l' α -casozépine suivie d'une hydrolyse par un mélange composé de trypsine et d' α -chymotrypsine	93
II.4.2. Etude de la dégradation pepsique de l' α -casozépine suivie d'une hydrolyse par la Corolase PP®	95
CONCLUSION	97
CHAPITRE II : ETUDE DE L'HYDROLYSE DE L'α-CASOZEPINE ET DU FRAGMENT F97 PAR LES PEPTIDASES DES VESICULES MEMBRANAIRES DE BORDURE EN BROSSE D'ENTEROCYTES DE RATS WISTAR	100

I. ETUDE DE L'HYDROLYSE DE L'α-CASOZEPINE ET DU FRAGMENT F97 PAR LES PEPTIDASES MEMBRANAIRES DE LA BORDURE EN BROSSE	102
I.1. Cinétique de dégradation de l'α-casozépine	102
I.1.1. Produits générés par l'hydrolyse de l' α -casozépine et leurs cinétiques de formation	102
I.2. Cinétique de dégradation du fragment F97	109
I.2.1. Produits générés l'hydrolyse de l' α -casozépine et leurs cinétiques de formation	109
II. α-CASOZEPINE ET F97 EN CONTACT AVEC LES PEPTIDASES MEMBRANAIRES DES VESICULES DE LA BORDURE EN BROSSE EN PRESENCE D'INHIBITEURS	113
II.1. Cinétique de dégradation de l'α-casozépine et formation des produits d'hydrolyse en présence d'EDTA	113
II.2. Cinétique de dégradation du fragment F97 en présence d' EDTA	117
II.3. Cinétique de dégradation de l'α-casozépine et du fragment F97 en présence de bestatine	123
II.3.1 Produits d'hydrolyse de l' α -casozépine	123
II.3.2. Produits d'hydrolyse du fragment F97	123
CONCLUSION	130
CHAPITRE III : ETUDE DE L' α-CASOZEPINE ET SES FRAGMENTS F97 ET F95 CHEZ LE RAT WISTAR	133
I. ETUDE DE L'ACTIVITE DU FRAGMENT F97 DANS LE TEST DE L'ENFOUISSEMENT DEFENSIF CONDITIONNE	134
II. ETUDE DE L'ACTIVITE DES FRAGMENT F97 ET F95 DANS LES TESTS DU LABYRINTHE EN CROIX SURELEVE ET DE LA BOITE CLAIRE/OBSCURE	136
II.1 Labyrinthe en croix surélevé	136
II.1.1 Temps de latence avant l'entrée en branche fermée	136
II.1.2 Entrées en branche ouverte	140
II.2 Boîte claire/obscur (BCO)	140
CONCLUSION	146
CHAPITRE IV : ETUDE <i>IN VITRO</i> DU TRANSFERT et DE LA DEGRADATION DE L'α-CASOZEPINE ET DES FRAGMENTS F97 ET F95 EN CONTACT AVEC UN EPITHELIUM ENTEROCYTAIRE MODELISE PAR LES CELLULES DE LA LIGNEE Caco-2	158
I. INDICATEURS DE VALIDATION DE LA CULTURE DU MODELE Caco-2	159
I.1. Validation de la perméabilité du tapis cellulaire en formation par mesure de la résistance électrique transépithéliale	150
I.2. Suivi de la différenciation cellulaire par le dosage enzymatique de la phosphatase alcaline et des protéines	
Totales	150

II. ETUDE DU TRANSFERT DE L'α-CASOZEPINE ET SES FRAGMENTS F97 ET F95, EN UTILISANT LA LIGNEE CELLULAIRE Caco-2 COMME MODELE DE BARRIERE EPITHELIALE INTESTINALE	152
II.1. Etude préliminaire du transfert de l'α-casozépine du pôle apical vers le pôle basal de l'épithélium intestinal	152
II.2. Optimisation des paramètres de culture des cellules Caco-2 sur filtres ; conséquences sur l'étude du transfert de l'α-casozépine	152
II.2.1. Augmentation de la perméabilité de la monocouche cellulaire Caco-2 par ajout de cytochalasine et de glucose	156
II.2.2. Augmentation de la résistance de l'α-casozépine aux peptidases de la bordure en brosse de l'épithélium	156
II.3. Devenir des peptides F97 et F95 en contact avec la membrane apicale de cellules Caco-2	156
II.3.1. Etude du transfert des fragments F97 et F95 avec le modèle cellulaire Caco-2	158
III. DEGRADATION DE L'α-CASOZEPINE ET DES PEPTIDES F97 ET F95 PAR LES PEPTIDASES DE LA BORDURE EN BROSSE DES CELLULES Caco-2	158
III.1. Etude de l'hydrolyse de l'α-casozépine dans le milieu apical	158
III.1.1. Potentiel protéolytique de la bordure en brosse des cellules Caco-2 et des milieux apicaux	158
III.1.1.1 Protéolyse de l'α-casozépine par les milieux apicaux « <i>ex vitro</i> »	159
III.1.1.2. Comparaison des cinétiques de dégradation de l'α-casozépine par les milieux apicaux « <i>ex vitro</i> » et « <i>in vitro</i> »	159
III.2. Caractérisation des produits issus de la dégradation partielle de l'α-casozépine par les cellules Caco-2	162
III.2.1 Comparaison des cinétiques de formation des produits de dégradation de l'α-casozépine par les milieux « <i>ex vitro</i> » et « <i>in vitro</i> »	165
III.3. Etude de l'hydrolyse des fragments F97 et F95 et les produits formés	165
CONCLUSION	170
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	181
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	189

LISTE DES ABREVIATIONS

ATCC	"American type culture collection" collection Américaine de culture
α -LA	α -Lactalbumine
BCA	Acide bicinchoninique
BCO	Boîte claire/obscur
BDM	"Basal defined medium" milieu basal défini
β -LG	β -lactoglobuline
BZD	Benzodiazépine
CCK	Cholécystokinine
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CN	Caséine
CPPs	Caséinophosphopeptides
CZP	Casozépine
DISP	"Delta sleep inducing peptide" peptide inducteur du sommeil lent
DMEM	"Dulbecco's modified eagle medium" milieu de Eagle modifié par Dulbecco
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
EAF	Epithélium associé aux follicules lymphoïdes
EC	Enzyme commission
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine I
EDC	Enfouissement défensif conditionné
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétate
EMEM	"Eagle's minimum essential medium" milieu minimum essentiel de Eagle
FITC	"Fluorescein isothiocyanate" fluorescéine isothiocyanate
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GIP	"Gastric inhibitory peptide" peptide inhibiteur gastrique
GMP	Glycomacropeptide
HBSS	"Hank's buffered saline solution" solution saline tampon de Hank
HEPES	"N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid"
HRP	"Horse Radish peroxydase" peroxydase de Raifort
i.p.	Intrapéritonéal
LCS	Labyrinthe en croix surélevé
NTR2	Récepteur de la neurotensine type 2

MALDI-TOF	"Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight" désorption-ionisation laser et détection à temps de vol
MES	Acide 2-(N-morpholino) éthane sulfonique
OF	"Open field" espace ouvert
PAL	Phosphatase alcaline
PBS	"Phosphate buffer solution" solution tampon phosphate
PC	Polycarbonate
pI	pH isoélectrique
PEG	Polyéthylène glycol
PET	Polyéthylène téréphtalate
PM	Poids moléculaire
PNP	Paranitrophénol
PVDF	"Polyvinylidene fluoride" polyfluorure de vinylidène
RTE	Résistance transépithéliale
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SVF	Sérum de veau foetal
TFA	Acide trifluoroacétique
THR	"Thyrotropin-releasing hormone" hormone de libération de la thyrotropine
VIP	"Vasoactive intestinal peptide" peptide intestinal vasoactif
VMBB	Vésicule membranaire de bordure en brosse
ZO	Zonula occludens

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Produits commercialisés, à base de peptides bioactifs issus des protéines du lait bovin (Korhonen *et al.*, 2005).

Tableau 2 : Exemple de peptides bioactifs libérés par certaines bactéries et enzymes bactériennes à partir des protéines du lait (Korhonen et Pihlanto, 2006).

Tableau 3 : Liste non exhaustive de peptides inhibiteurs de l'ECA issus de protéines d'origine animale et végétale (Hartmann et Meisel, 2007).

Tableau 4 : Spécificité de coupure des peptidases présentes au niveau de la bordure en brosse des entérocytes caractérisées chez l'homme (<http://www.brenda-enzymes.info/>; Woodley, 1994).

Tableau 5 : Etudes sur le transfert de peptides réalisées sur le modèle cellulaire Caco-2.

Tableau 6 : Hydrolyses de l' α -casozépine et du fragment F97 par les VMBB en présence ou absence d'inhibiteurs.

Tableau 7 : Identification des fragments peptidiques produits lors des hydrolyses réalisées *in vitro* sur l' α -casozépine.

Tableau 8 : Caractérisation par spectrométrie de masse des fragments peptidiques générés par l'hydrolyse de l' α -casozépine par les peptidases présentes au niveau des vésicules de membrane de bordure en brosse d'entérocytes de rats.

Tableau 9 : Caractérisation par spectrométrie de masse des fragments peptidiques générés par l'hydrolyse du fragment F97 par les peptidases présentes au niveau des VMBB d'entérocytes de rats.

Tableau 10 : Caractérisation par spectrométrie de masse des fragments peptidiques issus de l' α -casozépine en présence d'EDTA (5mM) par peptidases présentes au niveau des vésicules de membrane de bordure en brosse d'entérocytes de rats.

Tableau 11 : Comparaison entre les fragments peptidiques obtenus en présence ou absence d'EDTA lors de l'hydrolyse de l' α -casozépine et du fragment F97 par les VMBB.

Tableau 12 : Caractérisation par spectrométrie de masse des fragments peptidiques générés par l'hydrolyse du fragment F97 par les peptidases présentes au niveau des VMBB d'entérocytes de rats, en présence d'EDTA (5mM).

Tableau 13 : Nombre de passage et temps passé dans les compartiments familier et non familier des rats Wistar mâles âgés de 6 semaines de l'Open Field précédant le test du labyrinthe en croix surélevé.

Tableau 14 : Ensemble des protocoles de culture cellulaire effectués pour l'étude de biodisponibilité des peptides d'intérêt.

Tableau 15: Potentiel protéolytique des peptidases solubles (milieu « *ex vitro* ») et des peptidases membranaires (« *in vitro* » - « *ex vitro* »), obtenu par soustraction du pourcentage d'hydrolyse de l' α -casozépine par les peptidases solubles au pourcentage d'hydrolyse de l' α -casozépine (CZP) par les peptidases totales (milieu « *in vitro* ») (d'après les résultats de la figure 52).

Tableau 16: Les propriétés physicochimiques de l' α -casozépine et des fragments F97 et F95 (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>, Lecouvey *et al.*, 1997).

Tableau 17 : Variation de la valeur de la résistance transépithéliale (RTE) et du coefficient de perméabilité en fonction des monocouches cellulaires Caco-2 obtenues dans différentes conditions (Walter et Kissel, 1995).

Tableau 18: Paramètres pouvant affecter les études effectuées sur système cellulaire Caco-2 cultivé sur filtres (Bailey *et al.*, 1996).

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma de la réaction enzymatique rénine angiotensine impliquée dans l'augmentation de la pression artérielle.

Figure 2 : Représentation du récepteur hétéropentamérique GABA_A membre de la famille des récepteurs-canaux (ionotrophe).

Figure 3 : Conformation moyenne adoptée par l' α -casozépine en milieu micellaire SDS.

Figure 4 : Coupe histologique de l'intestin grêle.

Figure 5 : L'épithélium intestinal.

Figure 6 : Structure d'une plaque de Peyer constituée notamment de cellule M.

Figure 7 : Jonctions serrées établies entre les cellules entérocytaires.

Figure 8 : Métabolisme de l' α -La et de la β -Lg en contact avec le pôle apical d'une monocouche cellulaire Caco-2.

Figure 9 : Cellules M au sein de l'épithélium intestinal.

Figure 10 : Dispositif de chambre de Ussing.

Figure 11 : Principe de la culture sur filtre des cellules de la lignée Caco-2.

Figure 12 : Méthode d'obtention et de purification de vésicules membranaires de bordure en brosse (VMBB) de rats Wistar âgés d'un an selon la méthode de Bertheloot (Maenz *et al.*, 1991).B :

Figure 13 : A : Schéma d'une villosité intestinale.

B : Modèle cellulaire Caco-2 mis en culture sur filtres *in vitro* formant une monocouche de cellules type entérocyte et délimitant un compartiment apical et un compartiment basal, dans le but de reproduire le comportement des cellules entérocytaires formant en partie l'épithélium intestinal *in vivo*.

Figure 14 : Test d'enfouissement défensif conditionné.

Figure 15 : Vue de face (1) et vues du dessus (2, 3, 4) du dispositif utilisé pour les tests de l'Open Field et de la boîte Claire/Obscure.

Figure 16 : Test du labyrinthe en croix surélevé.

Figure 17 : Pourcentage d' α -Casozepine résiduelle au cours de l'hydrolyse par la pepsine *in vitro*.

Figure 18 : Proportion des produits issus de l'hydrolyse de l' α -casozépine par la pepsine.

Figure 19 : Pourcentage d' α -Casoazépine résiduelle au cours de l'hydrolyse *in vitro* par la trypsine, l' α -chymotrypsine ou la corolase PP®.

Figure 20 : Produits générés lors de l'hydrolyse de l' α -casozépine par l' α -chymotrypsine.

Figure 21 : Proportion des produits issus de l'hydrolyse de l' α -casozépine par la corolasePP®.

Figure 22 : Comparaison entre les cinétiques de formation des fragments F97 (A) et F98 (B) par l' α -chymotrypsine et la corolase PP®.

Figure 23 : (A) Pourcentage d' α -casozépine résiduelle et (B) cinétique de libération des fragments peptidiques (%) pendant l'hydrolyse réalisée en présence d'un mélange de trypsine et d' α -chymotrypsine.

Figure 24 : (A) Pourcentage d' α -casozépine résiduelle et (B) cinétique de libération des fragments peptidiques (%) pendant l'hydrolyse réalisée en présence de corolasePP®.

Figure 25 : Cinétiques de dégradation de l' α -casozépine (A) et d'apparition de tyrosine libre (B) au cours du temps lors de l'hydrolyse par les vésicules de membrane de la bordure en brosse d'entérocytes (VMBB) de rats Wistar.

Figure 26 : Cinétiques de formation des peptides YLEQLLR, YLGYLEQ et LGYLEQ obtenus lors de la dégradation de l' α -casozépine par les VMBB d'entérocytes de rats Wistar.

Figure 27 : Cinétiques de formation des peptides LEQLLR, EQLLR, LLR, LR et LEQ ou EQL obtenus lors de la dégradation de l' α -casozépine par les VMBB d'entérocytes de rats Wistar.

Figure 28 : Hypothèse de formation par les peptidases présentes au niveau des membranes des entérocytes de la bordure en brosse des peptides identifiés

Figure 29 : Cinétiques de dégradation du fragment F97 (A) et d'apparition de tyrosine libre (B) au cours du temps lors de l'hydrolyse par les vésicules de membrane de la bordure en brosse d'entérocytes (VMBB) de rats Wistar.

Figure 30 : Cinétiques de formation des peptides YLEQ, GYLEQ, LGYLEQ YLE et YLG obtenus lors de la dégradation du fragment F97 par les VMBB d'entérocytes de rats Wistar.

Figure 31: Cinétiques de dégradation de l' α -casozépine (A) et d'apparition de tyrosine libre (B) au cours du temps lors de l'hydrolyse par les vésicules de membrane de la bordure en brosse d'entérocytes (VMBB) de rats Wistar en présence ou absence d'EDTA (5mM).

Figure 32 : Cinétiques de formation des peptides LGYLEQLLR, GYLEQLLR, YLEQLLR et YLGYLEQL obtenus lors de la dégradation de l' α -casozépine par les peptidases des VMBB d'entérocytes de rats Wistar, en présence ou absence d'EDTA (5mM).

Figure 33 : Cinétiques de formation des peptides LEQLLR et EQLLR obtenus lors de la dégradation de l' α -casozépine par les peptidases des VMBB d'entérocytes de rats Wistar, en présence ou absence d'EDTA (5mM).

Figure 34 : Cinétiques de dégradation du fragment F97 (A) et d'apparition de tyrosine libre (B) au cours du temps lors de l'hydrolyse par les vésicules de membrane de la bordure en brosse d'entérocytes (VMBB) de rats Wistar.

Figure 35 : Cinétiques de formation des peptides LGYLEQ, GYLEQ et YLEQ obtenus lors de la dégradation du fragment F97 par les VMBB d'entérocytes de rats Wistar en présence ou non d'EDTA (5mM).

Figure 36 : Cinétiques de dégradation de l' α -casozépine et du fragment F97 par les VMBB d'entérocytes de rats Wistar, en présence ou non de bestatine (0,01 mM et 0,1 mM).

Figure 37 : Cinétiques de formation des peptides LGYLEQLLR, GYLEQLLR et YLEQLLR obtenus lors de la dégradation de l' α -casozépine par les VMBB d'entérocytes de rats Wistar, en présence ou non de bestatine (0,01 mM et 0,1 mM).

Figure 38 : Cinétiques d'apparition et de disparition des peptides YLGYLEQL, YLGYLEQ et LGYLEQ obtenus lors de la dégradation de l' α -casozépine par les VMBB d'entérocytes de rats Wistar, en présence ou non de bestatine (0,01 mM et 0,1 mM).

Figure 39 : Cinétiques d'apparition et de disparition des peptides LGYLEQ, GYLEQ et YLEQ obtenus lors de la dégradation du fragment F97 par les VMBB d'entérocytes de rats Wistar, en présence ou non de bestatine (0,01 mM et 0,1 mM).

Figure 40 : Cinétiques d'apparition et de disparition des peptides YLE et YLG lors de la dégradation du fragment F97 par les VMBB d'entérocytes de rats Wistar, en présence ou non de bestatine (0,01 mM et 0,1 mM).

Figure 41 : Effet du fragment F97 sur le comportement d'enfouissement défensif conditionné chez les rats Wistar mâles âgés de 6 semaines.

Figure 42 : Nombre total d'entrées dans les différentes branches des rats Wistar mâles âgés de 6 semaines étudiés dans le test du labyrinthe en croix surélevé.

Figure 43 : Temps de latence avant l'entrée en branche fermée des rats Wistar mâles âgés de 6 semaines étudiés dans le labyrinthe en croix surélevé.

Figure 44 : Temps passé (A) et pourcentage par rapport au temps total (B) en branches ouvertes des rats Wistar mâles âgés de 6 semaines étudiés dans le test du labyrinthe en croix surélevé.

Figure 45 : Nombre d'entrées en branche ouverte des rats Wistar mâles âgés de 6 semaines étudiés dans le test du labyrinthe en croix surélevé.

Figure 46 : Temps de latence avant l'entrée dans le compartiment non-familier éclairé (A) et nombre total de compartiments explorés (B) par les rats Wistar mâles âgés de 6 semaines étudiés dans le test de la boîte claire/obscur.

Figure 47 : Nombre d'explorations du compartiment familial obscur et temps passé dans ce compartiment (A, B) et dans le compartiment non-familier, éclairé (C, D) par les rats Wistar mâles âgés de 6 semaines placés dans la boîte claire/obscur.

Figure 48 : Les indicateurs de différenciation : Résistance transépithéliale (A), protéines (B) et dosage de l'activité de la phosphatase alcaline (C) pendant les phases de multiplication et de différenciation du tapis cellulaire Caco-2.

Figure 49 : Etude préliminaire du transfert de l' α -casozépine du compartiment apical (A) vers le compartiment basal (B) de cellules Caco-2 cultivées sur filtre.

Figure 50 : Cinétiques de dégradation de l' α -casozépine dans le compartiment apical, en présence ou non d'inhibiteurs de protéases non cytotoxiques.

Figure 51 : Cinétiques d'hydrolyse de l' α -casozépine par les milieux apicaux « *ex vitro* » en contact préalable pendant 15, 30, 60, 120 minutes avec le pôle apical des cellules Caco-2.

Figure 52 : Cinétiques d'hydrolyse de l' α -casozépine par deux milieux « *in vitro* » pré-incubés 2h (■) et 24h (▲) avec le pôle apical des cellules Caco-2, et par deux milieux « *ex vitro* » pré-incubés 2h (□) et 24h (Δ) avec le tapis cellulaire puis extrait du compartiment apical, à 37°C.

Figure 53 : Cinétiques de formation des produits obtenus lors de l'hydrolyse de l' α -casozépine par les peptidases des cellules Caco-2.

Figure 54 : Cinétiques de libération de la tyrosine (A), du fragment FTR₅₂ (C) et du fragment F97 (C) générés par l'hydrolyse de l' α -casozépine par les peptidases présentes dans 3 types différents de milieux apicaux.

Figure 55 : Cinétiques de dégradation « *in vitro* » de l' α -casozépine et des fragments F97 et F95.

Figure 56 : Cinétiques de libérations « *in vitro* » des produits d'hydrolyse des fragments F97 (A) et F95 (B).

INTRODUCTION

Les connaissances acquises au cours des années 1980 ont permis de penser que l'effet de l'ingestion de protéines laitières pourrait aller au-delà du simple apport nutritionnel. Certaines protéines contiennent au sein de leur séquence des peptides qui une fois libérés peuvent déclencher, par exemple au niveau de récepteurs membranaires, des réactions de régulation anticipative : c'est la valeur fonctionnelle de l'aliment (Mendy, 1984). Ainsi, depuis une vingtaine d'années un nombre grandissant de peptides à activité biologique, issus entre autres des protéines du lait, a été identifié et caractérisé.

Le concept de nutrition s'enrichit donc d'une approche dite de fonctionnalité de l'aliment mettant en évidence une action sur la santé des consommateurs (Roberfroid, 1999).

La nature physicochimique des peptides leur confère *a priori* une faible biodisponibilité liée notamment à leur dégradation partielle ou totale par les peptidases endogènes du tractus digestif. La détermination des mécanismes d'interactions moléculaires des peptides bioactifs avec leurs cibles (récepteurs, enzymes...), entraînant l'action sur l'organisme, reste encore difficile à mettre en évidence *in vivo*.

Ainsi l'étude de leur stabilité *in vitro* et *ex-vivo* vis-à-vis des protéases et peptidases du tractus gastro-intestinal, de leur stabilité chimique, et, en fonction de la localisation de la cible, l'étude des transferts au travers des barrières épithéliales (entérocytaire, et/ou hémato-encéphalique) doivent être validés pour permettre l'allégation des effets physiologiques sur le consommateur.

La synthèse bibliographique se focalise dans une première partie sur les caséines d'origine bovine qui contiennent dans leur structure primaire un grand nombre de peptides bioactifs, dont l' α -casozépine sur laquelle s'est porté notre intérêt. La deuxième partie évoque d'une manière générale le problème de l'absorption intestinale des peptides et protéines, confrontés aux barrières enzymatiques et physiques du tractus digestif. Enfin les différents modèles employés pour l'étude du transfert et du métabolisme des peptides bioactifs au travers de l'épithélium intestinal sont présentés.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. PEPTIDES BIOACTIFS ISSUS DES CASEINES BOVINES

I.1. Méthodes d'obtention et domaines de fonctionnalité

Les domaines d'action des peptides bioactifs issus des caséines bovines sont les systèmes nerveux, cardiovasculaire, immunitaire et digestif (Silva et Malacata, 2005).

Ces peptides, inactifs lorsqu'ils sont encore inclus dans la séquence de la protéine dont ils sont issus, peuvent être libérés par protéolyse, *in vitro* ou *in vivo* sous l'action de certaines enzymes d'origine endogène (tractus digestif) ou exogène (végétales, microbiennes,...), ou pendant des fermentations lactiques (Meisel, 1997 (a) et (b)). Leur activité biologique est ensuite mise en évidence par des méthodes *in vitro* et/ou *in vivo*. Certains ont été testés cliniquement. Des peptides bioactifs d'origine laitière sont déjà commercialisés en France et dans d'autres pays (tableau 1).

La voie de production de ces peptides la plus commune est la protéolyse contrôlée, ou non, des caséines par une ou plusieurs enzymes digestives (telles que la pepsine ou la trypsine ; Korhonen et Pihlanto, 2006). De nombreux peptides inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) et beaucoup de phosphopeptides fixateurs d'ions calcium sont obtenus par ce procédé d'hydrolyse (FitzGerald *et al.*, 2004 ; Gobbetti *et al.*, 2004 ; Meisel et FitzGerald, 2003 ; Vermeirssen *et al.*, 2002a et b ; Vermeirssen *et al.*, 2004 ; Tauzin *et al.*, 2002 ; Yamamoto *et al.*, 2003). D'autres enzymes, d'origine fongique, ou combinaisons d'enzymes (pepsine, chymotrypsine, thermolysine,...) sont également employées (Kilara, 1994 ; Korhonen et Pihlanto, 2003).

La voie fermentaire est une autre voie de production des peptides bioactifs. Certaines bactéries lactiques telles que *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus* génèrent ces peptides à partir de protéines laitières lors des processus de fermentation grâce à leurs protéases membranaires ou intracellulaires (Christensen *et al.*, 1999) (tableau 2).

I.1.1. Peptides potentiellement actifs au niveau du système nerveux

Les peptides possédant une activité opiacée ont été les premiers à avoir été identifiés (Brantl *et al.*, 1979 ; Henschen *et al.*, 1979). Ces peptides d'origine exogène nommés exorphines en référence aux endorphines, leurs homologues endogènes, possèdent des effets agonistes, et se lient sur les récepteurs de type opiacés μ , δ ou κ . Ces exorphines présentent des profils d'activité opiacée similaires à ceux des opiacés exogènes (morphine,...) ou endogènes

Tableau 1 : Produits commercialisés, à base de peptides bioactifs issus des protéines du lait bovin (Korhonen et Pihlanto, 2006).

Nom de marque	Type de produit	Bioactifs peptides fonctionnels	Allégation revendiquée	Producteurs
Calpis	Lait fermenté	VPP, IPP dérivés de CN β IPP dérivé de CN κ	Réduction de la pression artérielle	Calpis Co., Japon
Evolus	Lait fermenté enrichi en calcium	VPP, IPP dérivés de CN β IPP dérivé de CN κ	Réduction de la pression artérielle	Valio OY, Finlande
BioZate	Hydrolysats de protéines du lactosérum	Fragments de β -lactoglobuline	Réduction de la pression artérielle	Davisco, Etats-Unis
BioPURE-GMP	Hydrolysats de CN κ	CN κ -(f 106-169) (Glycomacropéptide)	Prévient les caries, protège contre infections virales et bactériennes	Davisco, Etats-Unis
Lactium	Hydrolysats de CN α_{s1}	CN α_{s1} -(f 91-100)	Réduit les effets tensionnels du stress*	Ingredia, France
Festivo	Fromage	CN α_{s1} -(f 1-9), CN α_{s1} - (f 1-7), CN α_{s1} - (f 1-6)	Réduction de la pression artérielle	MTT Agrifood Research Finlande
Cysteine Peptide	Hydrolysats	Peptides dérivés de protéines du lait	Energisant et aide au sommeil	DMV International, Pays-Bas
C12	Hydrolysats	Peptides dérivés de caséines	Réduction de la pression sanguine	DMV International, Pays-Bas
Capolac	Hydrolysats	Peptides dérivés de caséines	Favorise l'absorption du calcium	Arla Foods Ingredients, Suisse
PeptoPro	Hydrolysats	Peptides dérivés de caséines	Améliore les performances athlétiques et la capacité musculaire	DSM Food Specialties, Pays-Bas
Vivinal Alpha	Hydrolysats	Peptides dérivés de protéines du lactosérum	Aide à la relaxation et au sommeil	Broculo Domo Ingredients (BDI), Pays-Bas

* Allégation approuvée par la DGCCRF (Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes)

Tableau 2 : Exemple de peptides bioactifs libérés par certains micro-organismes et enzymes bactériennes à partir des protéines du lait (Korhonen et Pihlanto, 2006).

Bactéries/Levures	Protéines précurseurs	Séquences peptidiques et peptides	Activités
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Caséines β et κ	VPP, IPP	Inhibiteur de l'ECA antihypertensive
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		dérivés de CN β IPP dérivé de CN κ	
Enzymes de			
<i>Lactobacillus</i> GG	Caséines β et	1- YFPF	1- Opiacé
+ pepsine et	α_{s1}	2- AVPYPR	2- Inhibiteur de l'ECA
trypsine		3- TTMPLW	3- Immuno-stimulant
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	Caséine κ	ARHPHPLSFM	Antioxydant
IFO 13953			
<i>Streptococcus thermophilus</i> + <i>Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis</i>	Caséine β	SKVYP	Inhibiteur de l'ECA

ECA = Enzyme de conversion de l'angiotensine

(enképhalines,...). Elles agissent sur la motricité et les échanges intestinaux, possèdent des effets analgésiques, modulent diverses hormones, et agissent sur le système nerveux central et périphérique.

La β -casomorphine-7 et la β -casomorphine-5, exorphines issues de la caséine β bovine, se lient aux récepteurs μ (Teschemacher *et al.*, 1994). Certaines de leurs activités ont été montrées aussi bien *in vitro* à l'aide d'organes isolés et de cellules isolées ou en culture, qu'*in vivo*. Dans l'espèce porcine, après ingestion orale de caséine, la β -casomorphine-10 a été retrouvée au niveau du chyme intestinal (Meisel et Frister, 1989). La β -casomorphine-7 a été mise en évidence au niveau de l'intestin grêle chez l'Homme (Svedberg *et al.*, 1985). Après administration par voie intra-carotidienne, la β -casomorphine-5 a également été détectée intacte au niveau de la barrière hémato-encéphalique chez le rat (Ermisch *et al.*, 1983).

Loukas *et al.* (1983) ont mis en évidence deux séquences opiacées correspondantes aux résidus 90-96 (RYLGYLE) et 90-95 (RYLGYL) de la caséine α_{s1} . L'exorphine 90-96 possède l'activité opiacée la plus puissante.

La séquence amino-terminale des peptides opiacés dérivés des protéines du lait n'est pas identique à celles des peptides opiacés endogènes présents dans l'organisme (enképhalines, endorphines et dynorphines) (Teschemacher, 2003). Cependant des caractéristiques structurales communes aux deux types de peptides opiacés ont été identifiées par la présence d'un résidu tyrosyl à l'extrémité amino-terminale et la présence d'un autre résidu aromatique (de phénylalanine ou de tyrosine) en 3^e ou 4^e position. Ce motif structural est important pour la liaison avec les récepteurs aux opiacés : l'absence du résidu de tyrosine à l'extrémité amino-terminale entraîne une perte totale d'activité (Chang *et al.*, 1981).

D'autres peptides opiacés nommés casoxines ont un effet antagoniste ; ils dérivent principalement des caséines κ (Chiba *et al.*, 1989).

Certains peptides peuvent avoir des activités multiples : la β -casomorphine-7 a une action opiacée et est un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) (Brantl *et al.*, 1981).

I.1.2. Peptides potentiellement actifs au niveau du système digestif

I.1.2.1. Les caséinophosphopeptides (CPPs)

Les CPPs sont capable de chélater les cations, d'empêcher leur précipitation et de favoriser leur absorption intestinale. En 1950, Mellander met en évidence une recalification osseuse chez des enfants rachitiques indépendamment de la présence de vitamine D, après administration d'hydrolysats tryptiques de caséine. *In vitro*, les CPPs favorisent la calcification d'os embryonnaires de rat (Gerber et Jost, 1986). Une relation directe est montrée entre le degré de phosphorylation des CPPs et leur capacité à fixer les minéraux (Kitts et Yuan, 1994). Le site de fixation des minéraux et oligo-éléments (Ca, Mg, Fe, Zn, Ba, Cr, Ni, Co et Se) se situe au niveau des clusters de résidus de sérine phosphorylée chargés négativement (Berrocal *et al.*, 1989).

Libérés dès l'estomac et tout au long du tractus intestinal après ingestion de lait ou de produits fermentés, les CPPs sont notamment obtenus par dégradation *in vivo* des caséines α_{s1} , α_{s2} et β mais également *in vitro* par l'action d'enzymes gastriques et pancréatiques (Chabance *et al.*, 1998, Smacchi et Gobetti, 2000). Les CPPs peuvent aussi être obtenus par fermentation lactique lors de la fabrication de certains fromages (Pellegrino *et al.*, 1997), cependant leur activité peut être diminuée par certains traitements technologiques de l'industrie agro-alimentaire comme la stérilisation qui affecte la biodisponibilité des phosphopeptides par déphosphorylation des résidus de sérine (Meisel *et al.*, 1991).

Certains CPPs sont retrouvés dans la lumière intestinale de rats ayant reçu un régime riche en caséines (Hirayama *et al.*, 1992) et une certaine proportion semble capable de traverser la barrière intestinale sous forme intacte (Chabance *et al.*, 1998 ; Meisel *et al.*, 2003). La forte concentration de charges négatives portées par les clusters de résidus de sérine phosphorylée pourrait en effet les rendre résistants à la protéolyse au niveau gastro-intestinal (Clare et Swaisgood, 2000 ; FitzGerald, 1998). Des études sur la fixation du fer par les CPPs β CPP(1-25) et α_{s1} CPP (59-79) réalisées sur le modèle *in vivo* (perfusion intestinal) et *in vitro* (modèle cellulaire Caco-2) mettent en évidence des effets opposés. Le β -CPP (1-25) a une bonne biodisponibilité du fer et est bien absorbé au niveau du duodénum, comparativement au α_{s1} CPP (59-79) (Kibangou *et al.*, 2005).

I.1.2.2. Le glycomacropéptide

Ce peptide, constitué de 64 résidus d'acide aminé, correspond à la partie carboxy-terminale hydrophile de la caséine κ libérée lors de l'hydrolyse par la chymosine (CN κ -(f106-169)). Plusieurs formes ont été isolées, avec un degré variable de glycosylation (Pedersen *et al.*,

2000). Le glycomacropéptide (GMP) est notamment formé lors de la fabrication de fromages, et se retrouve alors dans le lactosérum. Ce peptide n'est pas absorbé intact au niveau de l'épithélium intestinal, il est hydrolysé en peptides de plus petite taille par les protéases du tractus intestinal. Le GMP stimule la sécrétion de cholécystokinine (CCK) par les cellules endocrines de l'épithélium intestinal, une hormone qui régule la prise alimentaire et agit en tant que signal de satiété (Beucher *et al.*, 1994 ; Burton-Freeman *et al.*, 2002).

I.1.3. Peptides potentiellement actifs au niveau du système cardiovasculaire

De nombreux peptides semblent pouvoir agir sur le système cardiovasculaire *via* des activités anti-thrombotiques ou anti-hypertensives.

I.1.3.1. Peptides anti-thrombotiques

Jollès (1975), a constaté des similitudes entre le mécanisme de coagulation du lait (système caséine κ -chymosine) et celui du sang (système fibrinogène-thrombine). Il existe une homologie structurale entre le undécapeptide CN κ -(f106-116) issu de la caséine κ et le fragment 400-411 de la chaîne γ du fibrinogène humain (Jollès *et al.*, 1978). Les casoplatélines, fragments CN κ -(f106-116), CN κ -(f106-112), CN κ -(f113-116) sont des peptides inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire. Ils empêchent la fixation de la chaîne γ du fibrinogène sur le récepteur GP IIb/IIIa localisé à la surface des plaquettes (Fiat *et al.*, 1993 ; Fiat et Jollès, 1989 ; Jollès *et al.*, 1986). En limitant le risque de thrombose, ces peptides pourraient réduire le risque d'accidents vasculaires cérébraux.

I.1.3.2. Peptides anti-hypertenseurs

L'hypertension est un problème de santé publique. Le système rénine-angiotensine participe à la régulation de la pression artérielle. La rénine agit sur l'angiotensinogène et libère l'angiotensine I qui est transformée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) en angiotensine II, un peptide vasoconstricteur augmentant la pression artérielle (figure 1). L'ECA hydrolyse également la bradykinine, un peptide vasorelaxant, et le rend inactif.

Maruyama et Suzuki (1982), Maruyama *et al.* (1987(a) et (b)) ont mis en évidence au sein d'hydrolysats trypsiques de caséines bovines des fragments peptidiques capables d'inhiber *in*

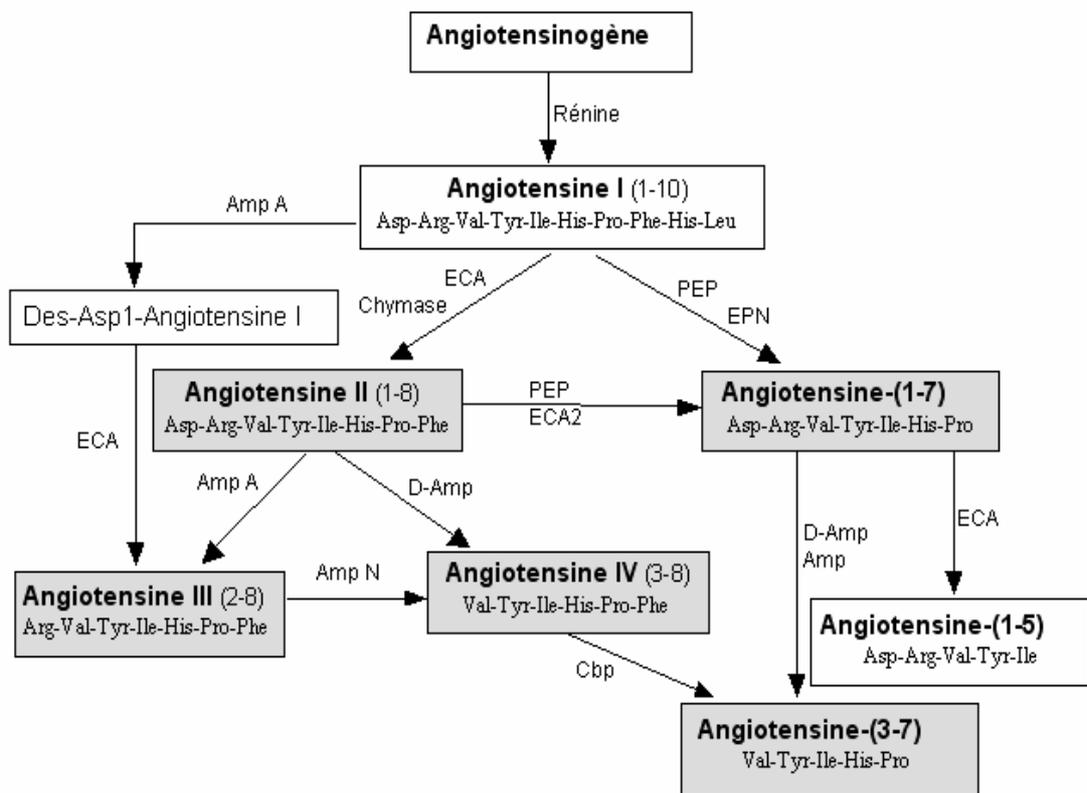
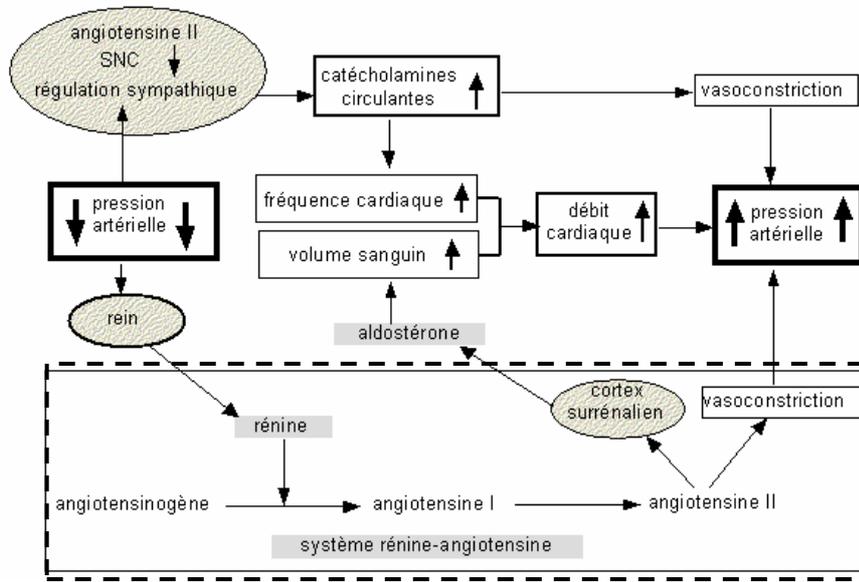


Figure 1 : Schéma du système enzymatique rénine-angiotensine impliquée dans la régulation de la pression artérielle.

SNC : système nerveux central ; ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine ; Amp A : aminopeptidase A ; Amp N : aminopeptidase neutre ; D-Amp : dipeptidylaminopeptidase I-III ; Cbp : carboxypeptidases ; EPN : endopeptidase neutre 24.11 (néprilysine) ; ECA2 : prolylcarboxypeptidase, PEP : prolylendopeptidase. Peptides ayant une activité biologique. (Santos *et al.*, 2000).

in vitro l'activité de l'ECA. Il s'agit notamment des peptides CN α_{s1} -(f23-34), CN α_{s1} -(f23-27), CN α_{s1} -(f194-199), CN β -(f177-183) et CN β -(f193-202). Des peptides inhibiteurs de l'ECA issus de la caséine α_{s2} bovine ont également été mis en évidence par Maeno *et al.* (1996) et Tauzin *et al.* (2002).

Certains peptides inhibiteurs de l'ECA ont été identifiés dans des fromages. Leur présence est fonction de l'activité protéolytique lors de la maturation des ces produits (Addeo *et al.*, 1992 ; Meisel, 1997a).

En plus du grand nombre de peptides inhibiteurs de l'ECA isolés à partir des protéines du lait, d'autres peptides ont été trouvés à partir de sources alimentaires variées (tableau 3). Certains auteurs (Roufik *et al.*, 2005 ; Walsh *et al.*, 2004) ont soulevé un problème majeur concernant les peptides antihypertenseurs mais aussi l'ensemble des peptides bioactifs testés *in vivo* après administration orale : leur forte instabilité vis-à-vis de certaines protéases et peptidases du tractus gastro-intestinal et/ou du compartiment sanguin les rendants inactifs par voie orale.

Effectivement, certaines études mettent en évidence que tous les peptides actifs contre l'ECA *in vitro* ne sont pas nécessairement anti-hypertenseurs *in vivo* (Ijäs *et al.*, 2004 ; Nurminen *et al.*, 2000). Après administration orale, ces peptides doivent être absorbés intacts au niveau de l'épithélium intestinal pour exercer leur activité anti-hypertensive et donc, exprimer une résistance relative ou totale à l'hydrolyse par les enzymes du tractus gastro-intestinal et plasmatique, mais également posséder des propriétés physico-chimiques (intrinsèque à la composition en acides aminés) en adéquation avec l'un ou l'autre des différents mécanismes de transport de l'épithélium intestinal. Satake *et al.* (2002) ont montré sur le modèle cellulaire Caco-2, que le tripeptide VPP, inhibiteur de l'ECA, pouvait être transporté intact par les voies paracellulaire et transcellulaire ; cependant une grande quantité de ce peptide (environ 80 %) n'échappe pas à la dégradation par les peptidases intracellulaires malgré la présence de deux résidus prolyl. Néanmoins, ce même tripeptide VPP ainsi que IPP, autre peptide inhibiteur de l'ECA, ont été détectés dans l'aorte abdominale de rats (spontanément hypertendus) après administration orale de lait fermenté par *Lb. helveticus* et *S. cerevisiae* (Masuda *et al.*, 1996). Chez l'Homme, 95 mL de ce même lait fermenté contenant ces deux peptides, ingérés quotidiennement pendant 4 à 8 semaines par des sujets hypertendus provoquent une baisse significative de la pression artérielle systolique par rapport à un groupe témoin recevant simplement un lait acidifié (Hata *et al.*, 1996).

Tableau 3 : Liste non exhaustive de peptides inhibiteurs de l'ECA issus de protéines d'origine animale et végétale (Hartmann et Meisel, 2007).

Origine	Protéine source	Nom / Séquence
Poissons	Protéine musculaire	WA (saumon), GWAP (sardine)
Viandes	Myosine de porc	MNPPK
	Troponine C de porc	RMLGQTP
	Actine de poulet	IVGRPRHQG
	Myosine de poulet	FQKPKR
Lait	α -Lactalbumine, β -Lactoglobuline	Lactokinines (e.g. WLAHK, LRP, LKP)
	Caséines α , β , κ	Casokinines (e.g. FFVAP, FLAPQY, VPP)
	Ovotransferrine	KVREGTTY
Oeuf	Ovalbumine	Ovokinine FRADHPL, Ovokinine (2-7) RADHPL
	Blé	Gliadine
Brocoli	Protéine de la plante	YPK
Soja	Protéine de soja	NWGPLV

I.1.4. Peptides potentiellement actifs au niveau du système immunitaire

Jollès *et al.* (1981) ont été les premiers à mettre en évidence l'activité immunostimulante d'un hydrolysats trypsique de lait humain. Cette activité est portée par le fragment CN β -(f54-59) d'origine humaine (Parker *et al.*, 1984). Par la suite d'autres fragments CN β -(f63-68), CN β -(f191-193) et CN α_{s1} -(f194-199) ont été isolés (Migliore-Samour *et al.*, 1989). Ces peptides stimulent *in vitro* la phagocytose des macrophages d'origine humaine ou murine et exercent une protection contre *Klebsiella pneumoniae* chez la souris (Migliore-Samour *et al.*, 1989). Certains peptides présents dans les yaourts, testés sur des lignées cellulaires issues de cellules cancéreuses colique IEC-6 et Caco-2, pourraient avoir un rôle de prévention sur les cancers du côlon par action sur certaines phases (G1-S-G2-M) du cycle cellulaire (Ganjam *et al.*, 1997). Cependant le mode d'action de ces peptides reste inconnu. La présence d'un résidu d'arginine en région amino- et carboxy-terminale permettrait une interaction spécifique avec les récepteurs membranaires des lymphocytes.

I.1.5. Peptides anti-bactériens

Des peptides issus de l'hydrolyse de la caséine α_{s2} sont capables d'inhiber la croissance de différentes souches bactériennes. Un ensemble de peptides, issus de l'hydrolyse de la caséine α_{s2} par la chymosine et nommés casocidines, inhibent la croissance de *Staphylococcus spp.*, *Sarcina spp.*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes* (Lahov et Regelson, 1996). L'isracidine, CN α_{s1} -(f1-23), a un effet antibiotique *in vivo* sur *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* et protège les brebis et les vaches contre les mammites (Lahov et Regelson, 1996). La casocidine I (CN α_{s1} -(f165-203) inhibe la croissance d'*Escherichia coli* et *Staphylococcus carnosus* (Zucht *et al.*, 1995). Actuellement, aucune donnée ne permet d'affirmer si ces peptides demeurent intacts et actifs après administration orale, étant donné que l'ensemble de ces tests ont été effectués *in vitro*, ou *in vivo* après injection intrapéritonéale.

D'autres activités biologiques ont été découvertes dans les hydrolysats de caséines comme des activités antioxydantes mais également une activité de type benzodiazépine-mimétique.

II. L' α -CASOZEPINE, PEPTIDE BENZODIAZEPINE-MIMETIQUE, ISSU DE L'HYDROLYSE TRYPSIQUE DE LA CASEINE α_{s1} BOVINE

En 1934, Laird *et al.* avaient remarqué que des personnes prenant un repas de céréales et de lait au dîner, avaient un sommeil de meilleure qualité, des résultats similaires ont été observés chez les personnes âgées (Berzina et Oswald, 1972).

II.1. Le système GABAergique

Le lait de vache a longtemps été considéré comme un breuvage apaisant avec des propriétés sédatives, sans connaître la ou les molécules responsables de ces effets. Medina *et al.* (1988 et 1992) ont montré que le lait peut contenir des traces de molécule de type benzodiazépine. Les benzodiazépines modulent, par allostérie, la sensibilité du récepteur GABA_A à l'effet du GABA (acide γ -aminobutyrique). Le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur du cerveau. Il a un rôle important dans le contrôle de l'hyperactivité neuronale associée à l'anxiété (Mac Donald, 1997 ; Richens, 1992). Sous la dénomination de récepteur GABA_A, on désigne un complexe macromoléculaire pentamérique constitué majoritairement des sous-unités α (2), β (2), γ qui, en plus du site de fixation pour le neurotransmetteur GABA, comporte entre autres des sites de fixation aux benzodiazépines (BZD), aux barbituriques et à certains stéroïdes. Il s'agit d'un récepteur-canal perméable aux ions chlorures localisé au niveau des membranes plasmiques des cellules synaptiques du système nerveux central (figure 2) (Papadopoulos *et al.*, 1993). L'interaction entre les BZD et le récepteur GABA_A entraîne des actions physiologiques anticonvulsives et anxiolytiques (Biggio *et al.*, 1990 ; Luddens et Korpi., 1995). Karle *et al.* (1998) ont mis en évidence qu'une déficience de transmission GABAergique serait étroitement liée à l'apparition de crise d'épilepsie.

II.2. Activité d'un l'hydrolysate tryptique de caséine α_{s1} bovine

Miclo *et al.* (2001) ont étudié *in vivo* les effets d'un hydrolysate tryptique de caséine α_{s1} injecté par voie intrapéritonéale à des rats Wistar. Après injection de l'hydrolysate à 3 mg/kg, la réduction des crises d'épilepsie (diminution de la sévérité, de la durée, augmentation de la latence de début de crise) induites par le pentylène-tétrazole chez des rats Wistar suggère une

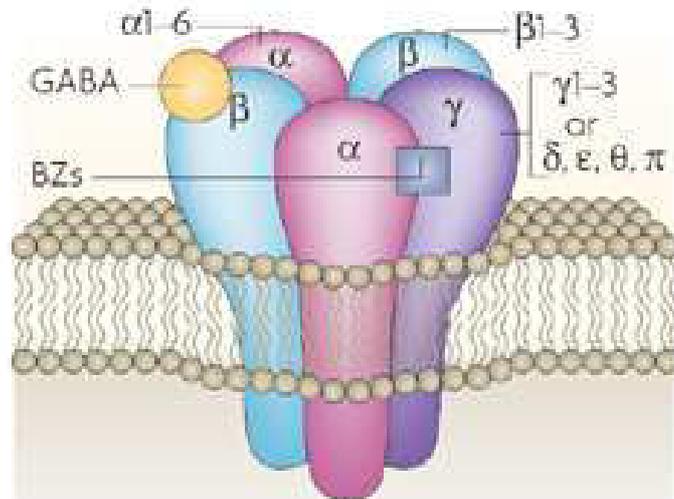


Figure 2 : Représentation du récepteur hétéropentamérique $GABA_A$ membre de la famille des récepteurs-canaux (ionotrope). Cinq sous-unités des 7 sous-unités α , β , γ , δ , ϵ , θ , et π forment le canal hétéropentamérique perméable au ions Cl^- . Le neurotransmetteur GABA se lie à l'interface entre les sous-unités α et β et provoque l'ouverture du canal ionique central permettant l'entrée d'ions chlorures dans la cellule nerveuse. Les benzodiazépines (BZs) se fixent à l'interface entre les sous unités α (1, 2, 3 ou 5) et γ (d'après Jacob *et al.*, 2008).

action directe d'un ou des constituants de l'hydrolysate avec le site benzodiazépine du récepteur GABA_A.

Des études comportementales effectuées avec le labyrinthe en croix surélevé (Pellow *et al.*, 1985) et le test de l'enfouissement défensif conditionné (Treit *et al.*, 1981), révèlent chez des rats Wistar une activité anxiolytique de l'hydrolysate administré par voie intra péritonéale à 3 mg/kg (Miclo *et al.*, 2001). Les activités anxiolytique et anticonvulsante de l'hydrolysate appuient une action d'un ou de plusieurs fragment(s) sur le site BZD du récepteur GABA_A.

Un produit fabriqué industriellement (Lactium®), correspondant à un hydrolysate tryptique de caséine α_{s1} bovine a été étudié chez l'animal. L'administration orale de cet hydrolysate rétablirait la qualité du sommeil (à ondes longues et sommeil paradoxal) perturbé par un stress modéré chez le rat (Guesdon *et al.*, 2006). Chez le chat et le chien, ce même hydrolysate apporte un effet positif dans la gestion de désordres anxieux comme les phobies sociales (Beata *et al.*, 2007 a et b). Ces études constatent les effets anxiolytiques de l'hydrolysate industriel mais n'apportent pas d'élément supplémentaire sur son mode d'action.

Le Lactium® exerce également son activité biologique chez l'Homme. La prise orale quotidienne de 1,2 g du produit encapsulé, en trois fois, par des sujets avant une situation stressante diminue significativement l'augmentation de la pression artérielle engendrée par le stress (Messaoudi *et al.*, 2005). Une étude récente montre que la prise orale de Lactium® encapsulé à la dose de 150 mg/jour pendant 30 jours chez des femmes volontaires réduit significativement les symptômes digestifs, cardiovasculaires, émotionnels, intellectuels et sociaux induits par le stress (Kim *et al.*, 2007).

II.3. L' α -casozépine

II.3.1. Etudes *in vitro*

Les actions anxiolytique et anticonvulsivante passent habituellement par une régulation du récepteur GABA_A. C'est pourquoi des études ont été effectuées pour savoir si un peptide de l'hydrolysate est capable d'interagir avec le site BZD du récepteur GABA_A.

L'ensemble des peptides présents dans l'hydrolysate a été collecté, caractérisé et testé *in vitro* en compétition avec une molécule marquée, le méthyl-[³H] flunitrazepam sur le site BZD du récepteur GABA_A. Un seul fragment peptidique a donné des résultats significatifs, le fragment YLGYLEQLLR (1267,49 Da), correspondant au fragment 91-100 de la caséine α_{s1}

et nommé α -casozépine (Miclo *et al.*, 2001). Son affinité pour le site BZD du récepteur GABA_A est de 88 μ M. Ce peptide ne présente pas d'affinité pour le récepteur mitochondrial aux BZD. Les auteurs ont constaté que l' α -casozépine de synthèse présente une affinité 4 fois moins bonne pour le site BZD du récepteur GABA_A que le peptide naturel purifié à partir de l'hydrolysat trypsique de CN α s₁ bovine. Cependant, aucune hypothèse ne permet actuellement d'expliquer cette différence.

II.3.2. Etudes *in vivo*

Lors du test comportemental d'enfouissement défensif conditionné réalisé chez des rats Wistar, l' α -casozépine injectée par voie intrapéritonéale à 0,4 mg/kg (0,32 μ mol/kg) conduit à des résultats similaires à ceux obtenus avec le diazépam à 1 mg/kg (3,5 μ mol/kg) (Miclo *et al.*, 2001).

II.3.3. Relation structure-fonction

La conformation de l' α -casozépine examinée par résonance magnétique nucléaire et dichroïsme circulaire dans un milieu micellaire SDS montre que les résidus 93 à 99 adoptent une structure amphiphile en hélice 3_{10} initiée et terminée par un tour α (figure 3). Cette structure hélicoïdale est stabilisée par des interactions ioniques entre la fonction guanidium du résidu d'arginine 100 et les groupements carboxyliques des résidus d'acide glutamique 96 et d'arginine 100. Dans cette structure obtenue dans des conditions expérimentales spécifiques, les deux cycles aromatiques des résidus de tyrosine 91 et 94 de l' α -casozépine adoptent une disposition similaire aux noyaux aromatiques du nitrazépam en structure cristalline, molécule de la famille des benzodiazépines (Lecouvey *et al.*, 1997). Ainsi, les parties amino-terminale et carboxy-terminale de l' α -casozépine semblent être cruciales pour permettre l'activité benzodiazépine-mimétique.

III. LA BIODISPONIBILITE DES PEPTIDES AU SEIN DE L'ORGANISME APRES ADMINISTRATION ORALE

Il existe deux barrières principales à l'efficacité des peptides à activité après l'administration par voie orale, la barrière physique localisée au niveau de l'épithélium intestinal et en amont,

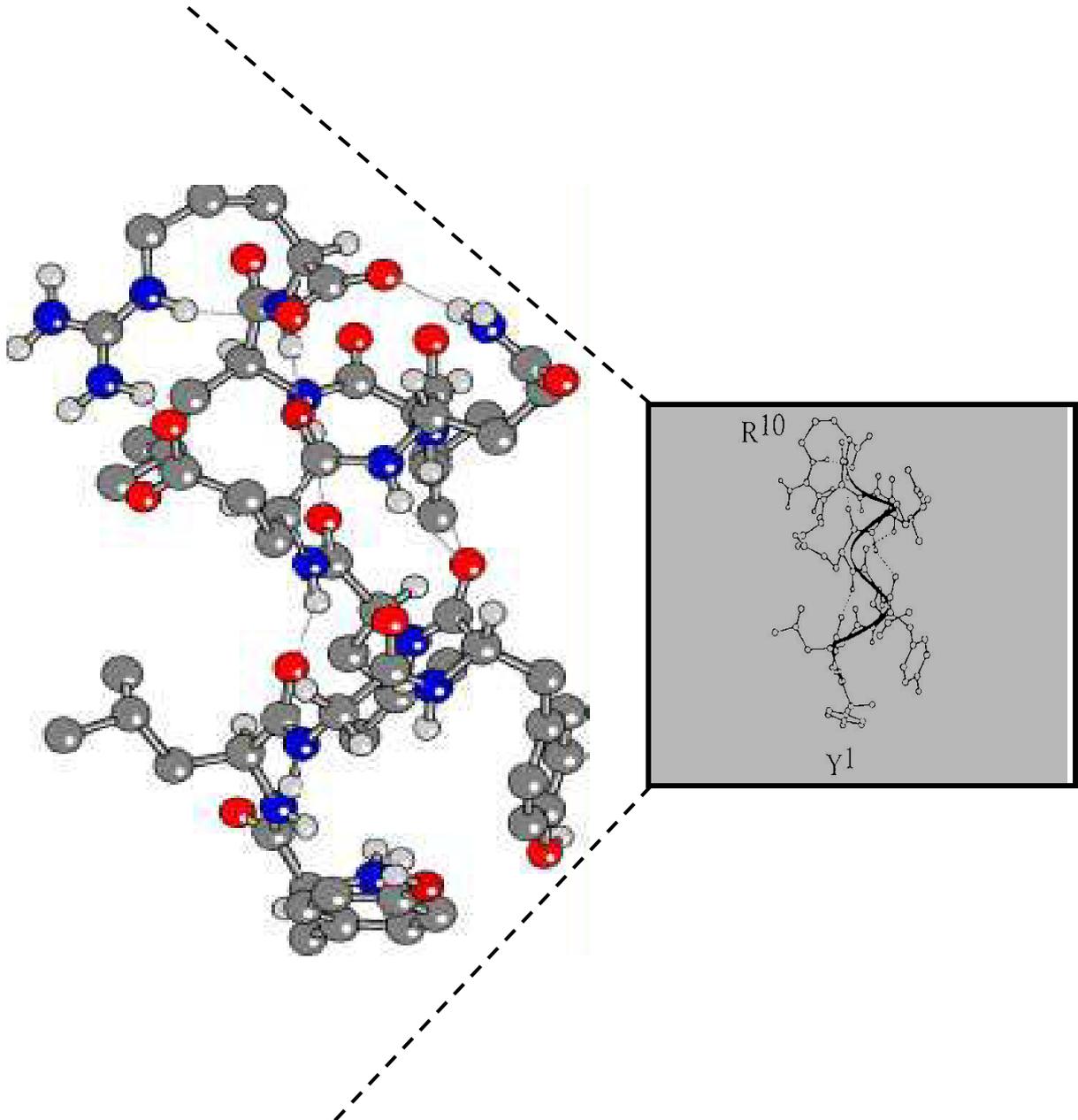


Figure 3 : Conformation moyenne adoptée par l'α-casozépine en milieu micellaire SDS.

Les résidus G³ à L⁹ adoptent une structure amphiphile en hélice 3₁₀ initiée et terminée par un tour α (Lecouvey *et al.*, 1997).

la barrière enzymatique qui débute au niveau stomacal et se poursuit dans la lumière intestinale avec les enzymes pancréatiques et intestinales (Zhou, 1994).

III.1. Le tractus gastro-intestinal, barrière enzymatique

III.1.1. Impact des protéases et peptidases du tractus gastro-intestinal sur les peptides exogènes

III.1.1.1. Digestion gastrique

La pepsine (EC 3.4.23.1), enzyme du suc gastrique est synthétisée sous forme de pepsinogène (proenzyme inactif) ; le pepsinogène est stocké dans les vésicules enzymatiques des cellules principales du fundus, d'où il est sécrété au moment de la digestion. L'activation du pepsinogène en pepsine est initialement le résultat d'une hydrolyse par l'acide chlorhydrique libéré par les cellules pariétales de la muqueuse gastrique puis celui d'une autoactivation. La pepsine a une activité optimum dans l'estomac à un pH compris entre 1,8 et 4,4. Puis elle est inactivée au niveau du duodénum par une augmentation de pH provoquée par le contenu en ions bicarbonates du suc pancréatique. Elle est la première protéase en contact avec les peptides administrés *per os*. Cette endoprotéase hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles un résidu d'acide aminé aromatique engage sa fonction amine (<http://www.brenda-enzymes.info/>). Les peptides bioactifs, et plus précisément ceux constitués de 4 à 7 résidus d'acide aminé, semblent être résistants à l'hydrolyse par la pepsine *in vitro* (Roufik *et al.*, 2005). Des peptides de moins de 10 résidus d'acide aminé ne sont pas substrats de la pepsine. En effet, la pepsine est une endoprotéase et l'hydrolyse de liaisons peptidiques proches du résidu carboxy- ou amino- terminal dans le cas des peptides courts, est défavorisée. De même l'état d'ionisation des groupements $\alpha\text{-NH}_2$ et $\alpha\text{-COOH}$ à pH supérieur à 2,5 n'est pas favorable à l'hydrolyse.

III.1.1.2. Digestion par les enzymes pancréatiques

Après le passage gastrique, les enzymes pancréatiques interviennent au niveau du duodénum avec l'action de la trypsine (EC 3.4.21.4), de l' α -chymotrypsine (EC 3.4.21.1) et de l'élastase (EC 3.4.21.36) qui sont des endopeptidases à sérine, ainsi que des carboxypeptidases A (EC 3.4.17.1) et B (EC 3.4.17.2), qui sont des exopeptidases. L' α -chymotrypsine hydrolyse

principalement les liaisons peptidiques impliquant la fonction carboxylique des résidus d'acide aminé telles que F-Xaa, W-Xaa et Y-Xaa, tandis que la trypsine clive des liaisons impliquant la fonction carboxylique de résidus basiques R-Xaa et L-Xaa. L'élastase est plus spécifique des liaisons peptidiques impliquant des résidus d'acide aminé aliphatiques non branchés tels que A-Xaa (<http://www.brenda-enzymes.info/>).

Les fragments peptidiques résultant de l'action des endopeptidases peuvent ensuite être hydrolysés par des exopeptidases. Les carboxypeptidases A et B hydrolysent respectivement les résidus carboxy-terminaux aliphatiques ou aromatiques et basiques, (<http://www.brenda-enzymes.info/>). Ainsi, les peptides issus d'une hydrolyse tryptique vont contenir des résidus de lysine ou d'arginine en position carboxy-terminale et devenir des substrats pour la carboxypeptidase B (Folk et Gladner, 1960). L'action de l' α -chymotrypsine génère principalement des peptides ayant un résidu aromatique en position carboxy-terminale qui est ensuite reconnu par la carboxypeptidase A.

D'une manière générale les peptides bioactifs constitués de plus de 3 ou 4 résidus d'acide aminé peuvent être des substrats potentiels des enzymes pancréatiques. Les peptides inférieurs à 4 résidus d'acide aminé ou les peptides contenant des résidus de proline pourraient présenter une certaine résistance à ces enzymes.

III.1.1.3. Les peptidases de la bordure en brosse

La bordure en brosse des entérocytes contient des peptidases actives qui constituent un obstacle important au passage des peptides bioactifs, dans une forme intacte, au travers de l'épithélium intestinal (Crampton *et al.*, 1973 ; Fricker et Drewe, 1995 ; Pauletti *et al.*, 1996 et 1997a et b). Une quinzaine de peptidases de la bordure en brosse ont été clairement caractérisées chez l'Homme (tableau 4 ; Bernkop-Schnürch 1998).

Trois classes de peptidases sont localisées au niveau des microvillosités : des endopeptidases, des exopeptidases (aminopeptidases et carboxypeptidases) et des peptidyl-dipeptidases et dipeptidyl-peptidases (Tobey, 1985).

Parmi les exopeptidases, les aminopeptidases sont les plus nombreuses et sont capables d'hydrolyser des liaisons peptidiques impliquant un résidu de proline, ce résidu conférant aux peptides une certaine résistance à l'hydrolyse par les protéases pancréatiques (Woodley, 1994). Malgré l'importance de cette barrière enzymatique, le passage intacts de peptides à activité biologique reste probable, mais celui-ci serait très faible (proche de 1 à 5 %).

Tableau 4: Spécificité de coupure des peptidases présentes au niveau de la bordure en brosse des entérocytes caractérisées chez l'homme (<http://www.brenda-enzymes.info/> ; Woodley, 1994).

<i>Enzymes</i>	<i>Site de clivage</i>	<i>Spécificité Source « Brenda »</i>	<i>Spécificité Source Woodley (1994)</i>
Leucyl aminopeptidase Aminopeptidase A <i>EC3.4.11.1</i>	H ₂ N Xa-Xb XXXCOOH	Xa : Leu ou autres dont Pro , mais pas Arg ou Lys Xb peut être Pro	-
Glutamyl aminopeptidase Aminopeptidase A <i>EC3.4.11.7</i>	H ₂ N Xa-Xb XXXCOOH	Xa : Glu	Xa : Glu
Aspartyl Aminopeptidase, Aminopeptidase A <i>EC3.4.11.21</i>	H ₂ N Xa-Xb XXXCOOH	Xa : Asp	Xa : Asp
Aminopeptidase M, Membrane alanyl aminopeptidase, Aminopeptidase N <i>EC3.4.11.2</i>	H ₂ N Xa-Xb XXXCOOH	Xa : Ala, Leu ou autres Si Xb : Pro et Xa résidu hydrophobe, alors XaXb dipeptide libéré	Xa : Ala, Leu ou autres
Aminopeptidase P <i>EC3.4.11.9</i>	H ₂ N Xa-Xb XXXCOOH	Xa : Pro Si Xb : Pro , XaXb dipeptide libéré	Xa : Pro
Aminopeptidase W <i>EC3.4.11.16</i>	H ₂ N Xa-Xb XXXCOOH	Xa : Glu, Leu ou autres à condition que Trp, Phe ou Tyr avant dernier résidu	Xa : Trp, Tyr, Phe
γ-Glutamyl Transpeptidase <i>EC2.3.2.2</i>	H ₂ N Xa-Xb XXXCOOH	Xa : Acide γ-glutamique	Xa : Acide γ-glutamique
Dipeptidyl peptidase IV <i>EC3.4.14.5</i>	H ₂ N XXa-Xb XXCOOH	Xa : Pro Xb : ≠ Pro	Xa : Pro, Ala
Peptidyl Dipeptidase A <i>EC3.4.15.1</i>	H ₂ N XXX-XaXb COOH	Xa : ≠ Pro Xb : ≠ Asp, Glu	XaXb : His-Leu
Carboxypeptidase M <i>EC3.4.17.12</i>	H ₂ N XXXXXb-Xa COOH	Xa : Lys, Arg	Xa : Lys, Arg
Carboxypeptidase P <i>EC3.4.17.16</i>	H ₂ N XXXXXb-Xa COOH	Xa : Pro ou autres	Xa : Pro, Gly, Ala
γ-Glutamyl Carboxypeptidase <i>EC3.4.17.11</i>	H ₂ N XXXXXb-Xa COOH	Xa : Acide γ-glutamique	Xa : Acide γ-glutamique
Endopeptidase 24-11 Néprilysine <i>EC3.4.11.24</i>	H ₂ N XXb-Xa XXCOOH	Xa : Résidu hydrophobe Particulièrement Phe et Tyr	Xa : Résidu hydrophobe Ala, Val, Phe, Leu, Ile, Met
Endopeptidase 24-18 Méprine A <i>EC3.4.24.18</i>	H ₂ N XXXXb-Xa XCOOH	Xa : Résidu hydrophobe	Xa : Résidu aromatique Phe, Tyr, His, Trp
Entéropeptidase <i>EC3.4.21.9</i>	H ₂ N XXa-Xb XXCOOH	Xa : (Lys)₆ Xb : Ile	Xa : (Asp)₄-Lys

Ainsi, la perte d'activité *in vivo* de certains peptides actifs *in vitro*, pourrait s'expliquer par une dégradation partielle ou totale par les peptidases de la bordure en brosse (Lee *et al.*, 1991).

III.1.1.4. Les peptidases intracellulaires

Si certains peptides bioactifs d'origine alimentaire traversent la membrane apicale des entérocytes, ils se trouvent confrontés aux peptidases contenues dans le cytosol ; celles-ci ont cependant plus d'affinité pour les dipeptides que pour les oligopeptides.

Toutefois, certains peptides ou protéines pénètrent dans les entérocytes par endocytose. La membrane plasmique apicale forme alors des invaginations qui internalisent le peptide ou la protéine et les véhiculent à travers l'entérocyte. Fréquemment les lysosomes contenus dans le cytosol fusionnent avec ces vésicules d'endocytose et les peptidases contenues dans ces lysosomes sont alors responsables de la dégradation *in fine* du peptide ou de la protéine (Caillard et Tomé, 1995).

L'administration par voie orale de peptides à activité biologique se heurte très souvent à des problèmes de biodisponibilité de ces peptides dans leur configuration active. Il est donc important de connaître le degré de dégradation des peptides destinés à une administration *per os* par les principales enzymes du tractus digestif.

Pour atteindre une cible physiologique située au niveau central ou périphérique, un peptide bioactif doit encore franchir la barrière physique formée par l'épithélium intestinal, ce qui lui permettra de rejoindre le compartiment central.

III.2. L'épithélium intestinal, barrière physique

L'épithélium intestinal est une barrière protégeant l'organisme des agents potentiellement délétères présents dans la lumière intestinale. Il est constitué par un ensemble de cellules hautement différenciées et hautement spécialisées, en renouvellement constant et présentant une polarité structurale et fonctionnelle. Cet épithélium est capable d'absorber, de façon sélective, les substances nutritives contenues dans la lumière intestinale, de les transformer, et de les délivrer aux réseaux sanguins et lymphatiques.

III.2.1. Composition cellulaire et rôle de l'épithélium intestinal

L'intestin grêle joue un rôle majeur dans la fonction d'absorption. Ses différentes parties anatomiques sont le duodénum (0,25 m chez l'Homme), le jéjunum (2,5 m), et l'iléon (3,5 m). Il est constitué d'une paroi intestinale qui se divise en quatre couches histologiques : la séreuse, qui n'est autre que le feuillet viscéral du péritoine, la musculuse avec la couche longitudinale externe et la couche circulaire interne de fibres musculaires lisses, la sous-muqueuse conjonctivo-vasculaire et la muqueuse. Cette muqueuse est composée de la musculaire muqueuse, d'un tissu conjonctif de maintien, la *lamina propria* et de l'épithélium intestinal qui borde la lumière intestinale (figure 4). L'épithélium qui borde la lumière intestinale est constitué de différents types cellulaires assurant essentiellement des fonctions d'absorption. Cette absorption est favorisée par la présence de villosités et microvillosités qui augmentent fortement la surface de contact entre la lumière intestinale et l'épithélium.

L'épithélium intestinal est un système dynamique, doté de capacités de renouvellement et de différenciation, constitué à 90 % de cellules épithéliales : les entérocytes. Ces cellules, qui sont le siège des mécanismes de digestion et d'absorption des différents nutriments, sont très polarisées (figure 5). Au pôle apical, l'enchaînement des cellules entérocytaires constitue la bordure en brosse au niveau de laquelle sont exprimés des systèmes de transport (d'acides aminés, de di- et de tripeptides, d'oses, d'acides gras) et des hydrolases (principalement de type disaccharidase et peptidases). Les jonctions serrées situées entre les cellules au niveau apical constituent une barrière semi-perméable entre la lumière intestinale et la lame basale, ces jonctions autorisent le transport d'eau, d'électrolytes et des petites molécules hydrophiles (inférieures à 15 nm). Les desmosomes localisés au niveau baso-latéral assurent la cohésion des cellules entre elles. Cette polarité est maintenue par les mécanismes de transcytose des protéines de structures et enzymatiques (Mostov *et al.*, 1992). La membrane apicale de l'entérocyte supporte une fine couche de 0,1 à 0,5 μm d'épaisseur formée de glycoprotéines, protéoglycanes, glycolipides, polysaccharides (dont de l'hyaluronane) : le glycocalix (Ito, 1965 ; Ugolev *et al.*, 1979). Chez l'Homme, cette structure forme un réseau dont la taille des mailles a été estimée à 80 nm, à l'intérieur duquel les enzymes pancréatiques actives s'enchâssent (Ito, 1969). Il contient de nombreuses charges négatives capables d'attirer ou de repousser certaines molécules de/ou vers la lumière intestinale. Le glycocalix apparaît donc comme une barrière enzymatique et physique supplémentaire pouvant s'opposer au transfert des peptides. Aoki *et al.* (2005) ont montré que la présence de glycocalix favorise la

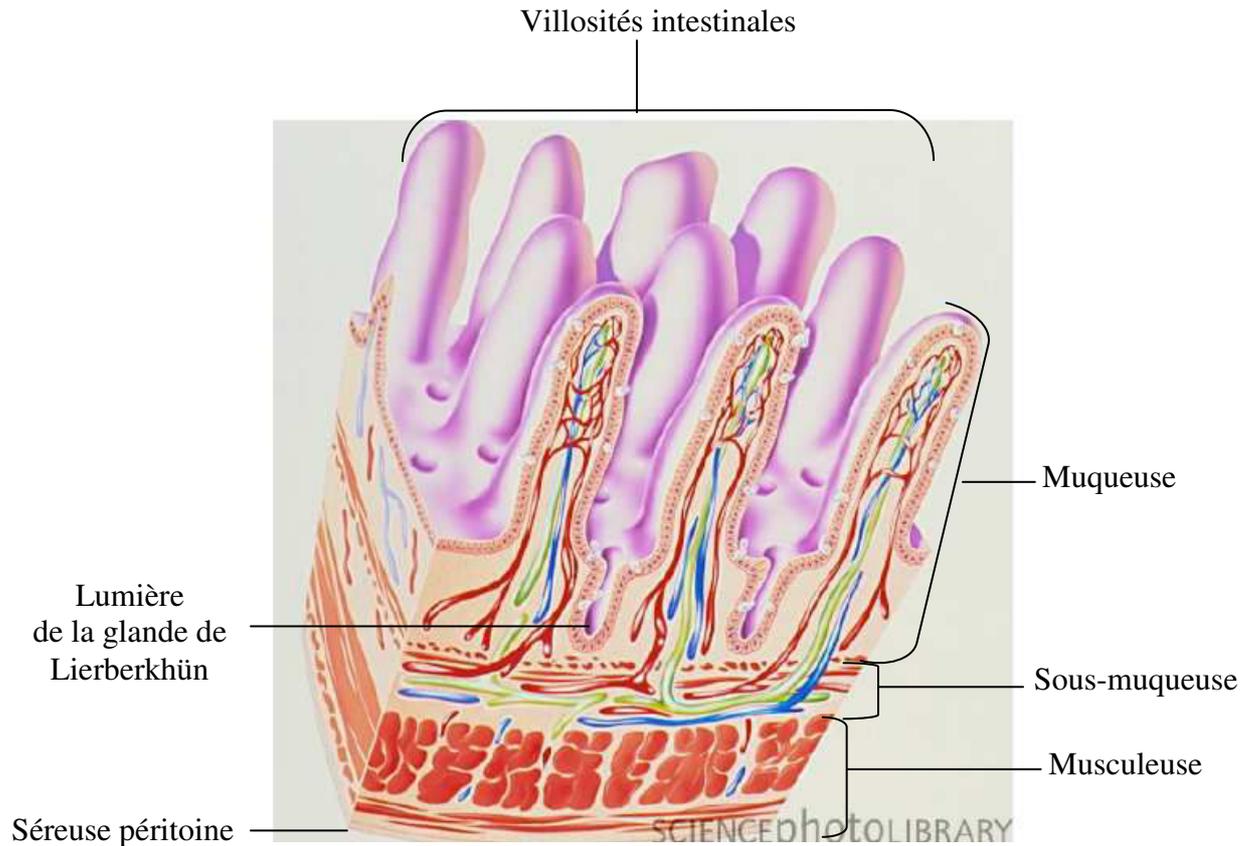


Figure 4 : Coupe histologique de l'intestin grêle.

L'intestin grêle est constitué de quatre couches histologiques : la séreuse, qui correspond au feuillet viscéral du péritoine, la musculeuse avec la couche longitudinale externe et la couche circulaire interne de fibres musculaires lisses, la sous-muqueuse conjonctivo-vasculaire et la muqueuse. Cette muqueuse est composée de la musculaire muqueuse, d'un tissu conjonctif de maintien, la *lamina propria* et de l'épithélium intestinal qui borde la lumière intestinale (d'après le site :

<http://www.exobiologie.info/SVT/page18/page22/files/digestion%20troisieme.pdf>).

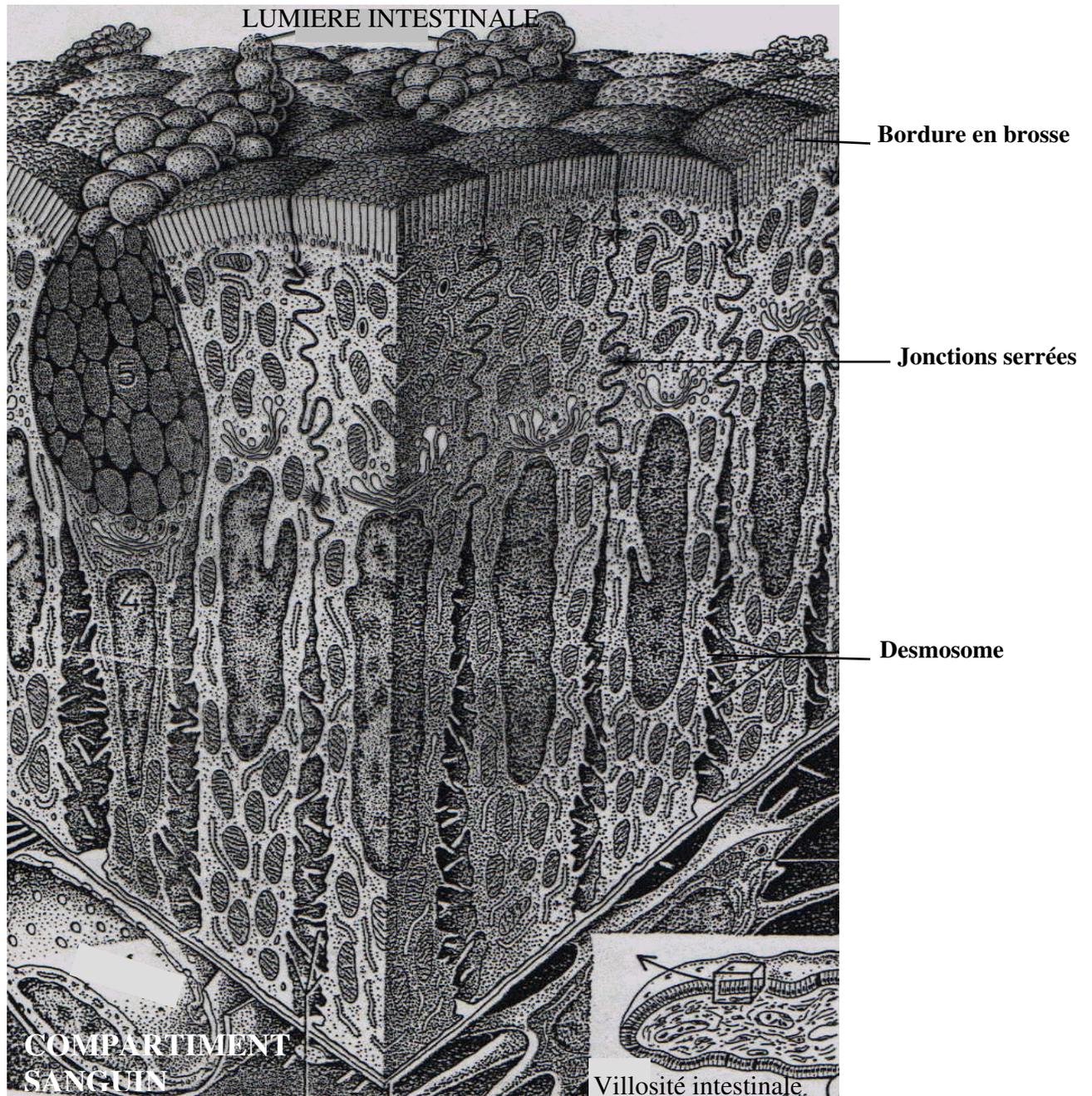


Figure 5 : L'épithélium intestinal.

L'épithélium intestinal est constitué à 90 % d'entérocytes. Ces cellules sont le siège des mécanismes de digestion et d'absorption des différents nutriments. Au pôle apical, l'enchaînement des cellules entérocytaires constitue la bordure en brosse. Les jonctions serrées situées entre les cellules au niveau apical constituent une barrière semi-perméable entre la lumière intestinale et la lame basale. Les desmosomes localisés au niveau basolatéral assurent la cohésion des cellules entre elles. Cette polarité est maintenue par les mécanismes de transcytose des protéines de structures et enzymatiques (N. Vacheret, UCB Lyon).

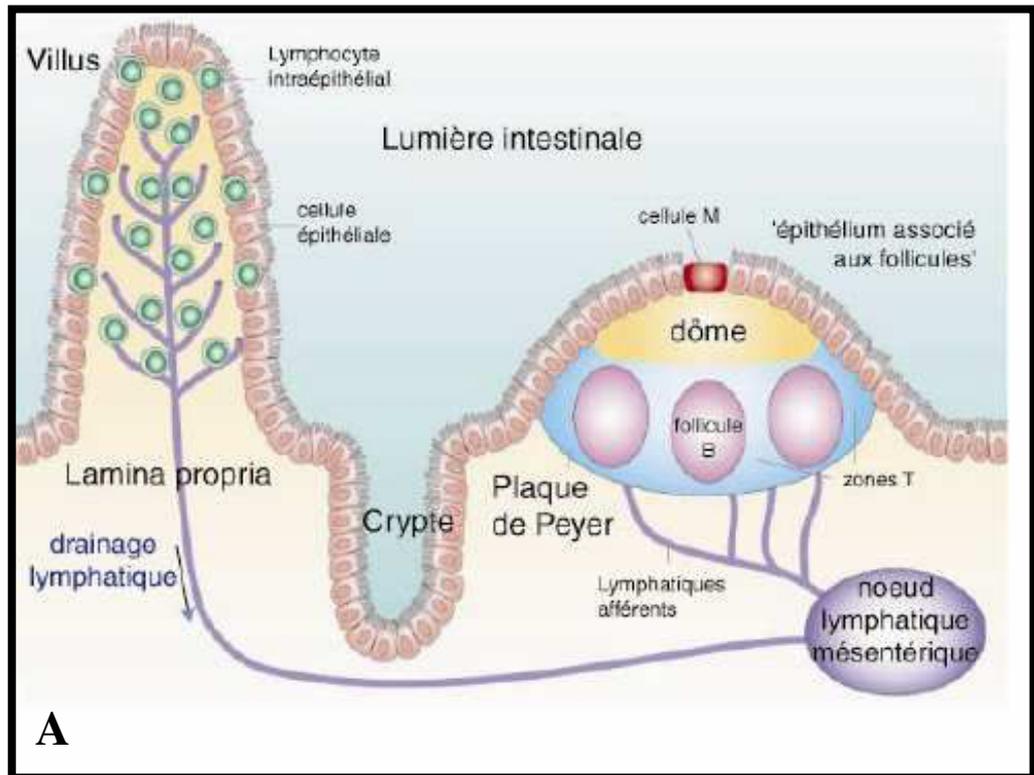
dégradation de l'insuline par les enzymes pancréatiques qui y sont enchâssées, mais qu'après un traitement de celui-ci par la hyaluronidase, qui dégrade le glyco-calix sans endommager l'intégrité de la membrane, l'insuline semblerait être mieux absorbé au niveau de l'iléon.

Les cellules caliciformes, autre type cellulaire représentant 5 % des cellules de l'épithélium intestinal, sont responsables de la sécrétion du mucus. Ce mucus forme un hydrogel qui constitue un revêtement protecteur de l'épithélium et influence l'absorption de certains nutriments. Les peptides peuvent interagir avec certains composants du mucus (Larhed *et al.*, 1998).

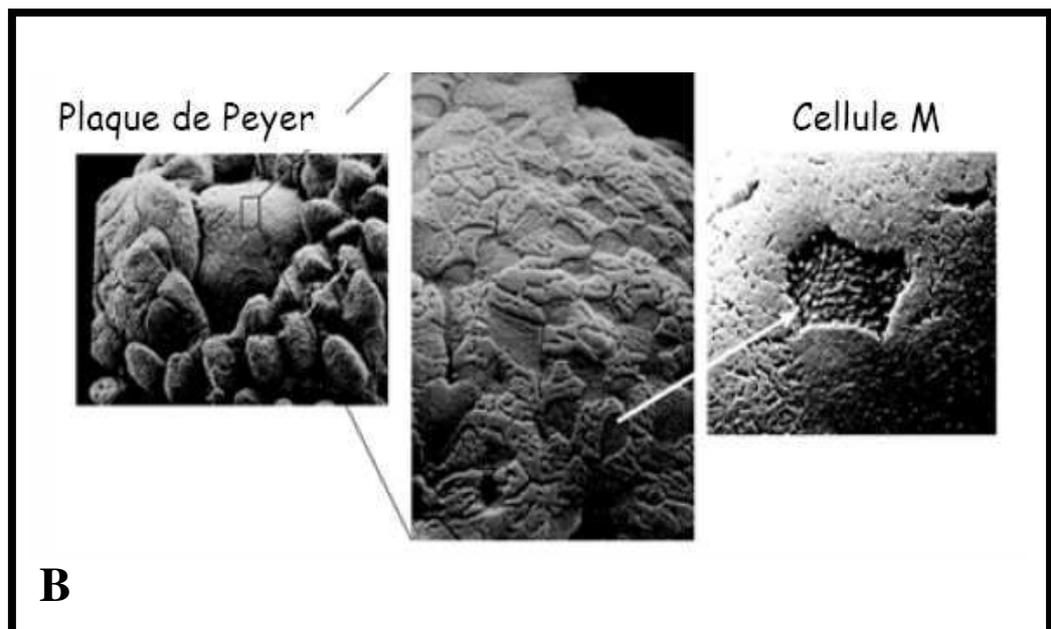
Les cellules entéro-endocrines représentent une population très hétérogène et sont responsables de la synthèse des peptides hormonaux gastrine, somatostatine, sécrétine, cholécystokinine (CCK), VIP (peptide intestinal vasoactif), GIP (peptide inhibiteur gastrique), substance P, bombésine, entéroglucagon. Ces facteurs hormonaux interviennent sur la régulation des fonctions d'absorption et de sécrétion, du débit sanguin et de la motilité intestinale.

Les cellules de Paneth sont de volumineuses cellules glandulaires situées au fond des cryptes de Lieberkühn de l'intestin grêle. Elles limitent la prolifération des bactéries présentes au niveau des cryptes en déversant dans la lumière intestinale des substances antimicrobiennes (en particulier du lysozyme, de la phospholipase A2 et plusieurs peptides de la famille des défensines), contenues dans leurs nombreuses vésicules de sécrétion.

Les plaques de Peyer (figure 6) représentent des zones tissulaires constituées de follicules lymphoïdes recouverts par un épithélium particulier : l'EAF pour épithélium associé aux follicules lymphoïdes, fonctionnellement différent de l'épithélium intestinal normal, au sens où cet épithélium a perdu la plupart des fonctions digestives et des fonctions de défense antibactérienne. Il permet, entre autres, l'accès des micro-organismes. Cet épithélium contient des cellules M dépourvues de peptidases ayant un rôle important : elles séparent la lumière intestinale des follicules lymphoïdes muqueux et permettent à certains microorganismes ou macromolécules d'être transportés, par transcytose, de la lumière intestinale jusqu'aux follicules lymphoïdes (Kraehenbuhl et Neutra, 1992 ; Neutra *et al.*, 1996). Beaucoup de pathogènes infectant leur hôte *via* le tractus intestinal vont utiliser de façon opportuniste les cellules M pour franchir la barrière intestinale.



A



B

Figure 6 : Structure d'une plaque de Peyer constituée notamment de cellule M.

A : Schéma d'une coupe transversale de l'épithélium intestinal.

B : Plaque de Peyer et agrandissement des cellules M, obtenues par microscope électronique à balayage (d'après le site : <http://www.chups.jussieu.fr>).

III.2.2. Les différentes voies d'absorption des peptides à travers l'épithélium intestinal

En 1982, Gardner met en évidence le passage de protéines intactes au travers de l'épithélium intestinal et contredit ainsi le dogme indiquant jusque-là que toutes les protéines étaient digérées sous forme d'acides aminés ou de di- et tripeptides. Il est désormais irréfutable qu'une petite quantité de peptides et protéines intactes peuvent entrer dans la circulation sanguine dans des conditions physiologiques normales.

L'absorption des nutriments, des peptides thérapeutiques et des peptides à activités biologiques est désormais considérée comme étant un processus dynamique complexe de transfert au travers des cellules absorbives de la muqueuse.

En fonction des propriétés physico-chimiques des peptides et protéines, coefficient de partition, masse moléculaire, encombrement stérique, solubilité, stabilité chimique, distribution des charges, liaisons hydrogène, pH isoélectrique, caractère hydrophile, intrinsèquement liées à la composition en résidus d'acides aminés, différents systèmes de transfert interviennent : diffusion passive para- et transcellulaire, processus de transport actif au travers des cellules épithéliales médiés ou non par des récepteurs spécifiques situés à la surface apicale des entérocytes.

Dès les années 1970, il a été mis en évidence que les di- et tripeptides sont activement transportés au travers de la muqueuse intestinale par des systèmes de récepteurs distincts de ceux spécifiques du transport des acides aminés (Ganapathy et Leibach, 1983 et 1985 ; Matthews, 1975 ; Matthews et Payne, 1980). Par la suite, des travaux ont permis la caractérisation d'un type de récepteur H⁺-dépendant nommé PepT1 localisé au niveau de la membrane apical des entérocytes (du duodénum au jéjunum) et responsable du transport des di- et tripeptides (Bai et Amidon, 1992 ; Brandsch *et al.*, 2004 ; Dantzig et Bergin, 1988 ; Dantzig *et al.*, 1994 ; Freeman *et al.*, 1995).

Un autre type de transporteur de peptides a été mis en évidence chez l'homme : OATPs pour « organic anion-transporting polypeptides » et chez le rongeur (Oatps) permettant le transport de substrats tels que les sels biliaires, les stéroïdes, les hormones thyroïdiennes et les oligopeptides anioniques (Hagenbuch et Meier, 2003 ; Kullak-Ublick *et al.*, 2001 ; Zaïr *et al.*, 2008). Certains variants génétiques des OATPs, OATP2B1 notamment, ont été localisés au niveau des membranes apical des entérocytes du duodénum (Kobayashi *et al.*, 2003).

Un système d'efflux polarisé (glycoprotéine P) enchâssé dans la membrane apicale des entérocytes est capable d'excréter vers le lumen, contre leur gradient de concentration, une

grande quantité de di- et tripeptides absorbés. Ce système représente donc une barrière supplémentaire de l'absorption peptidique du lumen vers le système sanguin (Fricker et Drewe, 1995).

III.2.2.1. La voie paracellulaire

La voie paracellulaire est surtout perméable aux petits électrolytes car les jonctions serrées formées entre les cellules ne permettent pas dans des conditions physiologiques normales, en théorie, le passage de molécules hydrophiles de taille importante et de molécules hydrophobes (Diamond, 1977). La morphologie et la régulation de ces jonctions serrées ont récemment été étudiées en détail. Au niveau de ces jonctions serrées des protéines cytosoliques les occludines, ont été mises en évidence (Anderson et Van Itallie, 1989 ; Ando-Akatsuka *et al.*, 1996 ; Saitou *et al.*, 1997). Ces protéines interagissant avec d'autres protéines transmembranaires : les claudines (Furuse *et al.*, 1998 ; figure 7) et trois autres types de protéines cytosoliques associées aux jonctions serrées (TJPAs en Anglais pour Tight Junction Associated Proteins), ZO-1, ZO-2, ZO-3 (Stevenson *et al.*, 1986 ; Fanning *et al.*, 1998). Toutes ces protéines interagissent entre elles et avec les filaments du cytosquelette des entérocytes. Tout ceci suggère qu'une jonction serrée est un système très complexe régulé par un grand nombre d'interactions protéines-protéines pouvant entraîner des modifications de perméabilité. Toutes ces observations ont été mises en évidence *in vitro* avec le modèle Caco-2 (Hochman, 1994) et *in vivo* chez le rat (Wittchens *et al.*, 1999). La voie paracellulaire ne comporte pas de système protéolytique, l'espace intercellulaire étant dépourvu de peptidases, ce qui présente un intérêt majeur pour la biodisponibilité de peptides (Lee *et al.*, 1991). Pour Burton *et al.* (1987), cette voie de passage entre les entérocytes en milieu aqueux, ne peut être employée que par les peptides plutôt hydrophiles de petite taille (rayon inférieur à 11-15 nm) tels les di- et tripeptides chargés négativement ou positivement. Satake *et al.* (2002) ont mis en évidence, sur le modèle Caco-2, le passage intact du tripeptide Val-Pro-Pro (peptide inhibiteur de l'ECA) par la voie paracellulaire.

Les caractéristiques physiques et conformationnelles du peptide d'intérêt (taille, structuration linéaire, cyclique ou en feuillet β , charge et caractère hydrophile) influencent le transfert par la voie paracellulaire. Le volume moléculaire est apparemment le paramètre le plus restrictif, des études réalisées avec les peptides modèles d-FG, d-F₂G et d-F₃G ont montré que la

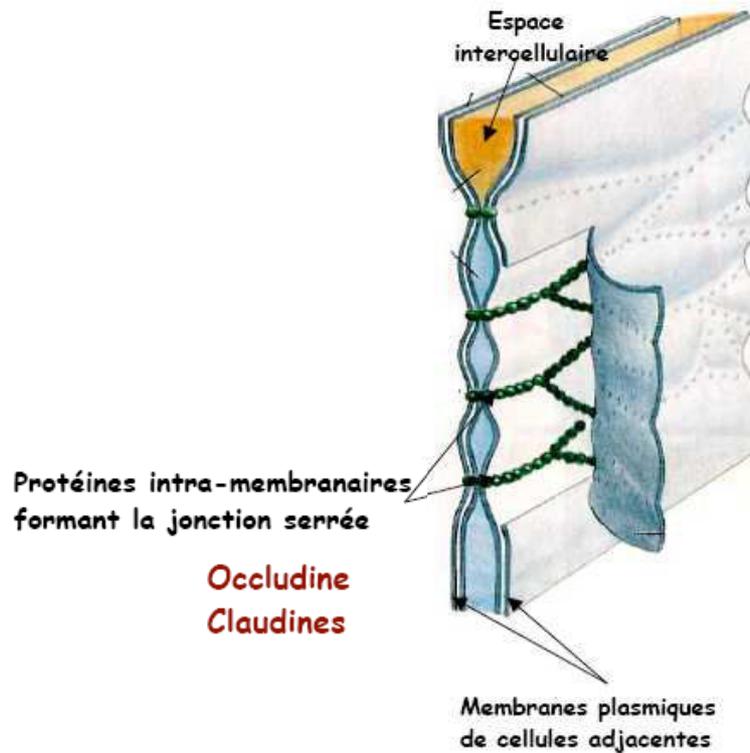


Figure 7 : Jonctions serrées établies entre les cellules entérocytaires. Les jonctions serrées assurent la semi-perméabilité du tapis cellulaire de l'épithélium intestinal. Elles sont constituées notamment de protéines intra membranaires : occludines et claudines. L'espace intercellulaire correspond à la voie paracellulaire (d'après le site : <http://www.chusa.jussieu.fr>).

perméabilité diminue avec l'augmentation du rayon moléculaire (Adson *et al.*, 1994). Pour des peptides de même taille (par exemple tripeptides), ceux chargés positivement ou neutres sont plus absorbés que ceux chargés négativement (Pauletti *et al.*, 1996). Cependant, concernant l'implication de la charge de la molécule certaines études sont contradictoires (Burton *et al.*, 1987). Ainsi la taille, entre 8 et 11 nm, et le caractère hydrophile seraient les paramètres favorables à l'absorption *via* la voie paracellulaire. Cette voie ne semble pas être la principale voie de transfert des peptides de taille supérieure à 3 résidus d'acide aminé. Cependant, certains auteurs ont mis en évidence *in vitro*, sur le modèle Caco-2, le passage de peptides tels que le leuprolide (GHWSY-D-LLRP) (Guo *et al.*, 2004), l'octréotide (FCF-D-WKTCT) (Lundin et Artursson., 1990), la TRH (pyro-EHP) (Thwaites *et al.*, 1993) et du fragment HLPLP inhibiteur de l'ECA (Quiros *et al.*, 2008).

Chez le rat, Pappenheimer *et al.* (1994) ont mis en évidence *in vivo* le passage par voie paracellulaire d'un octapeptide composé de résidus d'acide aminé D.

La perméabilité paracellulaire des cellules du modèle Caco-2 peut être augmentée en présence de glucose (Carlson et Madara, 1990 ; D'Souza *et al.*, 2003). En effet la présence de glucose 25 mM induit la production d'intermédiaires oxygénés (reactive oxygen intermediates, ROI) qui agissent sur les filaments d'actine du cytosquelette et entraîne l'altération de la perméabilité des jonctions serrées par le biais des protéines ZO-1. Dans ces conditions, par des mécanismes de flux de solvant, diverses molécules hydrosolubles, acides aminés, peptides et parfois polypeptides, peuvent traverser l'épithélium intestinal.

En résumé, selon la bibliographie, seuls certains peptides, de rayon moléculaire n'excédant pas 15 nm, hydrophiles, peuvent emprunter la voie paracellulaire de transfert du milieu apical vers le milieu basal. L'intérêt de la voie paracellulaire est que le peptide reste intact puisqu'il n'est pas confronté à la protéolyse intracellulaire. C'est pourquoi certains auteurs pensent possible le passage de peptides de grande taille en augmentant la perméabilité paracellulaire.

III.2.2.2. La voie transcellulaire

D'autres mécanismes de transfert de peptides au travers de l'épithélium intestinal empruntent la voie transcellulaire. Il existe trois voies transcellulaires principales empruntées par certains peptides et /ou protéines (Daugherty et Mrsny, 1999).

La diffusion passive peut être un moyen de transfert des peptides, notamment des tétrapeptides, au travers de l'entérocyte, (Kerchner et Geary, 1983). Ce mécanisme d'absorption nécessite que les peptides soient hautement lipophiles pour interagir avec la membrane plasmique. Les invaginations et les mouvements de la membrane plasmique transfèrent ensuite le peptide dans le milieu intracellulaire à l'intérieur duquel il peut être dégradé par les peptidases présentes.

Chez le rat, le passage d'un pentapeptide synthétique la metképhamide (Y-D-A-GNMe-FM-NH₂) par diffusion passive au travers de la bordure en brosse a été mis en évidence par Langguth *et al.* (1994). D'autres auteurs ont mis en évidence *in vivo* le passage intact de la vasopressine, un nonapeptide (CYFEDCPRG) mais sans pouvoir véritablement mettre en évidence le mode de transfert utilisé (Lundin et Vilhardt, 1986 ; Lundin et Artursson, 1990 ; Vilhardt et Lundin., 1986).

Le mécanisme d'endocytose semble plus favorable au transfert de peptides ou protéines intacts du pôle apical vers le pôle basal des entérocytes. C'est un système de transport par internalisation de vésicules formées à partir de la membrane plasmique. Quatre mécanismes d'invagination des membranes ont été décrits : (1) *via* une interaction récepteur/ligand (peptides ou protéines). La présence de protéines de maintien, les clathrines à l'état libre au niveau des villosités permet la formation des complexes clathrine-récepteur-ligand entraînant l'invagination des membranes ; (2) sans complexe clathrine-récepteur-ligand : c'est un phénomène de transcytose adsorptive, endocytose spécifique, pour les molécules présentes en faible concentration ; (3) en phase fluide : c'est un phénomène d'endocytose non spécifique où les vésicules fusionnent ensuite avec les lysosomes, c'est la pinocytose ; (4) les vésicules de transcytose, à la différence des autres types de voie transcellulaire, ne fusionnent pas avec les lysosomes (Pauletti *et al.*, 1996).

Le caséinophosphopeptide β -CN(1-25) fixant le fer est absorbé par endocytose (Pérès *et al.*, 1999). Pantzar *et al.* (1993) mettent en évidence le transfert de peptides de plus de 30kDa au travers des entérocytes. Certains peptides bioactifs ont été détectés dans le plasma et donc seraient capable de franchir la barrière entérocytaire (Maubois et Léonil, 1989 ; Chabance *et al.*, 1998).

La transcytose correspond à un mécanisme cellulaire dont l'importance et la modulation sont encore peu connues. Caillard et Tomé (1995) ont mis en évidence que 5 % de la β -

lactoglobuline et de l' α -lactalbumine placées dans le compartiment apical se retrouvaient intactes dans le compartiment basal du système cellulaire Caco-2, différencié en monocouche épithéliale, mettant ainsi en évidence un mécanisme de transcytose (figure 8). Lors de l'étude du transfert au travers de l'épithélium intestinal d'une série d'oligopeptides, Shimizu *et al.* (1997) ont mis en évidence le passage de la bradykinine (RPPGFSPFR), peptide résistant aux peptidases de la bordure en brosse, du pôle apical vers le pôle basal de cellules Caco-2 par un mécanisme de transcytose adsorptive.

D'autres protéines telles que l'albumine, et certaines immunoglobulines pourraient passer au travers de l'épithélium intestinal pour atteindre le sang par des systèmes d'endocytoses médiés par des récepteurs (Shen *et al.*, 1992). Chez le rat, le passage par les deux voies paracellulaire et transcellulaire d'un tétrapeptide synthétique cationique couplé à une molécule fluorescente, nommé 001-C8-NBD (H-Me-Y-R-Me-R-D-L-NH(CH₂)₈NH₂-4-nitrobenzo-2oxa-1,3-diazole) a été mis en évidence. Cependant l'étude *in vitro*, sur le modèle cellulaire Caco-2, de ce même peptide, n'a mis en évidence que le passage par transcytose adsorptive (Sai *et al.*, 1998).

Un autre système de transfert des peptides et protéines est également possible par les plaques de Peyer. Ces systèmes cellulaires de Peyer présents au niveau de l'épithélium intestinal permettent l'absorption de macromolécules telles que des protéines intactes ou des polypeptides.

En effet, les cellules M (figure 9) qui composent en partie les plaques de Peyer ont les caractéristiques suivantes : 1) elles possèdent moins de microvillosités au pôle apical, ce qui rend la surface membranaire plus accessible aux macromolécules ; 2) elles internalisent macromolécules et microorganismes par transcytoses adsorptives, 3) elles possèdent peu de lysosomes ce qui permettrait aux macromolécules de traverser l'épithélium sans subir de dégradation enzymatique (Weltzin *et al.*, 1998 ; Isoda *et al.*, 1997 ; Gullberg *et al.*, 2000).

IV LES MODELES D'ETUDE DE L'ABSORPTION INTESTINALE

L'administration des médicaments par voie orale est une voie privilégiée. Elle est obligatoire pour les compléments alimentaires. Cependant les propriétés physicochimiques et enzymatiques de l'épithélium intestinal sont un problème majeur pour la prise *per os* de peptides d'intérêt. Diverses approches ont donc été envisagées, initialement *in vivo* sur

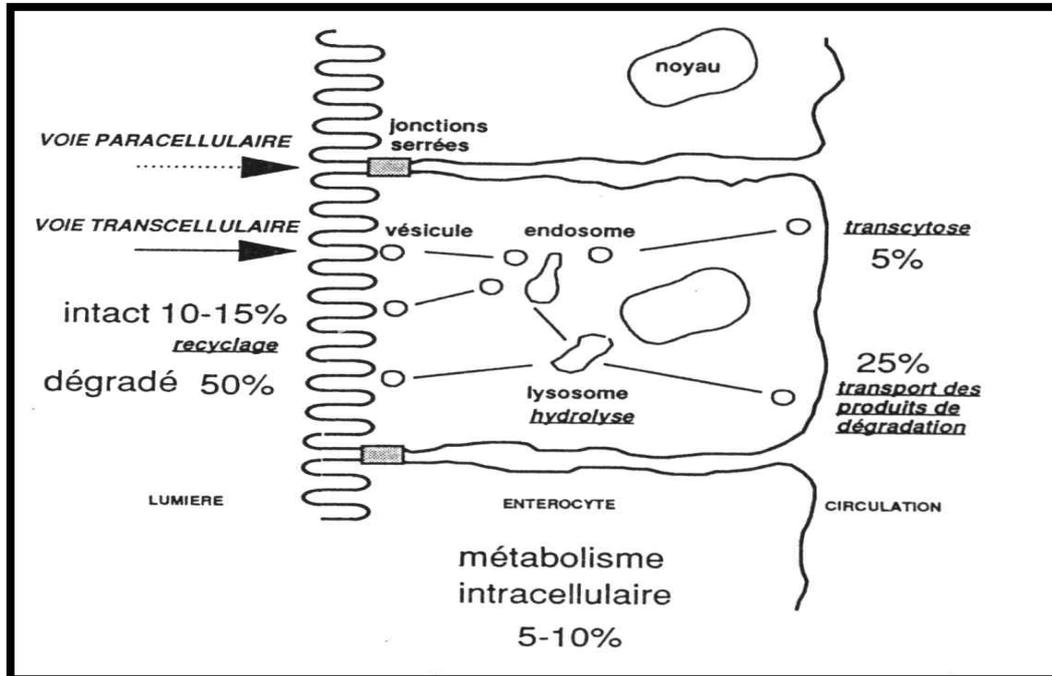


Figure 8 : Métabolisme de l' α -lactalbumine et de la β -lactoglobuline en contact avec le pôle apical d'une monocouche cellulaire Caco-2. Cinquante pour cent des protéines sont dégradées par les enzymes de la bordure en brosse, 40 % empruntent la voie transcellulaire mais seulement 5 % arrivent intactes au pôle basal (Caillard et Tomé, 1995).

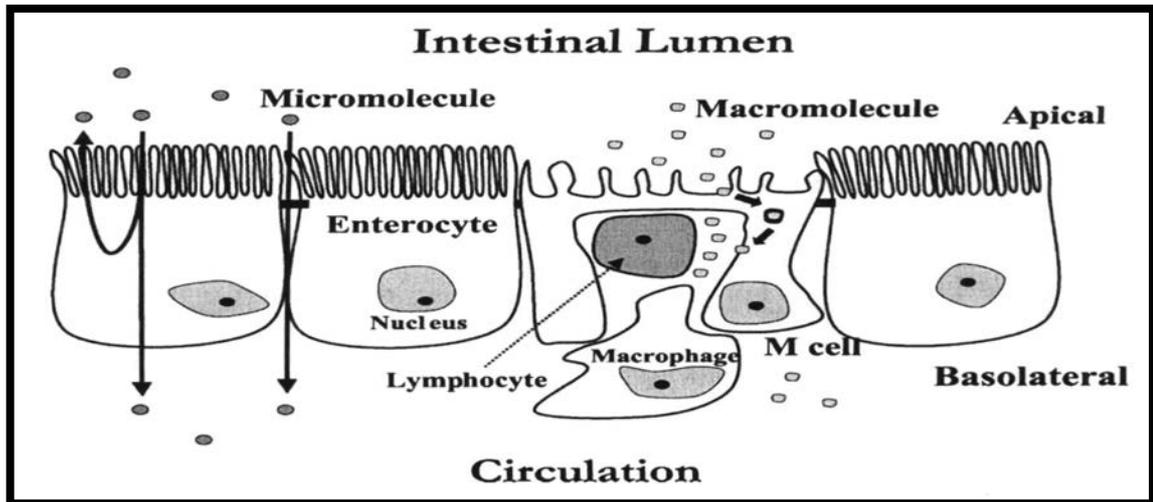


Figure 9 : Cellules M au sein de l'épithélium intestinal.

Les cellules M séparent la lumière intestinale des follicules lymphoïdes muqueux et permettent à certains microorganismes ou macromolécules d'être transportés, par transcytose, de la lumière intestinale jusqu'aux follicules lymphoïdes (Pringault, 1996).

« Intestinal lumen » : lumière intestinale, « M cell » : cellule M, « Nucleus » : noyau.

l'animal puis *in vitro*, pour prédire le passage d'une molécule donnée au travers de l'épithélium intestinal.

Le choix du modèle dépend des questions auxquelles on souhaite répondre et est fonction des propriétés du composé étudié.

IV.1. Les modèles d'étude *in vivo*

Le principal avantage des modèles d'étude *in vivo* est une intégration dynamique de la molécule d'intérêt au sein de l'organisme, en contact avec l'ensemble des facteurs qui influencent les mécanismes d'absorption.

Le modèle d'étude le plus fréquemment employé est le rat ; ses paramètres physiologiques digestifs ne seraient pas si différents de ceux de l'Homme (Kararli, 1995). La digestibilité des protéines alimentaires est similaire chez l'Homme et chez l'espèce porcine. Rowan *et al.* (1994) ont d'ailleurs proposé le modèle porcin comme modèle de la digestion protéique chez l'Homme.

Cependant les résultats obtenus sont des réponses intégratives qui ne permettent pas de détailler les voies de passage transcellulaire et paracellulaire et nécessitent l'emploi de molécules marquées ou fluorescentes pour en faciliter la détection, même si les méthodes de détection ne garantissent pas le suivi de la molécule mère. La variabilité entre individus engendre des difficultés de répétabilité des résultats. L'utilisation du modèle animal pose de plus en plus de problèmes éthiques, d'aménagement d'animaleries soumises aux normes drastiques en faveur du bien-être animal.

IV.2. Les modèles d'étude *ex vivo* et *in vitro*

Employées pour déterminer des paramètres de cinétique de transfert, les méthodes *ex vivo* et *in vitro* sont facilement réalisables et surtout reproductibles (Barthe *et al.*, 1999). Dans un premier temps, différentes portions d'intestin ont été employées permettant, pour une même molécule, d'étudier le transfert en fonction du segment considéré (Chowhan et Amoro, 1977). Ces techniques ont été particulièrement utilisées pour étudier les mécanismes d'absorption paracellulaire et concernaient des molécules à fort caractère hydrophile (Leppert et Fix., 1994). Mais, la faiblesse de cette approche réside dans le manque de reproductibilité de la mesure et les difficultés de maintenir l'organe intègre suffisamment longtemps. L'émergence de la culture cellulaire *in vitro* a permis d'affiner les études sur les mécanismes de transfert au

travers de l'épithélium intestinal. Plusieurs techniques ont été mises au point pour mimer la lumière intestinale par un compartiment apical et la circulation sanguine et lymphatique par un compartiment basal que délimite l'épithélium reconstitué.

IV.2.1. La chambre de Ussing

Initialement mit en place en 1951 par Ussing et Zehran pour étudier le transport actif de l'ion sodium à travers la peau de grenouille, ce modèle reste actuellement très largement utilisé pour étudier des transports d'électrolytes et d'autres composés (glucides, médicaments, peptides, protéines, polluants...) au travers de différentes membranes. Il est également adapté à une investigation fine du passage intestinal et de l'effet de principes actifs sur la physiologie intestinale (figure 10) (Barthe *et al.*, 1999). Grâce aux systèmes voltage-clamp, les paramètres électriques tissulaires sont mesurés en continu et garantissent tout au long de la cinétique de transport le suivi de l'état physiologique du tissu utilisé et sa viabilité. Les cinétiques peuvent être réalisées du côté muqueux vers le côté séreux (sens de l'absorption) ou du côté séreux vers le côté muqueux (sens de la sécrétion). Des segments d'intestin ou des épithéliums reconstitués par des lignées cellulaires telles que Caco-2 ou HT29 peuvent être utilisés.

IV.2.2. Les modèles cellulaires

Pour approfondir la compréhension des mécanismes d'absorption au niveau de l'épithélium intestinal, il est préférable d'utiliser des modèles cellulaires de type entérocytaires permettant de s'affranchir de la muqueuse, de la *lamina propria*, de la muqueuse musculaire et des autres types cellulaires.

La mise en culture primaire d'entérocytes extraits de biopsie tissulaire présente de grandes difficultés expérimentales (Branka *et al.*, 1997).

L'attention s'est donc tournée vers l'utilisation de lignées cellulaires d'adénocarcinome humain de type (liste non exhaustive) HT29 (Huet *et al.*, 1987) Caco-2 (Fogh et Orfeo, 1977), TC7 (sous-clone de la lignée Caco-2), T84 (Irvin *et al.*, 1999) qui possèdent des caractéristiques de différenciation cellulaire de type entérocytaire.

IV.3. Le modèle cellulaire Caco-2

IV.3.1. Description du modèle

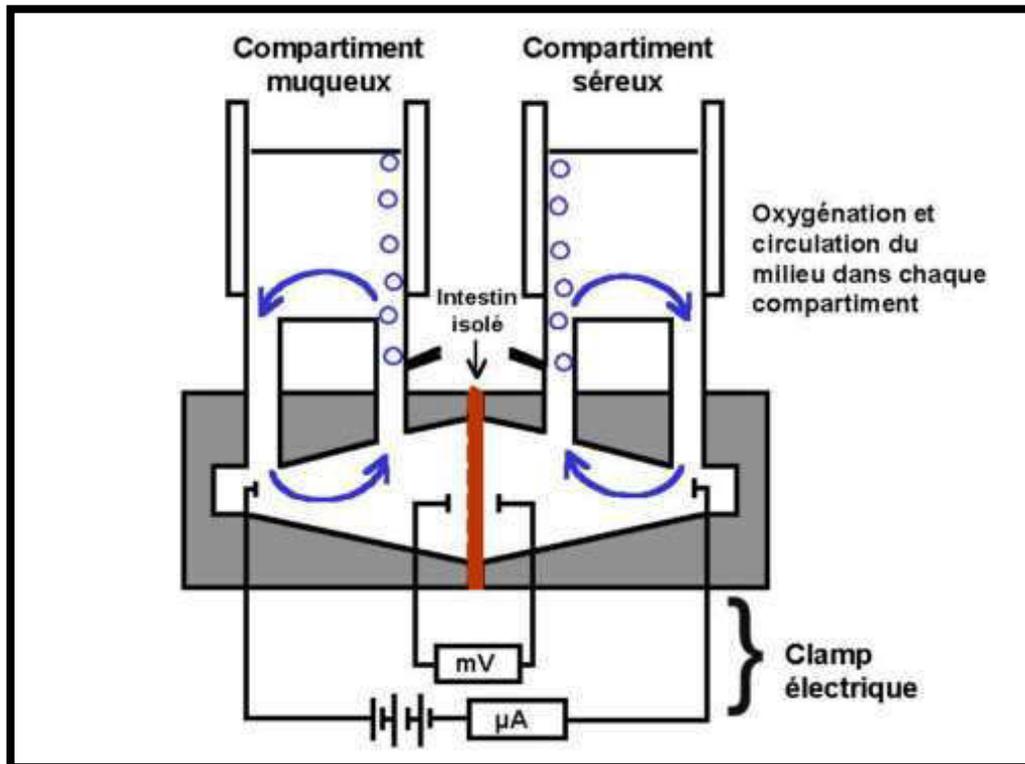


Figure 10 : Dispositif de chambre de Ussing.

Ce système permet d'étudier le transport actif d'électrolytes, et d'autres composés (glucides, médicaments, peptides, protéines, polluants...) au travers de différentes membranes. Il est composé de deux cuves qui définissent dans le cas d'un intestin les compartiments séreux et muqueux. Les paramètres électriques tissulaires sont mesurés en continu par un dispositif électrique attaché au système (mV : voltmètre ; μ A : ampèremètre). Des segments d'intestin ou d'épithéliums reconstitués par des lignées cellulaires telles que Caco-2 ou HT29 peuvent être utilisés (d'après le site : <http://www.oroxcell.com/Chambres-de-Ussing.html?wpid=24047>).

Cette lignée cellulaire a été établie en 1974 (Fogh *et al.*, 1977). Elle provient de cellules cancéreuses de côlon humain. En 1983, Pinto démontre que cette lignée possède un potentiel de différenciation de type entérocytaire. Par la suite, l'utilisation de marqueurs de différenciation associés à des fonctions biochimiques et physiologiques variées de l'épithélium intestinal ont permis une meilleure caractérisation de ces cellules.

IV.3.1.1. Différenciation biochimique

Les activités enzymatiques de la phosphatase alcaline et de la lactase, présentes au niveau de la bordure en brosse des entérocytes, ont été utilisées comme marqueurs de la différenciation des cellules Caco-2 (Chantret *et al.*, 1994 ; Chantret et Barbat, 1994). Les peptidases (peptidyl-dipeptidase A, aminopeptidase P, aminopeptidase N, endopeptidase 24-11) également présentes au niveau de la bordure en brosse de l'entérocyte ont été identifiées chez les cellules Caco-2. Après différenciation cellulaire, l'activité et la densité de présence de ces peptidases sont proches de celles mesurées chez les entérocytes de l'épithélium intestinal humain (Howell *et al.*, 1992). Les systèmes de transport (glycoprotéine P, Multi Drug Resistant, PepT1, HPT1, récepteurs d'acide aminé) présents au niveau des entérocytes *in vivo* ont également été caractérisés sur les cellules Caco-2 (Dantzig *et al.*, 1988, 1994 ; Hidalgo *et al.*, 1989 ; Hidalgo et Brochardt, 1990). En revanche, les cellules différenciées de cette lignée ne produisent pas de mucus à leur surface apicale (Niv *et al.*, 1992).

IV.3.1.2. Différenciation morphologique

Cultivées sur des supports semi-perméables (filtres), après confluence, les cellules de la lignée Caco-2 se différencient et forment un tapis monocellulaire polarisé : bordure en brosse au niveau apical, pôle basolatéral et jonctions serrées qui définissent un espace paracellulaire (Anderson *et al.*, 1989 ; figure 11).

A confluence, les mesures de résistance transépithéliale (RTE), représentatives de la perméabilité paracellulaire de la monocouche cellulaire, sont comprises entre 200 et 1400 ohm.cm² selon les auteurs. La perméabilité paracellulaire de l'épithélium formé par les cellules de la lignée Caco-2 est plus proche de celle du côlon *in vivo* que de celle du duodénum ou du jéjunum (Biganzoli *et al.*, 1999).

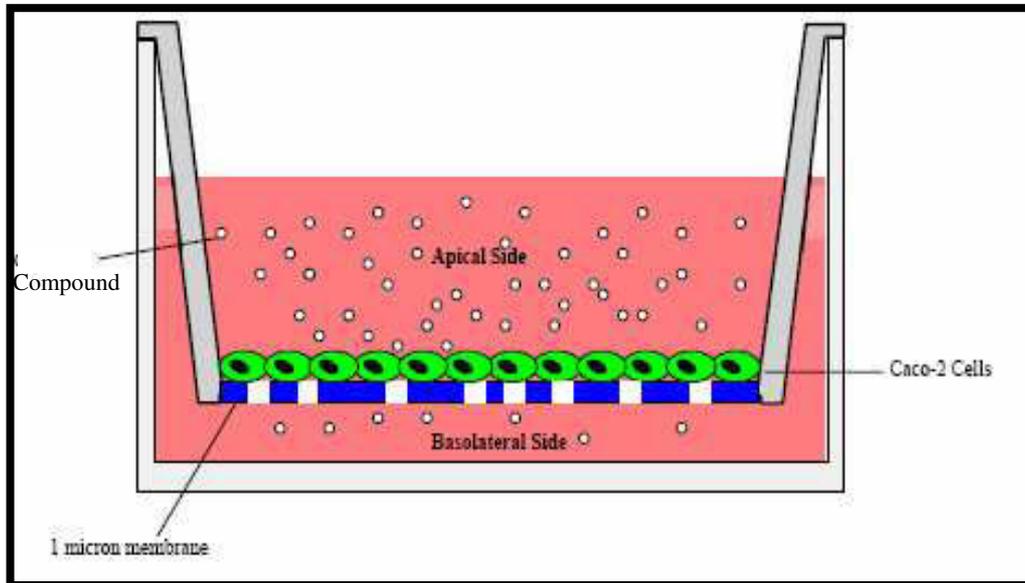


Figure 11 : Principe de la culture sur filtre des cellules de la lignée Caco-2.

À confluence les cellules se différencient pour former une monocouche cellulaire modélisant l'épithélium intestinal.

« Apical side » : pôle apical, « basolateral side » : pôle basolatéral, « Caco-2 cells » : cellules de la lignée Caco-2, « 1 micron membrane » : membrane de 1 μm de porosité, « Compound » : molécule testée.

IV.3.2. Les limites et les variations du modèle Caco-2

Les résultats obtenus avec ce modèle peuvent différer d'une étude à l'autre en fonction : 1) des conditions de culture (composition du milieu de culture, défini ou synthétique) qui peuvent induire des modifications biochimiques et morphologiques ; 2) de la lignée utilisée ; 3) du nombre de passage de la lignée. Pour exemple, la valeur de la RTE peut varier d'une méthode de culture (nombre de passage des cellules, taux d'ensemencement) à une autre de 80 à 1400 ohm.cm² (Balimane, 2005). Ainsi l'utilisation de ce modèle nécessite une mise en œuvre rigoureusement identique pour obtenir une reproductibilité optimale.

Le transfert de molécules hydrophiles par la voie paracellulaire est sous-estimé avec le modèle Caco-2 cultivé sur filtre (Artursson *et al.*, 1993 ; Artursson et Karlsson, 1991 ; Balimane, 2005). L'expression des transporteurs des di- et tripeptides à la surface apicale des cellules Caco-2 est moins importante que celle constatée pour les entérocytes *in vivo* (Balimane, 2005 ; Chong *et al.*, 1996).

L'absence de sécrétions hormonales, de sécrétions biliaires, de mucus sont des aspects à ne pas négliger car ces paramètres peuvent entraîner des variations de perméabilité des cellules et donc affecter les mécanismes d'absorption. De plus la culture sur filtre définit un environnement statique qui fait l'impasse sur les effets des flux du bol alimentaire, sanguin et lymphatique.

Concernant les peptides, les études du transfert des peptides de plus de 4 résidus d'acide aminé sont perturbées par la présence de peptidases solubles dans le milieu apical, des peptidases de la bordure en brosse et des peptidases intracellulaires (Balimane *et al.*, 2005).

Cependant, malgré ses limites, le modèle cellulaire Caco-2 reste encore un des modèles les plus employés pour étudier les phénomènes d'absorption des peptides (Artursson *et al.*, 1996 ; Artursson et Brochardt, 1997 ; Artursson et Karlsson, 1991 ; Boulenc *et al.*, 1995 ; Hilgers *et al.*, 1990).

L'avantage de ces techniques réside dans la simplicité d'utilisation et la possibilité de mettre en place des procédés d'automatisation. Cependant, ces cellules sont issues de tumeurs et, malgré une différenciation cellulaire proche des cellules épithéliales entérocytaires, il est difficile d'établir une extrapolation directe des résultats obtenus *in vitro* vers *l'in vivo*.

IV.3.3. Amélioration du modèle Caco-2 : la co-culture

Le système de culture de la lignée cellulaire Caco-2 permet d'obtenir un modèle d'épithélium intestinal constitué d'un seul type cellulaire : l'entérocyte. Cependant, *in vivo*, la composition de l'épithélium intestinal est plus complexe car constitué de différents types cellulaires, notamment les cellules M. Ce type cellulaire est acteur de l'immunité au niveau des plaques de Peyer et intervient dans les phénomènes de transfert de particules de haut poids moléculaire : bactéries, virus, protéines...(Gebert *et al.*, 1996).

La co-culture de cellules Caco-2 en présence de cellules de Raji (cellules de lymphomes excréant des lymphocytes) entraîne la différenciation fonctionnelle et morphologique des cellules Caco-2 en contact avec les cellules de Raji en cellules M (Gullberg *et al.*, 2000 ; Kernéis *et al.*, 2000 ; Liang *et al.*, 2002 ; Des Rieux *et al.*, 2005 ; Tyrer *et al.*, 2002). *In vivo*, les cellules M sont très difficiles à isoler de l'épithélium intestinal. Ainsi, la co-culture constitue une méthode de substitution dans l'étude du transfert de macromolécules et microorganismes de la lumière intestinale vers le compartiment sanguin.

Par ailleurs, la co-culture de cellules de la lignée Caco-2 avec des cellules de la lignée HT29-H a été mise en œuvre par Wikman-Larhed et Artursson en 1995. Les cellules HT29-H (Wikman *et al.*, 1993) se différencient en cellules caliciformes (cellules excrétrices de mucus) et développent des jonctions serrées plus irrégulières que les cellules Caco-2 (Madara et Trier, 1982). La présence de ce type cellulaire redonne à l'ensemble du modèle en co-culture une perméabilité plus proche de celle du duodénum ou du jéjunum.

IV 3.4. Exemples d'études de transfert de peptides employant le modèle Caco-2

Le modèle cellulaire Caco-2 sur le système puits/filtre a été utilisé et est encore actuellement utilisé pour estimer la capacité de transfert de peptides à travers l'épithélium intestinal. Lundin et Artursson (1990) ont mis en évidence le transfert de la vasopressine (CYFEDCPRG), hormone antidiurétique, et de son analogue 1-déamino-8-D-arginine-vasopressine à l'aide du modèle cellulaire Caco-2 ; les cellules étaient utilisées entre le 85^e et le 95^e passage et cultivées sur des membranes en polycarbonates ayant des pores de 0,45 µm de diamètre, sans matrice de collagène ; la RTE était de 300 ohm.cm². Des transferts des deux peptides, du compartiment apical vers le compartiment basal mais également du compartiment basal vers le compartiment apical, ont été mis en évidence ; cependant le taux

de transfert est faible, environ 0,03 % à 0,1 % par la voie paracellulaire. Le nonapeptide endogène DISP, pour « delta sleep-inducing peptide » (WAGGDASGE), connu pour augmenter la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, ne présente pas de passage du compartiment apical au compartiment basal d'un épithélium reconstitué par les cellules de la lignée Caco-2 (cellules utilisées entre le 25^e et le 55^e passage ; filtres coatés au collagène), malgré la présence d'inhibiteurs permettant de préserver intact 95 % du peptide pendant les deux heures d'incubation (Augustijns et Brochardt, 1995). En revanche, Shimizu *et al.* (1997) ont mis en évidence le passage de la bradykinine, (RPPGFSPFR), vraisemblablement par transcytose, ainsi que le passage du térapeptide EEYR par diffusion paracellulaire ; lors de cette étude les cellules de la lignée Caco-2 ont été utilisées entre le 38^e et le 70^e passage en utilisant des filtres coatés au collagène I ; la mesure de RTE était de 200 ohm.cm².

Récemment, il a été montré que le peptide HLPLP, issu de l'hydrolyse du peptide inhibiteur de l'ECA LHLPLP par les peptidases de la bordure en brosse des cellules Caco-2 (Quiros *et al.*, 2008), ainsi que les β -casomorphines-7 et -5 (YPFVEPI et YPFVE) d'origine humaine et la lactoferroxine A (YLGSGY) issue de la lactoferrine humaine (Iwan *et al.*, 2008), franchissaient la barrière épithéliale constituée de cellules Caco-2. L'ensemble des ces résultats est repris dans le tableau 5

Tableau 5: Etudes sur le transfert de peptides réalisées sur le modèle cellulaire Caco-2.

Peptides/séquences	Poids Moléculaire (Da), pI	Conditions Caco-2	Type de transfert	Références
Vasopressine CYFEDCPRG	1087,20 8,0	Puits/filtre Passage 85-95 Porosité 0,45 µm	Paracellulaire	Lundin et Artursson, 1990
« delta sleep-inducing peptide » WAGGDASGE	848,8 4,09	Puits/filtre Passage 23-55 Filtre coaté au collagène	Pas de détection dans le compartiment basal	Augustijns et Brocharadt, 1995
Bradykinine RPPGFSPFR	1060,22 12	Puits/filtre Passage 38-70 Ensemencement 2 10 ⁵ cellules/cm ² Filtre coaté au collagène	Transcellulaire : transcytose	Shimizu <i>et al.</i> , 1997
GGYR	451,48 8,75		Paracellulaire	
HLPLP	575,71 6,74	Puits/filtre Porosité 0,4 µm Passage 30-45 Ensemencement 10 ⁵ cellules/cm ² Utilisation : 21 ^e jour	Paracellulaire Bidirectionnel	Quiros <i>et al.</i> , 2008
b-casomorphines-7 et -5 YPFVEPI, YPFVE	864,01 ; 4 653,73 ; 4,6	Puits/filtre Porosité 0,4 µm Passage 40-50 Ensemencement 4,5 10 ⁵ cellules/cm ² Utilisation entre 21e et 25 ^e jour	Transcellulaire Bidirectionnel	Iwan <i>et al.</i> , 2008
lactoferrine A YLGSGY	658,71 ; 5,52			
Lactokinine ALPMHIR	837,05 9,80	Chambre de Ussing	Transcellulaire	Vermeirssen <i>et al.</i> , 2002
Inhibiteur de l'ECA VPP	322,38 5,49	Puits/filtre Porosité 0,4 µm Filtre Coaté Passage 40-70 Ensemencement 7 10 ⁵ cellules/cm ²	Paracellulaire	Satake <i>et al.</i> , 2002
Leuprolide EHWSYLLRP	1200,36 6,85	Puits/filtre Porosité 3µm passage 40-45 Ensemencement : 10 ⁴ cellules/mL	Paracellulaire	Guo <i>et al.</i> , 2004
Tripeptides inhibiteurs de l'ECA IPP VPP	325,41 ; 5,52 311,38 ; 5,49	Puits/filtre Porosité 3 µm Passage 40-60 Ensemencement : 4 10 ⁴ cellules/cm ²	Transcellulaire Et/ou paracellulaire	Foltz <i>et al.</i> , 2008

Conclusion

Les peptides d'origine alimentaire offrent la possibilité de développer de nouveaux moyens thérapeutiques préventifs sous forme d'aliment fonctionnel ou de compléments alimentaires. L'intérêt de la forme alimentaire réside dans le fait qu'un aliment peut être pris de manière régulière et n'entraîne pas d'effets secondaires.

Actuellement, le profil pharmacocinétique des peptides bioactifs d'origine alimentaire et les mécanismes par lesquels ils agissent dans l'organisme sont encore largement méconnus.

Pour mieux comprendre les mécanismes d'action de ces peptides il est nécessaire de connaître les systèmes de dégradation potentielle et d'absorption. Ces études permettront de mieux comprendre comment est assuré l'accès de ces peptides ou fragments peptidiques jusqu'à leurs cibles dans l'organisme tant au niveau digestif qu'au niveau systémique.

Actuellement, la démonstration du rôle physiologique de peptides, leurs mécanismes d'action *in vivo* et des études sur leur toxicité éventuelle (allergénicité ; Wal *et al.*, 1999) sont nécessaires pour soutenir toutes les allégations fonctionnelles et pour assurer la sécurité du consommateur.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

La problématique qui a fait l'objet de cette thèse concerne un décapeptide bioactif, l' α -casozépine, issu de l'hydrolyse trypsique de la CN α_{s1} bovine. Ce peptide possède une activité benzodiazépine-mimétique *in vivo* chez le rat après injection intrapéritonéale. Il présente une affinité pour le site BZD du récepteur GABA $_A$ (Miclo *et al.*, 2001). Des études cliniques ont montré que l'hydrolysate trypsique le contenant est efficace chez l'Homme après administration orale sous forme encapsulée (Kim *et al.*, 2007 ; Messaoudi *et al.*, 2005). Cependant, un effet central après administration orale, c'est-à-dire après la traversée du tractus digestif et du flux sanguin, va à l'encontre des connaissances sur l'action des peptidases et de l'épithélium intestinal comme barrière à l'absorption de peptides de cette taille. Cette apparente contradiction nous a amené à approfondir les connaissances sur le mécanisme d'action de ce décapeptide.

Ainsi, la sensibilité de l' α -casozépine face aux protéases du tractus digestif a été étudiée. Pour cela des cinétiques enzymatiques ont été réalisées avec la pepsine pour mimer l'environnement gastrique. L'activité pepsique à pH 2 mime l'action de la pepsine dans le cas de l'administration de l' α -casozépine seule, la cinétique pepsique à pH 4 se rapproche des conditions d'hydrolyse par la pepsine en présence du bol alimentaire *in vivo*. Concernant l'hydrolyse de l' α -casozépine par les protéases pancréatiques, la trypsine est retenue pour vérifier la résistance de l' α -casozépine à la protéase permettant de la générer, tandis que l' α -chymotrypsine est utilisée du fait de sa spécificité d'action pour certaines liaisons peptidiques présentes au sein de l' α -casozépine ; enfin, le mélange Corolase PP® est employé pour obtenir une cinétique de dégradation de l' α -casozépine par l'ensemble des protéases présentes dans le suc pancréatique *in vivo*.

Les peptidases membranaires intestinales semblent être un facteur limitant à l'absorption des peptides, leur impact sur l' α -casozépine a été étudié à l'aide de vésicules de membrane de la bordure en brosse d'entérocyte d'intestin de rats.

Suite aux études d'hydrolyse pepsique *in vitro*, deux produits issus de l'hydrolyse de l' α -casozépine ont été caractérisés. Leur taux de libération et leur résistance vis-à-vis des protéases gastriques et pancréatiques nous ont amené à étudier chez le rat Wistar leur activité anxiolytique à l'aide de différents tests comportementaux (labyrinthe en croix surélevé, enfouissement défensif conditionné et boîte claire/obscur).

Après administration orale, l' α -casozépine devrait atteindre les récepteurs GABA $_A$ localisés au niveau central pour exercer son action. Le franchissement de la barrière intestinale par l' α -casozépine et par certains de ses fragments d'hydrolyse a été étudié *in vitro* à l'aide d'un

épithélium entérocytaire constitué de cellules de la lignée Caco-2. La mise en œuvre de ces expérimentations a nécessité une acquisition des techniques de culture cellulaire, de suivi de différenciation des cellules et de mesure de perméabilité du tapis cellulaire formé.

MATERIEL ET METHODES

I. PURIFICATION DES PEPTIDES DE SYNTHÈSE

L' α -casozépine $^{91}\text{YLGYLEQLLR}^{100}$ et les fragments F97 $^{91}\text{YLGYLEQ}^{97}$ et F95 $^{91}\text{YLGYL}^{95}$ sont synthétisés par NeoMPS (Strasbourg, France).

Les contaminants sont éliminés par une méthode de purification spécifique pour chacun des peptides, sur cartouche Sep-Pak C₁₈ + (Waters).

Comme exposé dans le tableau ci-dessous, chaque peptide (2 mg/mL) est dissous dans un mélange eau/acétonitrile contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) correspondant à un pourcentage d'acétonitrile légèrement inférieur au pourcentage d'acétonitrile pour lequel le peptide s'élué lors d'une séparation en chromatographie liquide haute performance en phase inversée (CLHP) sur colonne analytique LichroCart C₁₈ (250 x 4 mm ; 5 μm de taille de particule ; 10 nm de porosité ; Merck, Darmstadt, Allemagne).

Peptide	% Acétonitrile
91-100	20
91-97	15
91-95	17,5

La colonne Sep-Pak C₁₈ + est conditionnée avec 10 mL de mélange eau/acétonitrile (10/90) puis équilibrée avec 10 mL de mélange eau/acétonitrile (90/10), à un débit de 1 à 2 mL/min.

Un maximum de 2 mL d'échantillon est déposé sur la colonne à un débit n'excédant pas 1 mL/min. Le peptide de synthèse se fixe sur la résine, un lavage est effectué avec 2 mL de solvant de composition identique à la solution de dépôt afin déliminer sels et contaminants (cf tableau ci-dessus). Le peptide est élué avec 3 mL de solvant eau/acétonitrile 10/90.

La procédure est répétée, pour chaque peptide, autant de fois que nécessaire, en fonction de la quantité de peptide purifié souhaitée.

Les éluats correspondant à un peptide sont regroupés et lyophilisés une première fois. Le lyophilisat est remis en suspension dans un volume minimum d'eau et lyophilisé à nouveau. Ces étapes de lyophilisation visent à éliminer le TFA présent.

II. HYDROLYSE DE L' α -CASOZÉPINE PAR LES ENZYMES GASTRIQUES ET PANCREATIQUES

II.1. Hydrolyse de l' α -casozépine par la pepsine (EC 3.4.23.1)

L'hydrolyse de l' α -casozépine (0,15 mg/mL) par la pepsine A (Sigma, St. Louis, Etats-Unis) de muqueuse gastrique porcine (3,200-4,500 unités/mg de protéines) est effectuée à pH 2,0 (solution d'HCl 10 mM) et à pH 4,0 (tampon acétate de sodium 100 mM) pendant 240 minutes, à 37°C, avec un rapport massique Enzyme/Substrat de 1/200 (Kovacs-Nolan *et al.*, 2000).

Toutes les solutions destinées à l'hydrolyse contiennent de la phénylalanine (36 μ M) utilisée comme étalon interne pour l'analyse ultérieure en CLHP en phase inversée.

Un aliquote de 200 μ L est prélevé du milieu réactionnel à 5, 15, 30, 60, 120, 240 minutes. La réaction enzymatique est stoppée par augmentation du pH à $7,0 \pm 0,05$ par ajout de 200 μ L de tampon phosphate 100 mM pH $8,30 \pm 0,05$. Les échantillons sont stockés à -20°C jusqu'à analyse.

II.2. Hydrolyse par la trypsine (EC 3.4.21.4), l' α -chymotrypsine (EC 3.4.21.1) et la Corolase PP®

Les hydrolyses de l' α -casozépine (0,15 mg/mL) par la trypsine traitée TPCK (L-1 Tosylamido-2-Phenylethyl Chloromethyl Ketone) (Sigma, St. Louis, Etats-Unis) (pancréas bovin, 10,000 unités BAEE / mg de protéine) et par l' α -chymotrypsine (Sigma, St. Louis, Etats-Unis) traitée TLCK (L-1 Tosylamido-1-Lysinyloxyethyl Chloromethyl Ketone) (pancréas bovin, 40-60 unités/mg de protéine) sont effectuées en tampon phosphate 100 mM à pH $8,0 \pm 0,05$ à 37°C avec un rapport massique Enzyme/Substrat (Trypsine/ α -Casozepine et Chymotrypsine/ α -Casozepine) de 1/50 (Jinsmaa et Yoshikawa, 1999).

L'hydrolyse de l' α -casozépine (0,15 mg/mL) par la Corolase PP®, mélange de protéases pancréatiques porcines (Röhm, GmbH, Darmstadt, Allemagne) est réalisée en tampon phosphate 100 mM à pH $8,0 \pm 0,05$ à 37°C avec un rapport massique Enzyme/Substrat de 1/100 (Jinsmaa et Yoshikawa, 1999).

Toutes les solutions destinées à l'hydrolyse contiennent de la phénylalanine (36 μ M) utilisée comme étalon interne pour l'analyse ultérieure en CLHP en phase inversée.

Un aliquote de 200 μ L est prélevé du milieu réactionnel à 5, 15, 30, 60, 120, 240 minutes et la réaction enzymatique est stoppée par augmentation de la température à 95°C pendant 15 min. Les échantillons sont stockés à -20°C jusqu'à l'analyse en CLHP en phase inversée.

II.3. Simulation d'hydrolyse gastrique puis pancréatique

L' α -casozépine est soumise à 2 hydrolyses successives, pepsique puis pancréatique. L'hydrolyse pepsique de l' α -casozépine (0,15 mg/mL) est réalisée à pH $2,0 \pm 0,05$ (solution d'HCl 10 mM) à 37°C pendant 120 min, avec un rapport massique Enzyme/Substrat de 1/200. Au bout de 120 min un aliquote est prélevé pour valider l'activité pepsique et stocké à -20°C jusqu'à analyse en CLHP de phase inversée. La trypsine (rapport massique E/S = 1/50) et l' α -chymotrypsine (rapport massique E/S = 1/50) en solution dans un tampon phosphate 100 mM pH $8,0 \pm 0,05$ sont ajoutées au milieu réactionnel (volume à volume). Ce tampon basique neutralise l'action de la pepsine par augmentation de pH à $7,0 \pm 0,05$. L'hydrolyse se poursuit pendant 120 min à 37°C.

Un protocole identique est utilisé avec la Corolase PP® (rapport massique Enzyme/Substrat 1/100) à la place du mélange trypsine α -chymotrypsine.

Pendant l'hydrolyse avec le mélange trypsine α -chymotrypsine ou Corolase PP®, un aliquote de 200 μ L est prélevé à 5, 15, 30, 60, 120, 240 min. La réaction est stoppée par augmentation de la température à 95°C pendant 15 min. Les échantillons sont stockés à -20°C jusqu'à analyse en CLHP en phase inversée. Toutes les solutions de préparation contiennent de la phénylalanine (36 μ M) utilisée comme étalon interne pour l'analyse en CLHP en phase inversée.

III. HYDROLYSE DE L' α -CASOZEPINE PAR LES VESICULES MEMBRANAIRE DE BORDURE EN BROSSE D'INTESTIN DE RAT WISTAR

III.1. Obtention des vésicules membranaires de la bordure en brosse d'intestin de rats Wistar

Trois séries de vésicules membranaires de la bordure en brosse (VMBB) ont été réalisées au Laboratoire de Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire (INA Paris-Grignon ; sous la tutelle d'Anne Blais) selon la méthode de Berteloot (Maenz *et al.*, 1991).

La première série a permis de mettre au point le rapport VMBB/substrat nécessaire pour que l' α -casozépine et le fragment F97 ne soient pas dégradés trop rapidement en utilisant deux concentrations de VMBB. La deuxième série a permis d'étudier l'hydrolyse de l' α -casozépine et du fragment F97 par les VMBB en présence d'EDTA (Acide Ethylène-Diamine-Tetra acétique) tri sodique 5 mM, et la troisième série a permis de suivre l'hydrolyse de l' α -casozépine et du fragment F97 en présence de bestatine à 0,01 mM et 0,1 mM et de captopril à 0,1 mM et 1 mM.

Pour chacune des séries, deux rats Wistar âgés d'un an (poids moyen 530 g) sont sacrifiés par injection par voie intraveineuse d'une dose létale (1 mg/rat) de phénobarbital sodique, remis en suspension dans 10 mL de sérum physiologique (NaCl 0,9 %). Les segments d'intestins prélevés sont rincés avec du sérum physiologique et placés sur une plaque de verre maintenue à 4°C sur un lit de glace. A l'aide de 2 lamelles de verre la muqueuse intestinale est récupérée, pesée, broyée au mixer blender pendant 1 min dans le tampon A (figure 12 ; 20 mL de tampon/g de muqueuse). Toutes les solutions et les ustensiles doivent être préalablement stockés à 4°C. L'homogénat obtenu subit des étapes successives de purification pour obtenir les vésicules membranaires de la bordure en brosse (figure 12).

La pureté des VMBB est vérifiée par détermination de l'activité d'un marqueur enzymatique, la phosphatase alcaline dans les suspensions vésiculaires et comparée à l'activité de l'homogénat. Le dosage des protéines est réalisé par le kit Bio-Rad (Bio Rad Laboratoires, Glattbrugg, Suisse) avec l'albumine bovine comme standard.

Le culot de vésicules est remis en suspension dans 600 μ L de tampon C puis aliquoté en volume de 150 μ L. Les aliquotes non utilisés sont immédiatement conservés en ampoule de congélation à -80°C.

III.2. Hydrolyses de l' α -casozépine et du fragment F97 par les VMBB

Trois séries d'hydrolyses ont été réalisées. La première série comporte 4 unités expérimentales (avec 2 répétitions / unités), la deuxième série 6 unités avec 3 répétitions/unités et la dernière 12 unités avec 2 répétitions / unité) (tableau 6)

Pour chacune des 3 séries, un aliquote de 80 μ L est prélevé de chaque unité expérimentale à 5, 15, 30, 60 et 120 minutes. La réaction est stoppée par l'ajout de 120 μ L de solution d'arrêt (Tampon C + 1% de TFA). Les échantillons sont ensuite conservés à -20°C avant analyse par chromatographie liquide haute performance en phase inversée.

Tableau 6 : Hydrolyses de l' α -casozépine et du fragment F97 par les VMBB en présence ou absence d'inhibiteurs.

1^{ère} série	Unités expérimentales (N=2)
	1- 20 μ L de solution de VMBB C1 (directement prélevé des 150 μ L aliquotés dans le tampon C) + 400 μ L de solution d' α -casozépine (dissoute dans du tampon C à une concentration finale de 200 μ g/mL)
	2- 20 μ L de solution de VMBB C2 (C2=C1/10) + 400 μ L de solution d' α -casozépine (dissoute dans du tampon C à une concentration finale de 200 μ g/mL)
	3 et 4 fragment F97 à 150 μ g/mL (à la place de l' α -casozépine) dans les mêmes conditions que dans 1 et 2
2^{ème} série	Unités expérimentales (N= 3)
	1- 20 μ L de solution de VMBB C2 + 400 μ L de solution d' α -casozépine (concentration finale 200 μ g/mL)
	2- 20 μ L de solution de VMBB C2 + EDTA (concentration finale 5 mM) + 400 μ L de solution d' α -casozépine (concentration finale 200 μ g/mL)
	3- 20 μ L de solution de VMBB C2 inactivées par 1% TFA + 400 μ L de solution d' α -casozépine (concentration finale 200 μ g/mL), tube témoin
	4, 5 et 6 fragment F97 à 150 μ g/mL (à la place de l' α -casozépine) dans les mêmes conditions que dans 1, 2, 3
3^{ème} série	Unités expérimentales (N=2)
	1- 20 μ L de solution de VMBB C2 + 400 μ L de solution d' α -casozépine (concentration finale 200 μ g/mL)
	2- 20 μ L de solution de VMBB C2 + bestatine (concentration finale 0,01 mM) + 400 μ L de solution d' α -casozépine (concentration finale 200 μ g/mL)
	3- 20 μ L de solution de VMBB C2 + bestatine (concentration finale 0,1 mM) + 400 μ L de solution d' α -casozépine (concentration finale 200 μ g/mL)
	4- 20 μ L de solution de VMBB C2 + captopril (concentration finale 0,1 mM) + 400 μ L de solution d' α -casozépine (concentration finale 200 μ g/mL)
	5- 20 μ L de solution de VMBB C2 + captopril (concentration finale 1 mM) + 400 μ L de solution d' α -casozépine (concentration finale 200 μ g/mL)
	6- 20 μ L de solution de VMBB C2 inactivée par 1% TFA + 400 μ L de solution d' α -casozépine (concentration finale 200 μ g/mL), tube témoin
	7, 8, 9, 10, 11 et 12 , fragment F97 à 150 μ g/mL (à la place de l' α -casozépine) dans les mêmes conditions que dans 1, 2, 3, 4, 5, 6

L'inhibiteur et les peptides sont dissout dans le tampon C (figure 12).

IV. ANALYSES STATISTIQUES DES RESULTATS DES HYDROLYSES GASTRIQUE, PANCREATIQUE ET INTESTINALE

L'aire des pics est mesurée à 280 nm après analyse par CLHP en phase inversée (voir chapitre VI). L'aire des pics correspondant à l' α -casozépine résiduelle et aux peptides néoformés à chaque point de la cinétique (Tn) est comparée avec l'aire du pic d' α -casozépine au temps zéro (T0). Une correction de l'aire des pics correspondant aux fragments peptidiques est réalisée à l'aide de l'aire sous le pic de l'étalon interne, le résidu de phénylalanine.

Le rapport est calculé selon la formule :

$$\alpha\text{-Casozepine résiduelle ou fragments peptidique libérés (\%)} = (\text{Aire corrigée à Tn} / \text{Aire } \alpha\text{-casozépine à T0}) \times 100$$

Les aires des peptides qui ne contiennent qu'une tyrosine dans leur séquence sont multipliées par deux.

La proportion des fragments ne contenant pas dans leur séquence de résidu de tyrosine n'a pas pu être calculée faute d'absorbance à 280 nm.

L'évolution des peptides libérés et de l' α -casozépine résiduelle (%) est déterminée par analyse de variance en mesures répétées selon la procédure MIXED (SAS version 9.1.) à un facteur étudié : temps. Les valeurs des variables analysées sont présentées sous forme de moyennes ajustées (test de Tukey). Pour l'hydrolyse par la pepsine deux facteurs sont analysés : le temps et le pH.

V. LE MODELE CELLULAIRE Caco-2

La lignée cellulaire Caco-2 (adénocarcinome colique) est un des modèles cellulaires les plus employés pour modéliser *in vitro* l'épithélium intestinal (figure 13A) et ainsi étudier la biodisponibilité d'un grand nombre de molécules. Cultivées sur filtres les cellules adhérentes initialement indifférenciées se multiplient, et atteignent la confluence. A partir de la confluence, elles se polarisent et se différencient en cellules épithéliales de type entérocytaires et forment ainsi une monocouche de cellule épithéliale délimitant un compartiment apical et un compartiment basal (figure 13 B ; Artursson et Brochardt, 1997 ; Boulenc *et al.*, 1995 ; Fogh *et al.*, 1977).

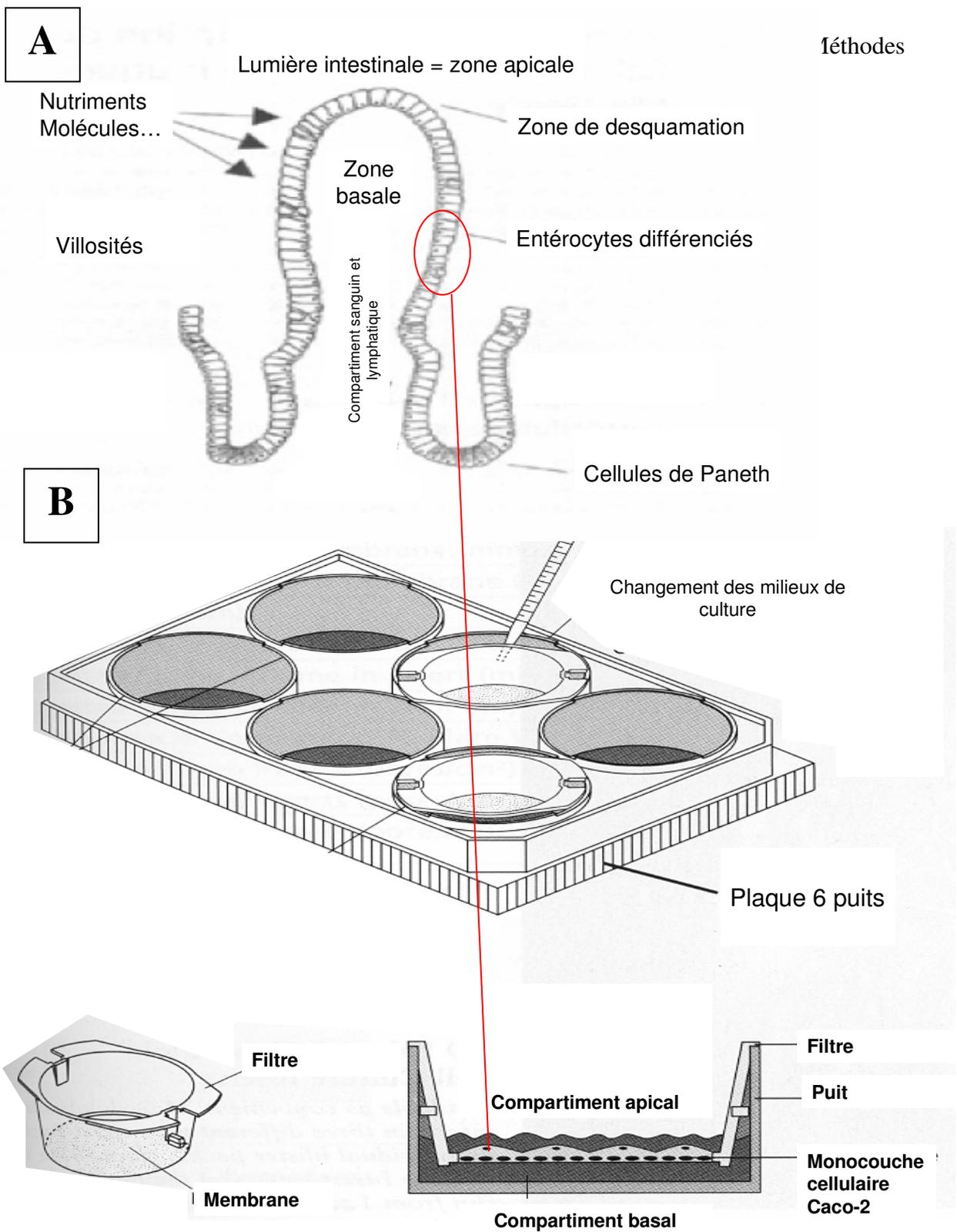


Figure 13 : A : Schéma d'une villosité intestinale

B : Modèle cellulaire Caco-2 mis en culture sur filtres *in vitro* formant une monocouche de cellules type entérocyte et délimitant un compartiment apical et un compartiment basal, dans le but de reproduire le comportement des cellules entérocytaires formant en partie l'épithélium intestinal *in vivo*.

V.1. Les différents clones de la lignée parentale Caco-2

Il existe plusieurs sous-populations de Caco-2, clones de la lignée parentale Caco-2 établie par Fogh en 1977. On peut citer notamment le clone C2BBE1 mis en évidence par Peterson et Mooseker en 1993, les clones PD7, PF-11 obtenus à partir de Caco-2 de faible passage et TC7 obtenu à un passage plus élevé (Caro *et al.*, 1995).

Lors de nos expérimentations nous avons eu l'occasion de travailler avec la lignée parentale Caco-2 et le clone TC7. Les cellules du clone TC7 se différencient en cellules épithéliales avec des propriétés biochimiques et morphologiques plus proche des cellules entérocytaires que la lignée parentale Caco-2 (Caro *et al.*, 1995).

V.2. Entretien des cultures

Lors de la mise au point et du choix d'une méthode de culture des cellules, plusieurs composants du milieu de culture et paramètres de culture ont été testés. Au final ce sont les paramètres de cultures suivants qui ont été choisis.

V.2.1. Composition du milieu de culture

Le milieu standard est composé d'un milieu d'Eagle modifié par Dulbecco contenant du glutamax (formule plus stable de la glutamine) et 4,5 g/L de glucose (Gibco). Ce milieu est complété avec 20 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) (complément inactivé par chauffage à 56°C pendant 30 min), 50 µg/mL d'un mélange pénicilline-streptomycine et 1 % (v/v) d'acides aminés non essentiels (Gibco). Le sérum est ajouté extemporanément et le milieu reconstitué est placé au bain marie à 37°C avant utilisation.

V.2.2. Ensemencement et passage des cellules

Les cultures sont réalisées dans des boîtes de culture spécialement traitées pour la culture cellulaires, boîtes de Roux (Greiner) de 25 (T25) ou 75 (T75) cm² en fonction du nombre de cellules souhaité, pour un taux d'ensemencement de 10.000 cellules/cm². Six jours après ensemencement, les cellules arrivent à 80-90 % de confluence et sont subdivisées avant qu'elles ne rentrent dans la phase de différenciation, c'est ce qu'on appelle un « passage ».

Pour cela, le milieu de culture est enlevé, le tapis cellulaire est rincé au PBS (Phosphate Buffer Saline molarité pH) sans calcium ni magnésium, puis les cellules adhérentes sont décollées avec une solution de trypsine (5 mL pour une T25) (Gibco) agissant pendant 5 à 10 min à 37° C. Une fois les cellules détachées de leur support, elles sont récupérées dans un volume de milieu de culture égal au volume de trypsine utilisé (la présence de SVF inhibe alors l'activité de la trypsine). Après centrifugation (5 min à 1000 g et 25° C) et reprise du culot cellulaire par pipetage répété dans le milieu de culture, les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de Malassez, puis distribuées dans de nouvelles boîtes. Les cellules en culture sont maintenues dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère contenant 10 % de CO₂ et saturée en vapeur d'eau. Le milieu est changé 48 heures après le « passage » puis tous les jours.

V.2.3. Congélation et décongélation des cellules

Les cellules peuvent être stockées dans des ampoules de congélation à l'azote liquide à -120°C. Pour cela les cellules adhérentes sont prises en phase exponentielle au 4^e jour de croissance, puis décollées avec une solution de trypsine comme indiqué au paragraphe V.2.2 puis remises en suspension dans le milieu de culture (paragraphe V.2.1.) contenant 30 % (v/v) de SVF (au lieu de 20 % (v/v)) et 10 % (v/v) de glycérol (cryoprotecteur). Une concentration de $1,5 \times 10^6$ cellules pour 1,5 mL de milieu de congélation est placée dans des ampoules de congélation de 2 mL. Les ampoules de congélation sont refroidies progressivement : une heure à -20°C, 24 h à -80°C puis dans l'azote liquide.

La décongélation doit se faire rapidement au bain-marie à 37°C. Pour éliminer le glycérol, le contenu de l'ampoule de congélation est transféré dans 10 mL de milieu de culture avec 30 % (v/v) de SVF puis centrifugé (5 min à 1000 g et 25°C). Le culot cellulaire est remis en suspension dans du milieu de culture avec 30 % (v/v) de SVF, les cellules sont comptées puis les boîtesensemencées. Le lendemain de la décongélation, le milieu est changé avec un milieu contenant encore 30 % (v/v) de SVF ; au 2^e jour un milieu contenant 20 % (v/v) de SVF est utilisé.

V.3. Caractérisation du modèle Caco-2 en culture sur filtres par l'établissement d'indicateurs de différenciation

Après les mises au point sur la méthode de culture employée, les indicateurs suivant : mesure de la résistance transépithéliale, dosage des protéines totales et activité de la phosphatase alcaline membranaire ont été mis au point et suivis tout au long d'une culture de cellules sur filtres.

Pour ce faire 3 plaques de 6 puits 6 filtres ont étéensemencés à 100.000 cellules/filtre et les mesures de ces 3 indicateurs ont été effectuées tous les deux jours à partir du 5^e jour de culture jusqu'au 21^e jour.

V.3.1. Résistance électrique transépithéliale

Pour la validation de ce modèle cellulaire de barrière intestinale, la mesure de la résistance transépithéliale (RTE) reste un paramètre très fiable, facilement mise en œuvre et non invasive pour le tapis cellulaire. La RTE reflète la perméabilité de l'épithélium et traduit la mise en place des systèmes de flux para- et transcellulaires entre le compartiment apical et le compartiment basal.

La valeur de cette résistance diffère souvent en fonction des méthodes employées, des types cellulaires, d'un laboratoire à l'autre, d'une personne à une autre, pouvant aller de 80 à 1200 ohm.cm². C'est pourquoi nous avons réalisé nos propres mesures selon nos critères de culture nous permettant ainsi de qualifier notre méthode de culture cellulaire du modèle Caco-2.

La mesure de la résistance transépithéliale est réalisée avec l'appareil Millicell®-ERS. Pour chaque puits quatre mesures sont prises autour du filtre, avec un volume de 2,5 mL de milieu de culture en apical et en basal. Cette valeur de RTE est lue contre un blanc correspondant à un filtre sans cellule.

V.3.2. Tests de caractérisation biochimique

Pour valider le modèle Caco-2, l'activité des protéines de différenciation telles que la phosphatase alcaline et la détermination de la concentration en protéines totales des cellules Caco-2 ont été mesurées. Lors de la mise au point, ces dosages ont été effectués sur deux filtres du 5^e jour de culture au 21^e jour, tous les deux jours. La mesure de ces indicateurs étant invasive, elle sera réalisée *a posteriori* lors des expériences.

Après la mesure de la RTE, le milieu de culture est retiré et les cellules sont lavées avec 3 mL de PBS sans calcium ni magnésium. Puis 500 μ L de PBS sont ajoutés jusqu'à recouvrement des cellules. Les cellules sont grattées délicatement à l'aide d'un grattoir spécifique pour la culture cellulaire (Sarstedt). Cette manipulation est répétée 2 fois pour récupérer la totalité des cellules dans un volume final de 1 mL de PBS.

V.3.2.1. Mesure de l'activité de la phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline (PAL) est une enzyme présente au niveau de la bordure en brosse des entérocytes. Son taux d'expression est déterminé par réaction enzymatique. Le substrat incolore le paranitrophényl phosphate (PNPP) est hydrolysé sous l'action de la phosphatase alcaline en paranitrophénol (PNP), produit jaune détectable à 405 nm.

Dans une cuve de spectrophotomètre 1 mL de tampon Tris (0,1 M ; pH 8,6)/NaCl (0,4 M), 50 μ L de PNPP (0,1 M) et 500 μ L de suspension cellulaire sont incubés 30 min à 37°C. La concentration en PNP formé après 30 min d'incubation est déterminée par spectrophotométrie à 405 nm d'après la loi de Beer-Lambert :

$$C = A / (\epsilon_{\text{PNP}} \times l)$$

A : absorbance à 450 nm

ϵ : coefficient d'extinction molaire du PNP à 450 nm = 17000 M⁻¹.cm⁻¹

l : trajet optique = 1 cm

C : concentration (mol.L⁻¹) du PNP formé par la PAL après 30 min d'incubation

La concentration de PNP formée au bout de 30 min d'incubation du PNPP avec l'extrait cellulaire est proportionnelle à la quantité de PAL présente dans cet extrait.

V.3.2.2. Mesure de la concentration en protéines

La détermination de la concentration en protéines totales est réalisée à l'aide du kit Bicinchonic Acid Protein Assay (Sigma, St. Louis, Etats-Unis) sur l'ensemble des cellules d'un filtre du 5^e jour après ensemencement au 21^e jour, tous les deux jours avec deux répétitions par détermination. Dans une cuve de spectrophotomètre 2 mL de réactif est ajouté à 0,1 mL de suspension cellulaire.

Le principe est basé sur la réduction, en milieu alcalin, des ions cuivre II en cuivre I par les protéines présentes. Les ions cuivre I interagissent ensuite avec deux molécules d'acide

bicinchoninique (BCA) provoquant la coloration pourpre du milieu détectable par spectrophotométrie à 562 nm.

Etape 1 : Protéines + $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$

Etape 2 : $\text{Cu}^+ + 2\text{BCA} \rightarrow$ complexe BCA/Cu^+ de couleur pourpre

Une gamme étalon est réalisée avec l'albumine sérique bovine.

V.4. Etude du transfert

Après trypsination et dénombrement, les cellules sontensemencées sur des filtres composés d'une membrane microporeuse ($1,6 \cdot 10^6$ pores de $1 \mu\text{m}$ ou $3 \mu\text{m}$ de diamètre) en polyéthylène téréphtalate de 4,2 cm de diamètre. Ces filtres sontensemencés avec 100.000 cellules dans 1,5 mL de milieu de culture (composition V.2.1) et déposés dans un puits qui contient 2,5 mL de milieu de culture (figure 13B). Afin d'assurer unensemencement identique de tous les filtres, un volume de suspension cellulaire permettant d'ensemencer une plaque de 6 puits est préparée. Pendant les 24 h qui suivent l'ensemencement, le milieu de culture n'est pas changé afin de laisser les cellules adhérer à la membrane, puis il est changé chaque jour.

A partir de la confluence (au 5^e ou 6^e jour) lorsque les cellules rentrent en phase de différenciation, le SVF n'est plus ajouté au milieu de culture du compartiment basal. Cette différence de concentration en protéines entre le pôle basal des cellules et le pôle apical recrée les conditions d'osmolarité et de pH des cellules *in vivo*.

D'autre part plusieurs méthodes de prélèvement ont été testées : la méthode « un puits/tous les temps de cinétique » où tous les points de la cinétique sont prélevés dans le même filtre au niveau apical et le même puits au niveau basal. Ce système engendre une diminution du volume au sein d'une même unité expérimentale (filtre/puits). Le volume prélevé est remplacé par le même volume de milieu neuf entraînant un facteur de dilution à prendre en compte lors des analyses. Cette méthode n'est donc pas la plus simple et les volumes de prélèvement sont à la limite des volumes nécessaires pour l'analyse en CLHP en phase inversée. C'est pourquoi la méthode « un puits/un temps » où chaque temps de cinétique correspond à une unité expérimentale filtre/puits a été choisie même si celle-ci nécessite la mise en œuvre d'un nombre de puits et de filtres important pour couvrir tous les temps de cinétiques et les répétitions nécessaires.

Ainsi, lors de l'étude du transfert et de la dégradation des peptides, les filtres et les puits sont vidés de leur milieu de culture et les filtres sont rincés une fois avec du PBS (10 mM, pH 7,4). Dans le compartiment apical, 1 mL de milieu de culture sans sérum est déposé sur le

tapis cellulaire, et dans le compartiment basal, 2 mL de milieu de culture sans sérum sont placés au fond du puits. Extemporément les peptides sont mis en solution à la concentration choisie, dans 1 mL de milieu de culture sans sérum puis déposés dans le compartiment apical. Le volume final du compartiment apical est donc de 2 mL.

Chaque prélèvement est déposé dans des tubes à hémolyse refroidis dans la glace puis directement congelé avant analyse en chromatographie liquide haute performance.

V.5. Etude de la dégradation des peptides d'intérêt dans le modèle Caco-2

Plusieurs types d'expériences ont été réalisées. Pour certaines, les peptides sont déposés dans le compartiment apical en contact avec les peptidases solubles et membranaires de la bordure en brosse. Ce milieu est nommé milieu « *in vitro* ». D'autres peptides sont déposés dans un milieu apical qui aura été, au préalable, mis en contact à des temps variables avec la bordure en brosse puis extrait du compartiment. Ce milieu est nommé milieu « *ex vitro* ».

Une expérience sur l'étude de l'hydrolyse des peptides a été réalisée *in vitro* en présence d'un mélange d'inhibiteurs protéasiques non cytotoxique (Sigma, St. Louis, Etats-Unis). Ce mélange est spécifique des peptidase à sérine, cystéine, acide aspartique, et des aminopeptidases. Il contient de l'aprotinine, de la bestatine, de l'E-64 et de la pepstatine A.

VI. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE EN PHASE INVERSÉE

L'ensemble des échantillons obtenus (hydrolyses avec les enzymes gastriques, pancréatiques, intestinales, étude du transfert) a été analysé par chromatographie liquide haute performance en phase inversée. Dans chaque échantillon est ajouté 5 % (v/v) d'acétonitrile et 0,1 % (v/v) d'acide trifluoroacétique (TFA). Les échantillons sont ensuite filtrés (0,45 µm, PVDF, Acrodisc, Gelman LC 13, Ann Arbor, MI, Etats-Unis).

La séparation des peptides s'effectue sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ (250 x 4 mm ; 5 µm de taille de particule ; 10 nm de porosité ; Merck, Darmstadt, Allemagne), reliée à un système CLHP Alliance 2690 (Waters). Un volume de 200 µL d'échantillon est injecté dans la colonne. Lors du fractionnement chromatographique, un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile est appliqué pendant 70 min en présence de 0,1% (v/v) d'acide trifluoroacétique, à un débit de 1 mL.min⁻¹ et à 25°C. Pour l'analyse spectrale des échantillons, un détecteur à barrette de diodes 996 (Waters) est relié en ligne au système de

CLHP. L'appareil enregistre 10 spectres/seconde (dans une zone comprise entre 210 et 320 nm). Les spectres UV de chaque peptide sont exploités avec le logiciel Millennium 32 version 3.05.01 (Waters) selon la méthode de Miclo *et al.* (2001) et Perrin *et al.* (1995) qui permet de connaître la composition relative en résidus d'acides aminés aromatiques des peptides étudiés. Pour les échantillons relatifs à l'étude du transfert, une colonne : Lichrospher RP C₁₈EC (150 x 2 mm ; 5 µm de taille de particules) a été utilisée. Le volume d'échantillon injecté est alors déposé de 50 µL et le débit de 0,2 mL/min. Les gradients de solvant et la méthode de détection restent identiques.

VII. SPECTROMETRIE DE MASSE

Les masses moléculaires des peptides ont été déterminées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à ionisation électrospray (LC/ESI-MS) et par spectrométrie de masse MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption ionization – time of flight*). Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec Daniel Mollé du laboratoire des Sciences et Technologies du Lait et de l'Œuf (UMR-INRA de Rennes).

La chromatographie liquide est réalisée sur une chaîne Hewlett Packard 1100 (Agilent Technologies, Massy, France). La colonne (narrow-bore Symmetry C₁₈, 150 x 2,1 mm, 5 µm de taille de particules ; Waters) est maintenue à 40°C ; le débit est de 0,25 mL.min⁻¹ et les peptides élués sont détectés à 214 et 280 nm et par courant ionique total (*total ionic courant*, TIC). La colonne est directement connectée avec un spectromètre de masse API III⁺ (Perkin Elmer-SCIEX, Thornhill, Ontario, Canada) comme décrit par Gagnaire *et al.* (1996). La spectrométrie de masse MALDI-TOF est réalisée avec un appareil Q/Star XL équipé d'une source O-MALDI II (MDS-SCIEX, Thornhill, Ontario, Canada). Après la séparation chromatographique, 1 µL de chaque fraction peptidique collectée est mélangé à 1 µL de matrice MALDI (5 mg.mL⁻¹ d'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique ; Laserbio Labs, Sophia Antipolis, France) et déposé sur une plaque ABI MALDI (Applied Biosystems). Ensuite, tous les spectres MALDI-TOF sont enregistrés en mode réflexion positive et 120 acquisitions sont réalisées pour chacun des spectres. Les résultats sont traités avec des logiciels SCIEX (Tune 2.5, Biomultiview 1.3.1. et Analyst 1.0). Les masses moléculaires théoriques des peptides sont calculées avec le programme MS-Bridge du logiciel ProteinProspector 4.0.5 disponible à l'adresse Internet <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msbridge> (Clauser *et al.*, 1999).

VIII. ETUDES COMPORTEMENTALES

L'enfouissement défensif conditionné (EDC), le labyrinthe en croix surélevé (LCS), et la boîte claire/obscur (BCO) sont trois modèles comportementaux d'étude de l'anxiété non conditionnée que nous avons choisi d'utiliser pour mettre en évidence une éventuelle action anxiolytique de l' α -casozépine et des fragments F97 et F95. Ces tests sont basés sur l'étude de l'exploration et du comportement d'un animal confronté à une situation anxiogène (Ohl, 2003).

Toutes les expériences ont été réalisées avec des rats mâles de type Wistar (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France), âgés de 6 semaines (170-220 g). Ces rats sont élevés en animalerie à une température de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, avec un taux d'humidité de 45 % et en lumière artificielle (12 h obscurité / 24 h) avec nourriture et eau *ad libitum*. Ces rongeurs sont employés en accord avec les directives du comité régional d'éthique en expérimentation animale. Ces directives sont semblables à ceux du Conseil Recherche National de France.

VIII.1. Enfouissement Défensif Conditionné

VIII.1.1. Principe

Développé par Pinel et Treit (1978), ce test est basé sur la tendance innée des rongeurs, placés dans un environnement familier, à enfouir tout objet perçu comme dangereux en projetant la litière présente au niveau du sol sur la source de danger. L'expression du comportement d'enfouissement par l'animal est représentatif de son niveau d'anxiété : plus il est anxieux, plus il enfouit. Ainsi, une électrode délivrant une faible intensité provoque l'apparition du comportement d'enfouissement chez le rat.

L'administration de molécules anxiolytiques réduit significativement la durée d'expression de ce comportement.

VIII.1.2. Protocole et dispositif

Le test se déroule dans une boîte en Plexiglas (44 x 28 x 18 cm) dont l'une des parois présente un orifice permettant d'insérer une électrode (7 x 2 x 0,5 cm). Le fond de la boîte est recouvert d'une épaisse couche de sciure (5 cm). L'électrode est reliée à un générateur délivrant un courant d'une intensité de 1 mA, activé par l'expérimentateur, lorsque le rongeur

pose une patte avant sur l'électrode. L'ensemble de l'expérimentation est réalisé en lumière blanche de faible intensité (30 lux) (figure 14). L'expérimentation se compose d'une phase d'habituation de 2 jours suivie d'une phase de test. Lors de la phase d'habituation, les rats sont placés 20 min/jour dans la boîte de test, sans l'électrode, de manière à les habituer au dispositif expérimental. Lors de la phase de test, chaque rat est placé individuellement dans la boîte qui contient l'électrode. Lorsque l'animal touche l'électrode avec la patte pour la première fois, il reçoit un choc unique. A partir de cet instant, son comportement est filmé pendant 5 min et les variables comportementales, le temps de latence d'enfouissement et le temps d'enfouissement sont quantifiés.

VIII.1.3. Traitements

L'étude a portée sur 32 rats mâles de souche Wistar répartis en 4 traitements ($N=8$ /traitement)

- 1- Contrôle ayant reçu 0,1 mL/kg de NaCl 0,9 % (m/v),
- 2- Diazépam à la dose de 0,5 mg/kg (VALIUM[®], Roche, Neuilly-sur-Seine, France) servant de contrôle positif,
- 3- Fragment 91-97 (F97) préalablement dissous dans une solution de NaCl 0,9 % (m/v), à la dose de 0,4 mg/kg (0,45 μ mol/kg),
- 4- α -Casozépine préalablement dissoute dans une solution de NaCl 0,9 % (m/v), à la dose de 0,70 mg/kg (0,55 μ mol/kg).

Les animaux reçoivent leur traitement respectif par voie intra péritonéale (i.p.) une demi-heure avant le passage dans le test d'EDC.

VIII.2. Open Field et Labyrinthe en Croix Surélevé

VIII.2.1. Principe

L'Open Field (OF) a été décrit pour la première fois en 1936 par Hall. Ce dispositif, qui délimite un environnement familier et un environnement non familier, mesure principalement le caractère exploratoire du rongeur. Ce test est souvent utilisé pour mettre en évidence chez les individus une activité motrice normale, et est donc utilisé en amont de tests plus spécifiques type EDC ou LCS (Saudou *et al.*, 1994).

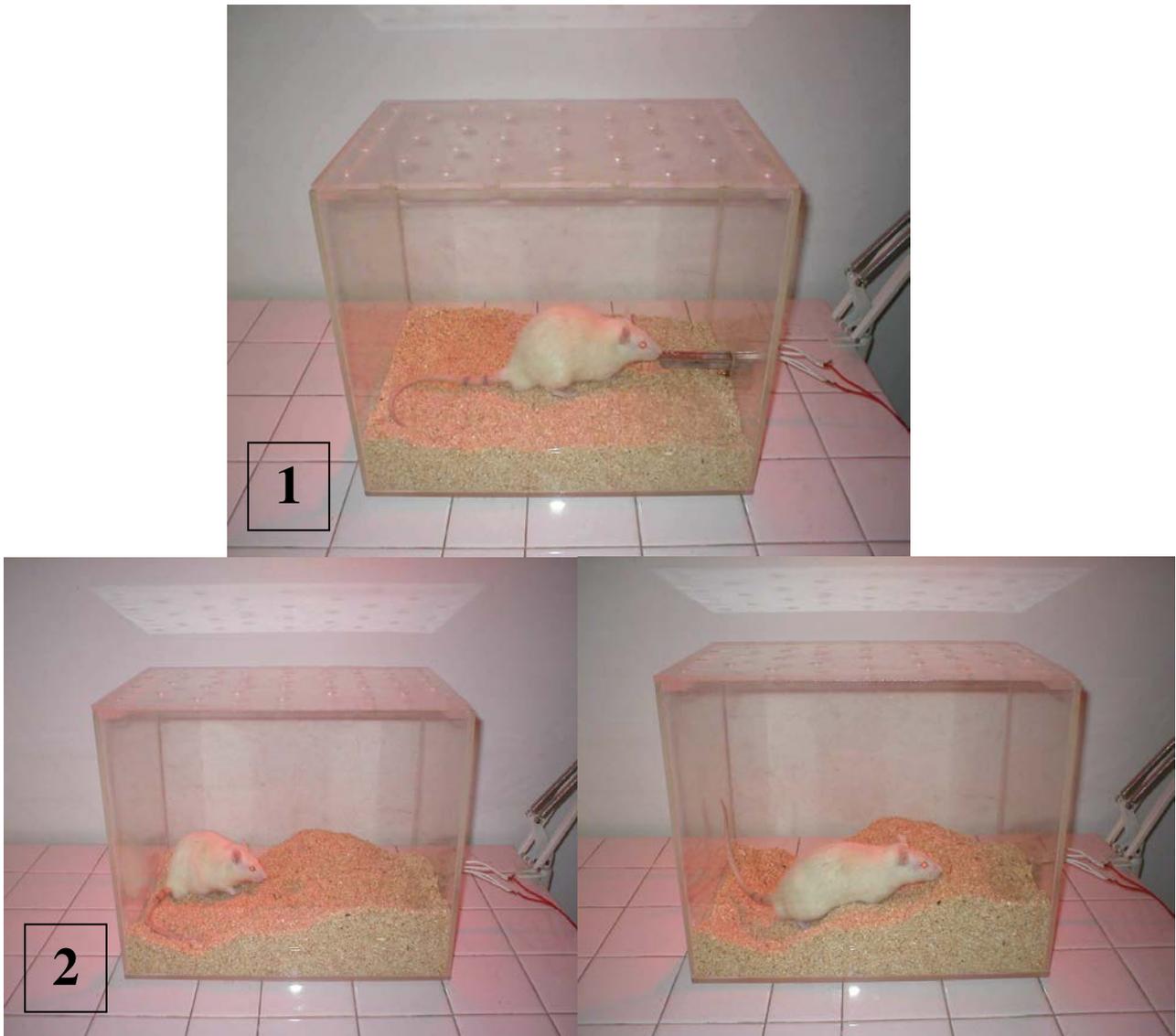


Figure 14 : Test d'enfouissement défensif conditionné, réalisé dans une boîte en plexiglas (44 x 28 x 18 cm) dont l'une des parois présente une électrode (7 x 2 x 0,5 cm), le fond de la boîte est recouvert de 5 cm de sciure, test réalisé en lumière blanche (30 lux).

Photo 1 : l'animal reçoit le choc électrique de faible intensité (1 mA) lorsqu'il touche l'électrode pour la première fois (avec la patte avant). A partir de ce moment le comportement de l'animal est enregistré pendant 5 min

Photos 2 : en réponse au choc électrique de faible intensité, l'animal, en fonction de son niveau d'anxiété, enfouit plus ou moins sous la sciure l'électrode considérée comme dangereuse.

Le LCS, test le plus fréquemment employé, est décrit pour la première fois en 1985 par Pellow *et al.*. Le dispositif consiste en un labyrinthe surélevé ayant la forme d'une croix avec deux branches ouvertes et deux branches fermées. Ce dispositif est naturellement anxiogène pour le rat, qui va spontanément éviter les branches ouvertes et préférer les branches fermées. L'expérience exploite le conflit, chez les rongeurs, entre la peur des espaces ouverts et le désir d'explorer un nouvel environnement. Les branches fermées représentent une sécurité, alors que les branches ouvertes offrent une valeur exploratoire. Un animal anxieux aura naturellement tendance à préférer les espaces clos et sombres aux espaces ouverts et éclairés. Partant de ce principe, l'anxiété comportementale est mesurée par le degré d'évitement des espaces ouverts du labyrinthe.

Cette situation permet donc de mettre en évidence les propriétés anxiolytiques ou anxiogènes de composés pharmacologiques, puisque le temps passé dans les branches ouvertes augmente parallèlement à une diminution de l'anxiété de l'animal (Dalvi et Rodgers, 1999 ; Rodgers et Dalvi, 1997 ; Rodgers *et al.*, 1992).

Les rats passent successivement dans l'OF puis dans le LCS.

VIII.2.2. Protocole et dispositif

L'activité locomotrice a été mesurée dans l'OF et l'activité exploratoire libre dans le LCS. Pour réduire au minimum les influences des changements circadiens sur l'étude des comportements en OF et LCS, les animaux sont observés entre 9 h et 11 h du matin, sur 3 semaines. Les dispositifs expérimentaux utilisés sont lavés entre chaque rat avec une solution d'alcool (95 %) pour palier aux effets polarisants dus aux odeurs laissées par le rat précédent. L'OF est une unité rectangulaire en plastique gris (65 x 49 x 35 cm), constituée de deux compartiments (65 x 49 x 17 cm), reliés entre eux par 3 portes (8 x 8 cm) (figure 15).

Le but de ce test est d'examiner les réactions des rongeurs libérés dans un environnement peu familier. Chaque rat est initialement placé dans un compartiment dit familier pendant 24 h ; les portes vers l'autre compartiment sont fermées. Le sol est couvert de sciure et le rat est nourri *ad libitum*. Au bout de 24 h le rat est traité ou non puis les accès vers le second compartiment, dit non-familier, sont ouverts. L'ensemble est éclairé en lumière rouge, lumière non aversive pour le rat. Son comportement vis-à-vis du compartiment non familier est observé pendant 10 minutes.

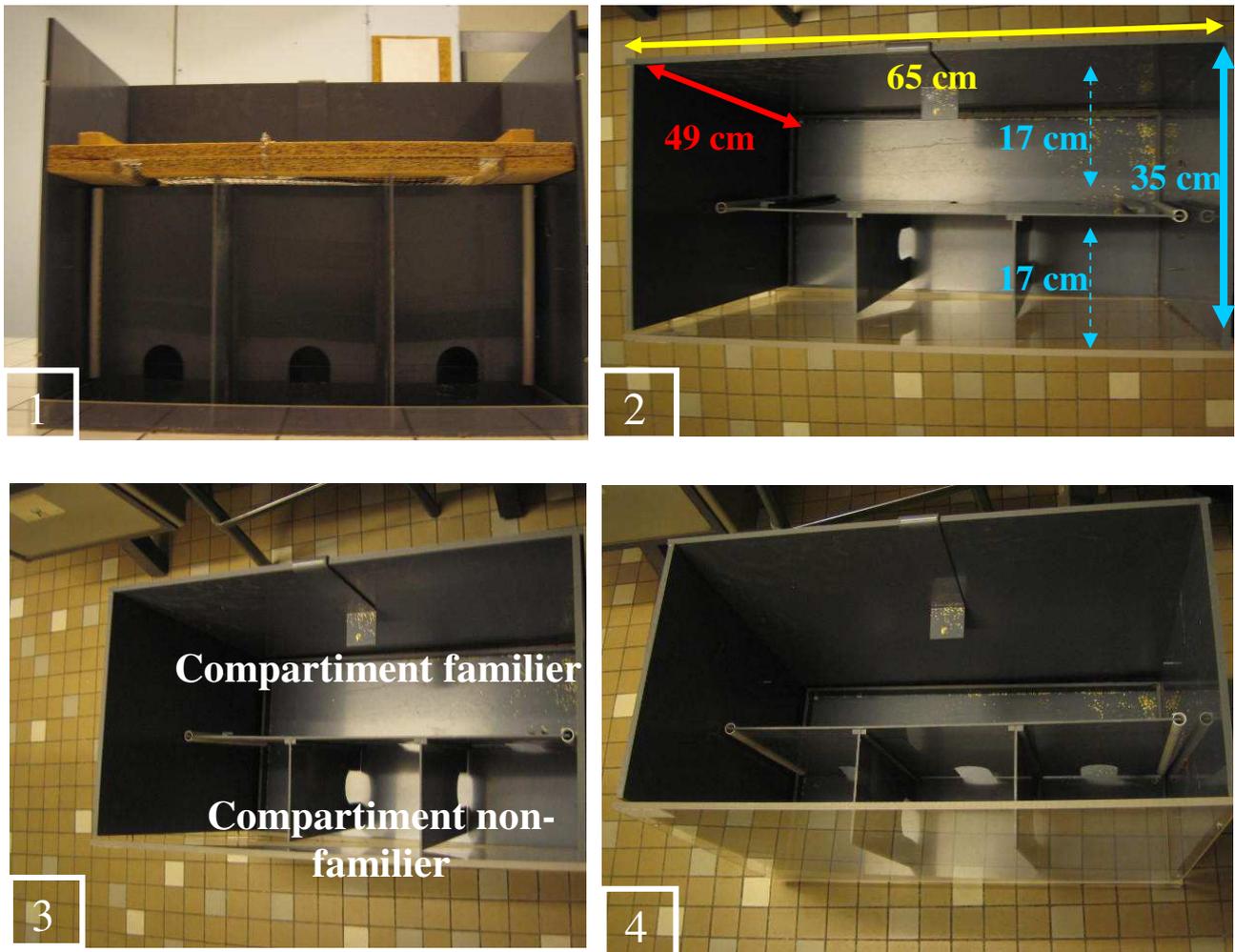


Figure 15 : Vue de face (1) et vues du dessus (2, 3, 4) du dispositif utilisé pour les tests de l'open field et de la boîte claire/obscur.

L'open field est utilisé pour mesurer l'activité locomotrice des animaux ayant reçu les différents traitements préalablement au test du labyrinthe en croix surélevé. Chaque rat est initialement placé pendant 24 h dans le compartiment familial et nourri *ad libitum*. Ensuite les accès vers le compartiment non-familier sont ouverts et son comportement dans l'ensemble du dispositif est observé pendant 10 minutes. L'ensemble est éclairé en lumière rouge, lumière non aversive pour le rat.

Le test de la boîte claire/obscur permet d'étudier le comportement exploratoire de l'animal vis-à-vis d'un compartiment non-familier plus aversif, éclairé en lumière blanche (1500 lux), après habitude dans le compartiment familial obscur (habitude pendant 24 h avec ouverture des accès vers le compartiment non familial).

Dix minute après la fin du passage en OF, le même rat est placé au centre du LCS museau dirigé vers la branche ouverte et son comportement en exploration libre est examiné et enregistré pendant 5 min. Ce dispositif est constitué des deux branches ouvertes (45 x 10 cm) exposées à une lumière blanche (500 lux) et deux branches fermées (45 cm x 10 cm x 40 cm). L'appareil est disposé à 50 cm du sol (figure 16).

VIII.2.3. Traitements

L'étude a porté sur 90 rats mâles répartis en 6 traitements ($N=15/\text{traitement}$) :

- 1- Témoin n'ayant subit aucune injection,
- 2- Contrôle ayant subit une injection du véhicule, soit un mélange de 1 % de glycérol (v/v) et 0,2 % (p/v) de méthylcellulose dissous dans de l'eau ultra-pure.
- 3- Diazépam (Valium®, ...) mis en suspension dans la solution véhicule, injecté à la dose de 1 mg/kg,
- 4- α -Casozapine, préalablement dissoute dans la solution véhicule, injectée à la dose de 1 mg/kg (0,79 $\mu\text{mol/kg}$),
- 5- Fragment 91-97 (F97), préalablement dissous dans la solution véhicule, injecté à la dose de 0,7 mg/kg (0,79 $\mu\text{mol/kg}$),
- 6- Fragment 91-95 (F95), préalablement dissous dans la solution véhicule, injecté à la dose de 0,5 mg/kg (0,79 $\mu\text{mol/kg}$).

Les animaux reçoivent leur traitement respectif par voie i.p. une demi-heure avant le passage dans l'OF, soit 40 min avant le passage dans le LCS.

VIII.3. Boîte claire/obscur

VIII.3.1. Principe

Ce dispositif de boîte claire/obscur (BCO) permet d'étudier le comportement exploratoire du rongeur vis-à-vis d'un compartiment non-familier plus aversif, éclairé en lumière blanche, après habitude dans un compartiment qui lui est familier et obscur (habitude pendant 24 h avant mise en place du test) (Bourin et Hascoet, 2003). Les deux compartiments sont de la même taille (même dispositif employé que pour l'OF). Le nombre de transitions (d'entrées dans l'un ou l'autre des compartiments), le temps passé dans chacun des compartiments, le

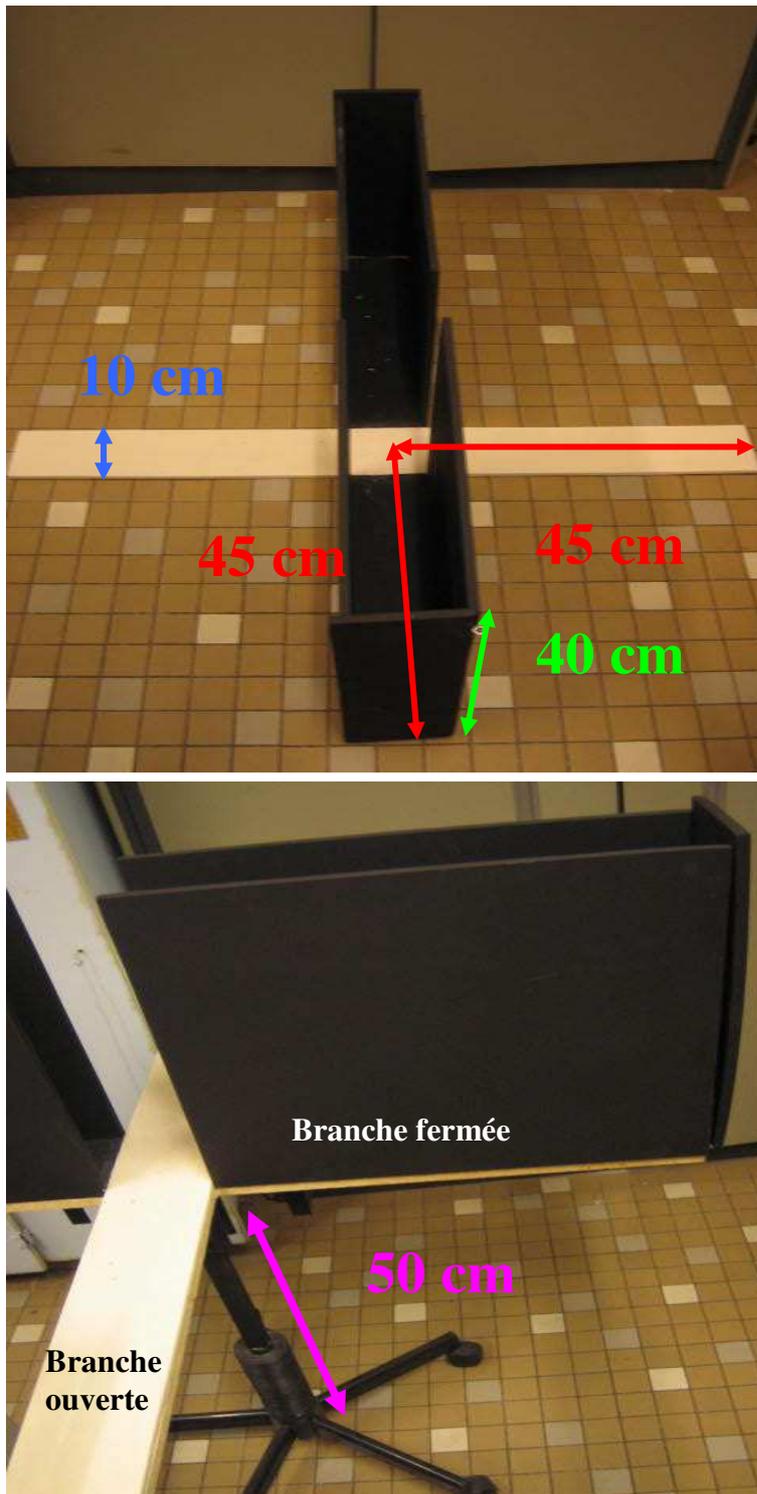


Figure 16 : Test du labyrinthe en croix surélevé permettant d'étudier le comportement exploratoire de l'animal observé pendant 5 min en lumière banche (500 lux).

nombre de redressement de l'animal et initialement le temps de latence d'entrée dans le compartiment plus aversif sont les indicateurs du comportement mesurés.

VIII.3.2. Protocole et dispositif

Le dispositif est une unité rectangulaire (65 x 49 x 35 cm), constituée de deux compartiments (65 x 49 x 17 cm) qui communiquent entre eux par 3 portes (8 x 8 cm). Le compartiment familial est obscur (250 lux blanche), l'autre non-familier, plus aversif, est éclairé en lumière blanche (1500 lux) (figure 15). Le rat est placé 24 h avant dans le compartiment familial. Puis les portes qui donnent accès au compartiment non-familier sont ouvertes. Le comportement du rat est observé pendant 10 min.

VIII.3.3. Traitements

L'étude a porté sur 60 rats mâles de souche Wistar répartis en 5 traitements ($N=12$ /traitement) :

- 1- Contrôle ayant subi une injection du véhicule, soit un mélange de 1 % (v/v) de glycérol et de 0,2 % (p/v) de méthylcellulose dissous dans de l'eau ultra-pure.
- 2- Diazépam (Valium®) mis en suspension dans la solution véhicule, injecté à la dose de 1 mg/kg,
- 3- α -Casozépine, préalablement dissoute dans la solution véhicule, injectée à la dose de 1 mg/kg (0,79 μ mol/kg),
- 4- Fragment (91-97) (F97) préalablement dissous dans la solution véhicule, injecté à la dose de 0,7 mg/kg (0,79 μ mol/kg),
- 5-Fragment (91-95) (F95) préalablement dissous dans la solution véhicule, injecté à la dose de 0,5 mg/kg (0,79 μ mol/kg).

Les animaux reçoivent leur traitement respectif par voie i.p. une demi-heure avant l'ouverture des communications entre le compartiment familial et le compartiment non-familier.

VIII.4 Traitements statistiques

Pour les variables obtenues après visionnage des vidéos des expériences en LCS et BCO, les effets des traitements sont analysés par ANOVA et test de Tukey pour la comparaison des moyennes avec le logiciel SAS (version 9.1). Pour l'EDC, les tests non paramétriques de

Kruskall Wallis et Mann Whitney pour les tests *post hoc* sont utilisés. N est l'effectif pour chaque traitement : $N=8$ pour EDC, $N=15$ pour LCS et $N=12$ pour la boîte claire/obscur et $P<0,05$.

CHAPITRE I

ETUDE DE L'YDROLYSE IN VITRO DE L' α - CASOZEPINE PAR UN SYSTEME ENZYMATIQUE D'ORIGINE GASTRIQUE ET/OU PANCREATIQUE

Ce chapitre fait le bilan de l'action *in vitro* de la pepsine et/ou des protéases pancréatiques sur l' α -casozépine, étudie la stabilité de celle-ci vis-à-vis de ces protéases et identifie les fragments peptidiques issus de ces hydrolyses.

I. ETUDE DE L'HYDROLYSE DE L' α -CASOZEPINE PAR LA PEPSINE

La cinétique de dégradation de l' α -casozépine par la pepsine a été étudiée à pH 2,0 et à pH 4,0 pour simuler le milieu gastrique au pH optimum de la pepsine (pH 2,0 - phase interprandiale) et en présence du bol alimentaire (pH 4,0 – phase prandiale) (Samloff, 1973) (avec un rapport E/S de 1/200) (Kovacs-Nolan *et al.*, 2000).

I.1. Etude de la dégradation de l' α -casozépine par la pepsine à pH 2,0

La cinétique de dégradation de l' α -casozépine a été étudiée à pH 2,0 pendant 240 min (figure 17A). L' α -casozépine est rapidement hydrolysée sur les 25 premières minutes entraînant la disparition de 50 % de la quantité de peptide mise en jeu initialement (la dégradation est d'environ 2 % par minute sur les 25 première minutes de réaction) Ensuite, le taux d'hydrolyse diminue, 14 % de peptide sont encore présents après 60 min d'hydrolyse. Entre 60 et 120 min l'hydrolyse n'est que de 0,04 % / min ; il reste encore 7 % de peptide après 2 h d'hydrolyse.

I.2 Etude de la dégradation de l' α -casozépine par la pepsine à pH 4,0

La cinétique de dégradation de l' α -casozépine par la pepsine, à pH 4,0 (figure 17B), n'est pas significativement différente de celle observée à pH 2,0.

Cinquante pour cent de l' α -casozépine sont encore présents après 20 min d'hydrolyse par la pepsine et encore 5 % au bout des 2h d'hydrolyse.

Il apparaît que la valeur du pH dans nos conditions expérimentales ne modifie pas la vitesse d'hydrolyse de l' α -casozépine par la pepsine alors que le pH optimum de la pepsine est de 2.

Dans une publication récente, Roufik (2005) montrent que le fragment 139-148 de la β -lactoglobuline est hydrolysé *in vitro* avec le même degré d'hydrolyse par la pepsine à pH 1,9, 2,5, et 4,0 pour le même rapport E/S de 1/200 et pour le même temps d'hydrolyse.

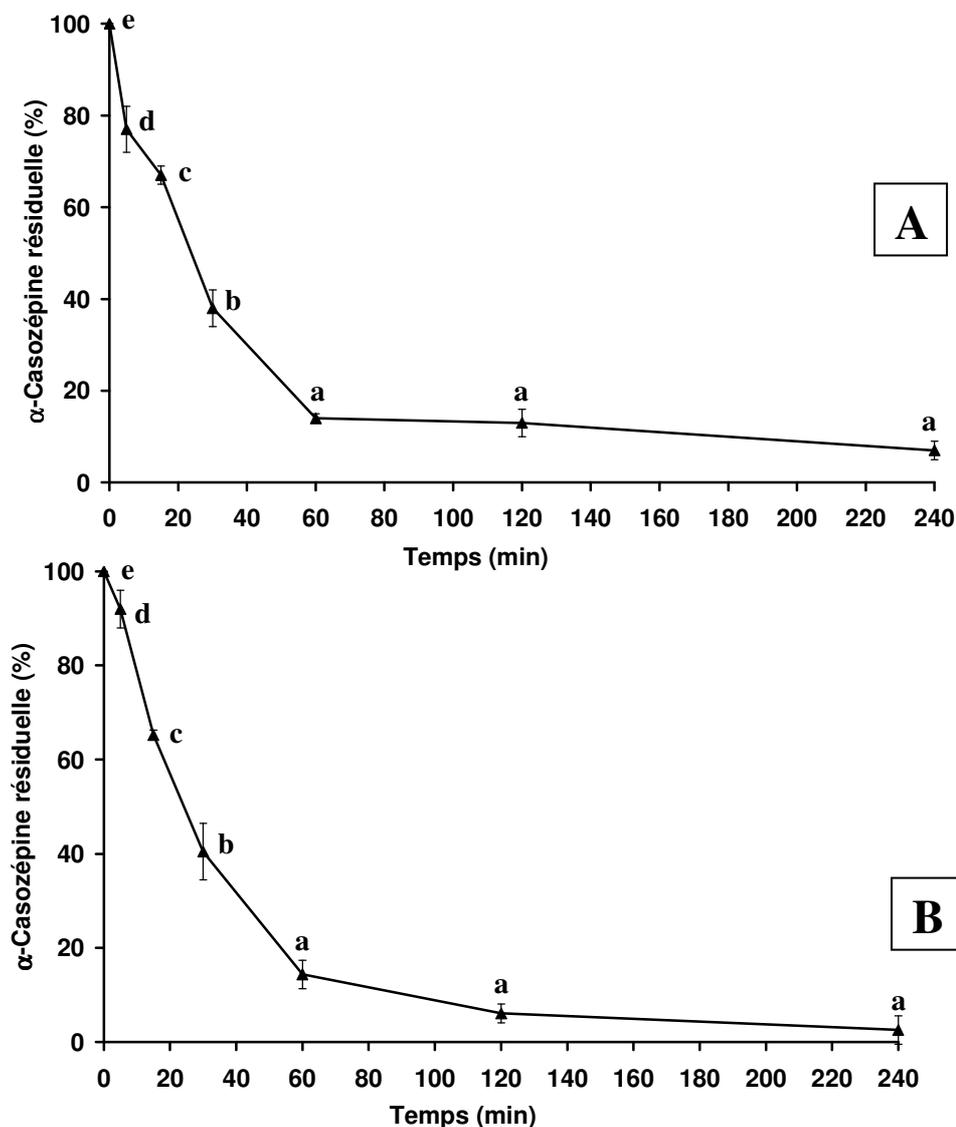


Figure 17 : Pourcentage d' α -casozépine résiduelle au cours de l'hydrolyse par la pepsine *in vitro*.

Hydrolyse de l' α -casozépine (\blacktriangle) (0,15 mg/mL) par la pepsine A de muqueuse gastrique porcine à pH 2,0 (A) et pH 4,0 (B) avec un rapport massique E/S=1/200 à 37°C . L' α -casozépine est séparée et détectée à 280 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5 % à 40 % (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1 % d'acide trifluoroacétique. La proportion d' α -casozépine résiduelle est exprimée en pourcentage par rapport à la quantité d' α -casozépine initiale. Deux points portant au moins une lettre identique ne diffèrent pas significativement, $N=2$, $P < 0.05$.

I.3. Caractérisation des fragments de l' α -casozépine libérés par la pepsine à pH 2,0 et à pH 4,0

Cinq peptides ont été identifiés dans le milieu réactionnel après hydrolyse pepsique (tableau 7), à pH 2,0 comme à pH 4,0. Ils correspondent aux fragments amino-terminaux $^{91}\text{YLGYLEQL}^{98}$, $^{91}\text{YLGYLEQ}^{97}$, et $^{91}\text{YLGYL}^{95}$, nommés respectivement F98, F97, F95, et aux fragments complémentaires carboxy-terminaux du F97 et du F95. Le peptide $^{99}\text{L-R}^{100}$ complémentaire du fragment F98 n'est pas mis en évidence par la méthode de spectrométrie de masse employée.

Le fragment F97 est le produit principal observé tout au long de la cinétique à pH 2,0 (figure 18A) et pH 4,0. Sa proportion atteint un maximum d'environ 88 % au bout de 120 min, alors que le taux maximum des fragments F95 et F98 n'excède pas 8 % après 120 min et 4 % après 30 min, respectivement (figure 18B). Les fragments amino-terminaux F95, F97 et F98 restent en proportions maximales dans le milieu réactionnel après 240 min d'hydrolyse. Ils ne sont donc pas substrats de la pepsine. Des résultats identiques sont obtenus à pH 4,0.

La pepsine est une endopeptidase préférant les substrats protéiques aux substrats peptidiques courts, elle possède une spécificité de coupure large, dépendant de l'environnement de la liaison coupée (Sachdev et Fruton, 1975).

Dans nos conditions expérimentales, la pepsine possède trois sites de coupure sur l' α -casozépine localisés entre les résidus $^{95}\text{L-E}^{96}$, $^{97}\text{Q-L}^{98}$ et $^{98}\text{L-L}^{99}$, ces sites étant des sites spécifiques de la pepsine (Fruton, 1976 ; Fruton, 2002 ; Keil, 1992). La liaison peptidique $^{97}\text{Q-L}^{98}$ est préférentiellement hydrolysée.

Les liaisons $^{92}\text{L-G}^{93}$, $^{94}\text{Y-L}^{95}$ et $^{99}\text{L-R}^{100}$ pourraient être des sites de coupures spécifiques de la pepsine (Fruton 2002 ; 1976 ; Keil 1992), mais ne sont pas clivées dans nos conditions expérimentales. La pepsine est une endopeptidase ce qui pourrait expliquer que les liaisons en position amino- et carboxy-terminale ($^{91}\text{Y-L}^{92}$, $^{99}\text{L-R}^{100}$) ne soient pas hydrolysées.

La pepsine libère principalement le fragment F97 (88 % de l' α -casozépine initiale), et minoritairement les fragments F98 et F95. Compte tenu de leurs séquences, les fragments F97 et F98 pourraient être hydrolysés par la pepsine pour générer le fragment F95, cependant leur proportion respective ne cesse d'augmenter au cours du temps dans le milieu réactionnel. Les fragments F97 et F98, de faible taille, semblent donc résistants à une hydrolyse ultérieure par la pepsine.

Tableau 7 : Identification des fragments peptidiques produits lors des hydrolyses réalisées *in vitro* sur l' α -casozépine.

Tous ces fragments sont séparés et détectés à 215 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique et caractérisés par spectrométrie de masse (LC/ESI-MS et MALDI-TOF). Par cette méthode, le peptide ⁹⁹L-R¹⁰⁰ et l'acide aminé R¹⁰⁰ ne sont pas détectés.

M_r trouvée	Identification	Séquence	M_r théorique	Nom*	Généré par
400.6	[98-100]	LLR	400.28	-	Pepsine Chymotrypsine Corolase
656.5	[96-100]	EQLLR	657.38	-	Pepsine Corolase
884.7	[91-97]	YLGYLEQ	884.43	F97	Pepsine Chymotrypsine Corolase
627.8	[91-95]	YLGYL	627.33	F95	Pepsine Corolase
997.7	[91-98]	YLGYLEQL	997.51	F98	Pepsine Chymotrypsine Corolase
1267.46	[91-100]	YLGYLEQLLR	1266.70	α - CZP	Trypsine
1110.8	[91-99]	YLGYLEQLL	1110.60	F99	Corolase

En gris : α -casozépine synthétique identifiée ultérieurement à partir de l'hydrolysats tryptique de la caséine α_s1 bovine (Miclo *et al.*, 2001).

*Fx = f(91-x)

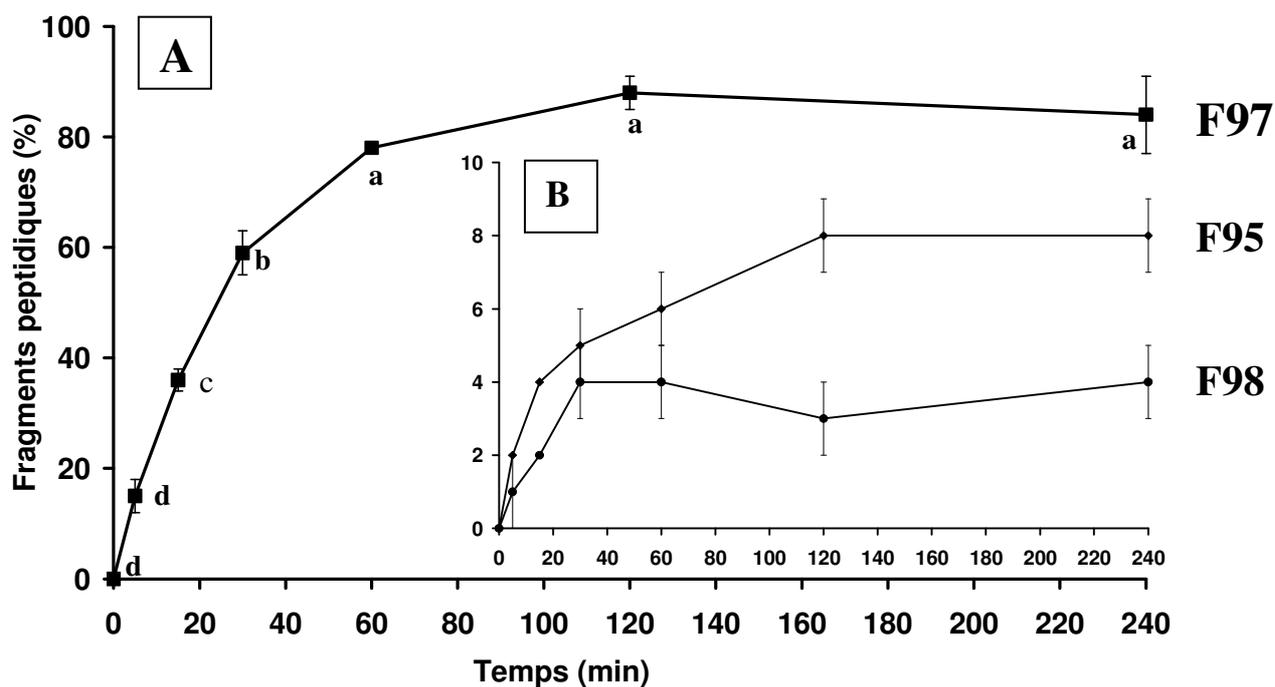


Figure 18 : Proportion des peptides F98, F97 et F95 issus de l'hydrolyse de l' α -casozépine par la pepsine.

Hydrolyse de l' α -casozépine (0,15 mg/mL) à 37°C par la pepsine A de muqueuse gastrique porcine à pH 2,0 avec un rapport E/S=1/200 (p/p). Les fragments peptidiques sont séparés et détectés à 280 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5 % à 40 % (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1 % d'acide trifluoroacétique, puis caractérisés par spectrométrie de masse (LC/ESI-MS et MALDI-TOF). Les peptides formés sont exprimés en pourcentage par rapport à la quantité d' α -casozépine initiale. Deux points portant au moins une lettre identique ne diffèrent pas significativement ($N=2$, $P < 0.05$). (A) fragment F97 (■) : YLGYLEQ, (B) fragment F98 (●) : YLGYLEQL et fragment F95 (◆) : YLGYL.

II. ETUDE DE L'HYDROLYSE DE L' α -CASOZEPINE PAR DES PEPTIDASES D'ORIGINE PANCREATIQUE

II.1 Etude de la dégradation de l' α -casozépine par l' α -chymotrypsine

Les résultats de l'hydrolyse de l' α -casozépine par l' α -chymotrypsine montrent une dégradation quasi linéaire de l' α -casozépine (perte de 0,19 % / min) entraînant un taux résiduel d' α -casozépine de 55 % après 4 h de réaction (figure 19).

Les trois produits identifiés correspondent aux fragments amino-terminaux F98 et F97 et au fragment carboxy-terminal complémentaire $^{98}\text{LLR}^{100}$ (tableau 7).

Le fragment F97 rapidement généré (7 % libéré dès les 5 premières minutes), atteint graduellement 20 % du taux initial de l' α -casozépine au bout de 240 min de réaction. Le fragment F98, généré en plus faible quantité, atteint un maximum de 5 % à la fin de la période d'hydrolyse (figure 20). Ces fragments, une fois libérés, ne semblent pas être des substrats de l'hydrolyse.

L' α -chymotrypsine possède une forte spécificité pour les liaisons peptidiques impliquant la partie carboxylique des résidus de F, Y, W, L (et une moins forte pour les résidus de M, A, D ; (<http://www.brenda-enzymes.info/>)). L' α -casozépine contient plusieurs sites de clivage potentiel par l' α -chymotrypsine. Cependant, les résultats mettent uniquement en évidence deux sites de coupures : $^{98}\text{L-L}^{99}$ (qui semble être un site préférentiel d'hydrolyse bien qu'elle soit située à l'extrémité du peptide) et $^{97}\text{Q-L}^{98}$ (qui ne semble pas être un site préférentiel de clivage de l' α -chymotrypsine). Cependant, dans une étude sur la caséine α_{s1} bovine, Perrin (1995) a mis en évidence une coupure non spécifique de l' α -chymotrypsine impliquant aussi un résidu de glutamine (liaison $^9\text{Q-G}^{10}$).

Inversement, dans nos conditions expérimentales, l' α -chymotrypsine n'hydrolyse pas la liaison $^{94}\text{Y-L}^{95}$ qui est un site potentiel de coupure (Bergmeyer, 1981).

II.2 Etude de la dégradation de l' α -casozépine par la trypsine

La trypsine n'hydrolyse pas significativement l' α -casozépine ce qui est attendu pour un peptide issu de l'hydrolyse trypsique de la caséine α_{s1} bovine (Miclo *et al.*, 2001).

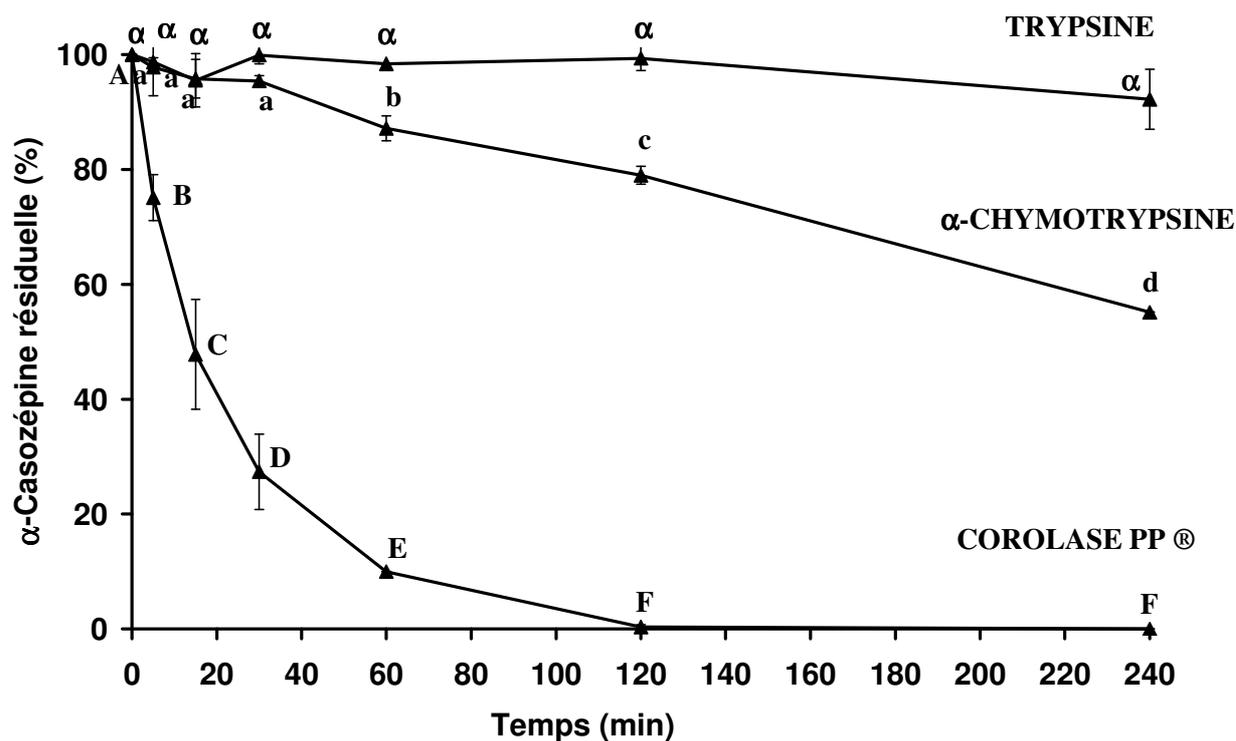


Figure 19 : Pourcentage d' α -casozépine résiduelle au cours de l'hydrolyse *in vitro* par la trypsine, l' α -chymotrypsine ou la Corolase PP®.

Ces hydrolyses de l' α -casozépine (\blacktriangle) (0,15 mg/mL) sont réalisées individuellement à pH 8,0 et à 37°C avec un rapport massique E/S=1/50 pour la trypsine et l' α -chymotrypsine et 1/100 pour la Corolase PP®. L' α -casozépine résiduelle est séparée et détectée à 280 nm au cours du temps par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5 % à 40 % (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1 % d'acide trifluoroacétique. La proportion d' α -casozépine résiduelle est exprimée en pourcentage par rapport à la quantité d' α -casozépine initiale. Deux points portant au moins une lettre identique ne diffèrent pas significativement ($N=2$, $P < 0.05$).

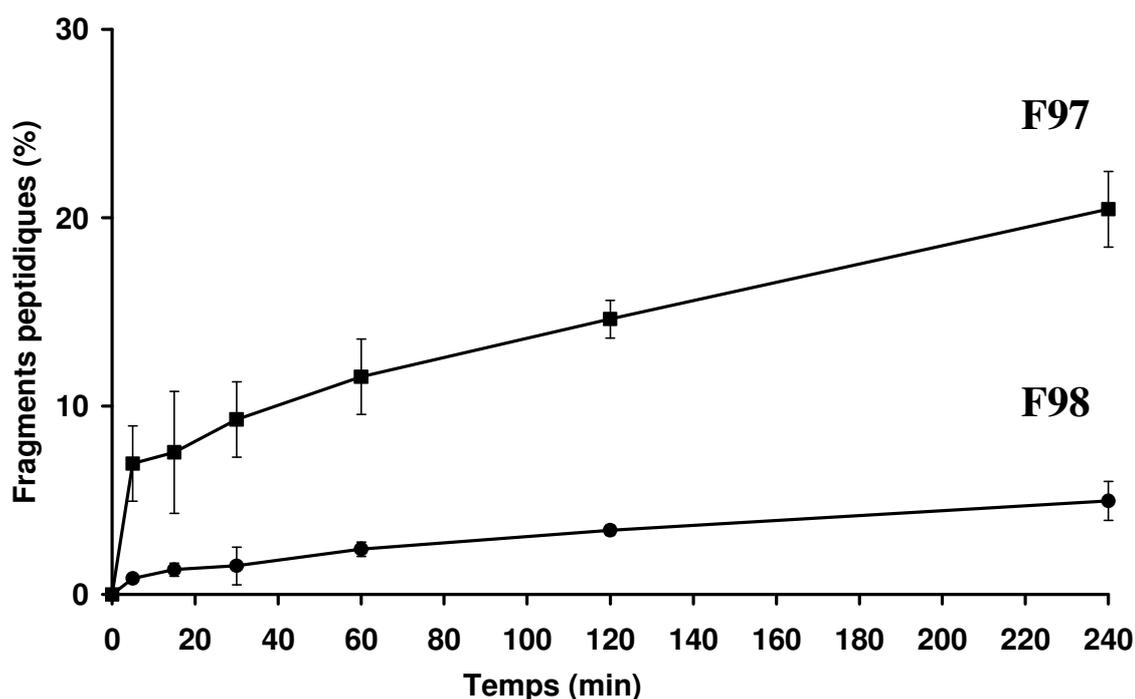


Figure 20 : Peptides F98 et F97 générés lors de l'hydrolyse de l' α -casozépine par l' α -chymotrypsine.

Hydrolyse effectuée à pH 8,0 et à 37°C avec un rapport massique de E/S=1/50. Les fragments peptidiques F97 (■) : YLGYLEQ et F98 (●) : YLGYLEQL sont séparés et détectés à 280 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique, puis caractérisés par spectrométrie de masse (LC/ESI-MS et MALDI-TOF). Les peptides formés sont exprimés en pourcentage par rapport à la quantité d' α -casozépine initiale, ($N=2$).

En présence de trypsine, seule une très faible dégradation de l' α -casozépine est observée entre 60 et 240 minutes, (1 % et 8 % à 120 et 240 min respectivement) (figure 19). Cette disparition est conjointement liée à l'apparition de deux pics correspondant aux fragments F97 et F98.

Les faibles proportions de fragments d'hydrolyse F97 et F98 (résultats non montrés) apparaissant à la fin de la cinétique sont vraisemblablement la conséquence d'une activité α -chymotrypsique résiduelle présente dans le lot de trypsine utilisé.

II.3 Etude de la dégradation de l' α -casozépine par la Corolase PP®

Cinquante pour cent de la quantité initiale de l' α -casozépine sont détectées après 15 min de contact avec l'ensemble des protéases pancréatiques présentes dans le mélange Corolase PP®. Néanmoins dès 120 min de réaction, il ne reste plus d' α -casozépine résiduelle (figure 19).

Six peptides ont été identifiés lors de la dégradation de l' α -casozépine par la Corolase PP®. Ils correspondent aux fragments F97 et F95 ainsi qu'à leurs séquences complémentaires carboxy-terminales, au fragment F98, et au fragment, $^{91}\text{YLGYLEQLL}^{99}$ nommé F99 (tableau 7).

Les fragments F99 et F98 atteignent un maximum de 55 % et 26 % de la quantité initiale d' α -casozépine respectivement au bout de 60 min. Ensuite ils décroissent jusqu'à 29 % de la quantité initiale d' α -casozépine pour F99 et 9 % de la quantité initiale d' α -casozépine pour F98. Les pourcentages de formation des fragments F97 et F95 continuent d'augmenter jusqu'à 240 min ; ils sont alors de 20 % et 40 % de la quantité initiale d' α -casozépine respectivement (figure 21).

Aux côtés de l' α -chymotrypsine et de la trypsine qui sont les endopeptidases majeures présentes dans la sécrétion pancréatique, d'autres endoprotéases telles que l'élastase, la collagénase et la kallikréine, ainsi que des exopeptidases, carboxypeptidases A et B et leucine-aminopeptidase sont également présentes dans ce liquide (Vaysse, 2005).

L'utilisation de Corolase PP® permet de s'approcher des conditions physiologiques auxquelles l' α -casozépine est confrontée *in vivo* dans le lumen.

Les fragments F97 et F98 sont générés par l' α -chymotrypsine et la Corolase PP®. Les cinétiques et les pourcentages de formation du fragment F97 sont identiques qu'il soit libéré par l' α -chymotrypsine ou la Corolase PP® (figure 22A) ce qui suggère que seule l' α -chymotrypsine générerait ce fragment peptidique à partir de l' α -casozépine au sein du mélange Corolase PP®.

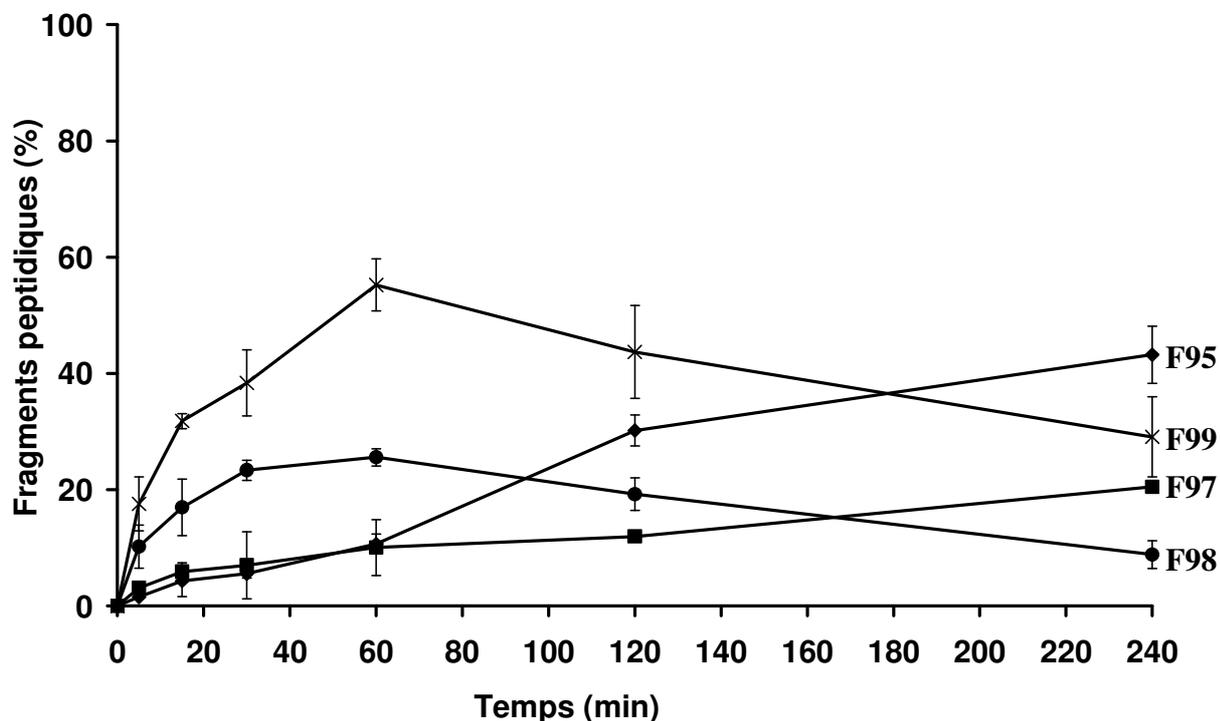


Figure 21 : Proportion des peptides F99, F98, F97 et F95 issus de l'hydrolyse de l' α -casozépine par la corolasePP®.

Hydrolyse réalisée à pH 8,0, à 37°C avec un rapport massique E/S=1/100 et N=2. Les fragments peptidiques F95 (◆) : YLGYL, F97 (■) : YLGYLEQ, F98 (●) : YLGYLEQL et F99 (x) : YLGYLEQLL sont séparés et détectés à 280 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5 % à 40 % (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1 % d'acide trifluoroacétique, puis caractérisés par spectrométrie de masse (LC/ESI-MS et MALDI-TOF). Les peptides formés sont exprimés en pourcentage par rapport à la quantité d' α -casozépine initiale (N=2).

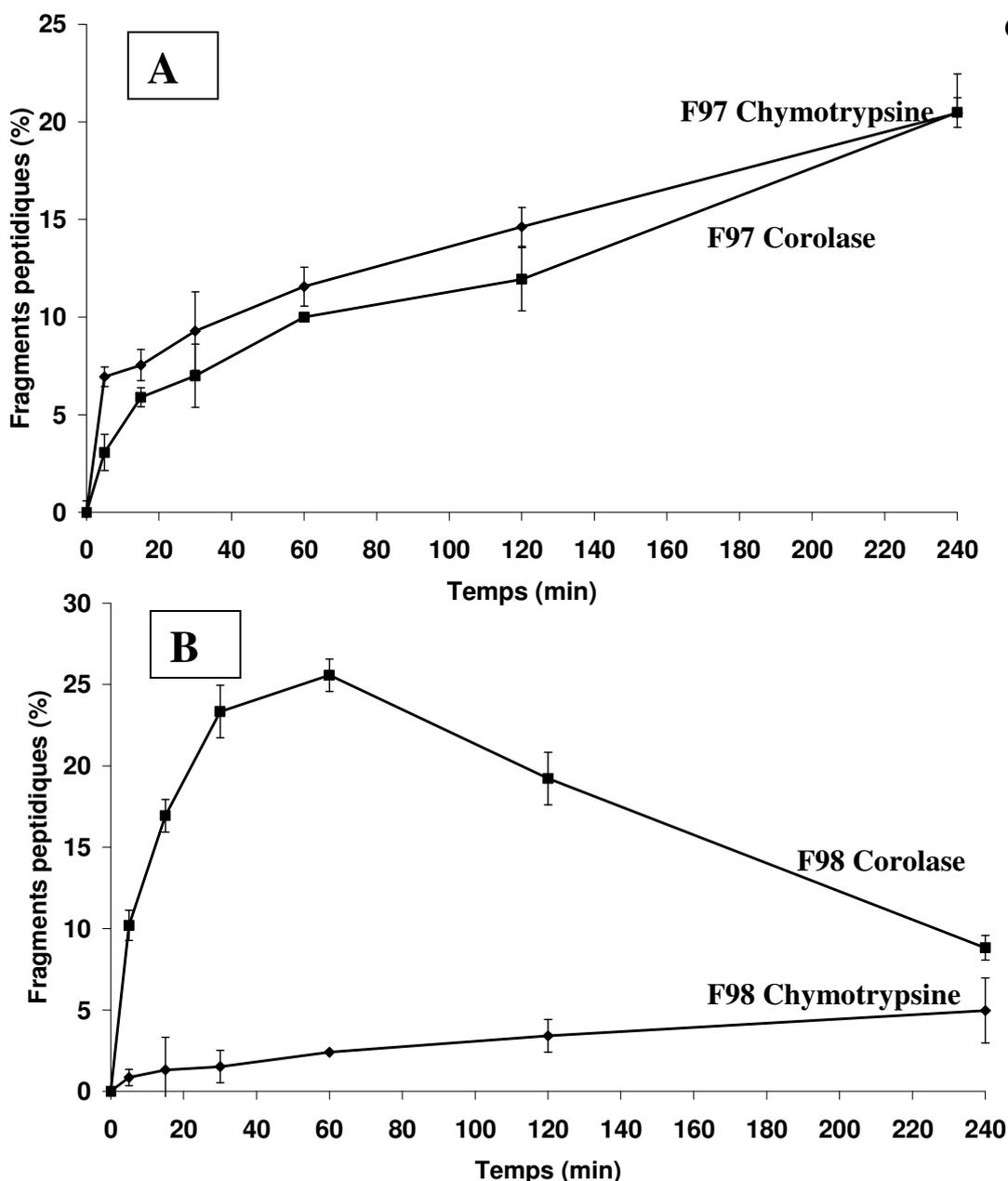


Figure 22 : Comparaison entre les cinétiques de formation des fragments F97 (A) et F98 (B) par l' α -chymotrypsine et la corolase PP®.

Les fragments F97 et F98 ont été obtenus lors des hydrolyses de l' α -casozépine par l' α -chymotrypsine effectuée à pH 8,0 et à 37°C avec un rapport massique de E/S=1/50 et par la Corolase PP® réalisée à pH 8,0 et à 37°C avec un rapport massique E/S=1/100. Ces fragments sont séparés et détectés à 280 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5 % à 40 % (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1 % d'acide trifluoroacétique, puis caractérisés par spectrométrie de masse (LC/ESI-MS et MALDI-TOF). Les peptides formés sont exprimés en pourcentage par rapport à la quantité d' α -casozépine initiale (N=2).

En revanche, les cinétiques et les pourcentages de formation du fragment F98 généré par l' α -chymotrypsine et la Corolase PP® sont différents ce qui met en évidence l'implication de protéases pancréatiques, autres que l' α -chymotrypsine, dans la genèse de ce fragment (figure 22B).

En présence de Corolase PP®, le fragment F95 est généré dès le début de la réaction mais sa production s'accroît à partir de 60 min. Il peut donc être le produit primaire de l'action d'une protéase sur l' α -casozépine mais aussi un produit secondaire obtenu par l'hydrolyse des fragments F98 et/ou F99 dont les taux diminuent après avoir atteint leur maximum au bout de 60 min de réaction (figure 21).

La détection du fragment F99 met en évidence l'action de la carboxypeptidase B agissant sur la liaison $^{99}\text{L-R}^{100}$.

L'extrémité amino-terminale de l' α -casozépine est totalement épargnée par l'action de ces enzymes pancréatiques en préservant la séquence contenant les deux résidus tyrosyls..

II.4. Simulations de dégradation gastrique puis pancréatique

II.4.1. Hydrolyse pepsique de l' α -casozépine suivie d'une hydrolyse par un mélange composé de trypsine et d' α -chymotrypsine

Il reste 7 % d' α -casozépine résiduelle dans le milieu réactionnel après 120 minutes d'hydrolyse pepsique à pH 2,0 (figure 23A). Cette proportion reste constante après addition du mélange trypsine + α -chymotrypsine dans le milieu réactionnel.

Les pourcentages des peptides F95, F97 et F98 issus de l'hydrolyse pepsique de l' α -casozépine pendant 120 min (11 %, 71 % et 7 %, respectivement) restent inchangés après l'ajout des deux protéases pancréatiques, trypsine et α -chymotrypsine (figure 23B)

La trypsine n'a pas d'action protéolytique sur l' α -casozépine (d'après les résultats II.2). Seule l' α -chymotrypsine pourrait dégrader l' α -casozépine résiduelle mais ce n'est pas le cas dans nos conditions expérimentales. Le taux résiduel d' α -casozépine après hydrolyse pepsique est de 7 % de la quantité initiale d' α -casozépine et la dégradation de cette quantité résiduelle d' α -casozépine par l' α -chymotrypsine peut être très lente, 0,19 %/min (figure 19). L' α -chymotrypsine n'a pas d'action sur ces produits issus de l'hydrolyse pepsique. Effectivement les résultats obtenus lors de l'hydrolyse de l' α -casozépine par l' α -chymotrypsine (II.3) nous indiquent également que les fragments F98 et F97 ne sont pas des substrats pour cette enzyme.

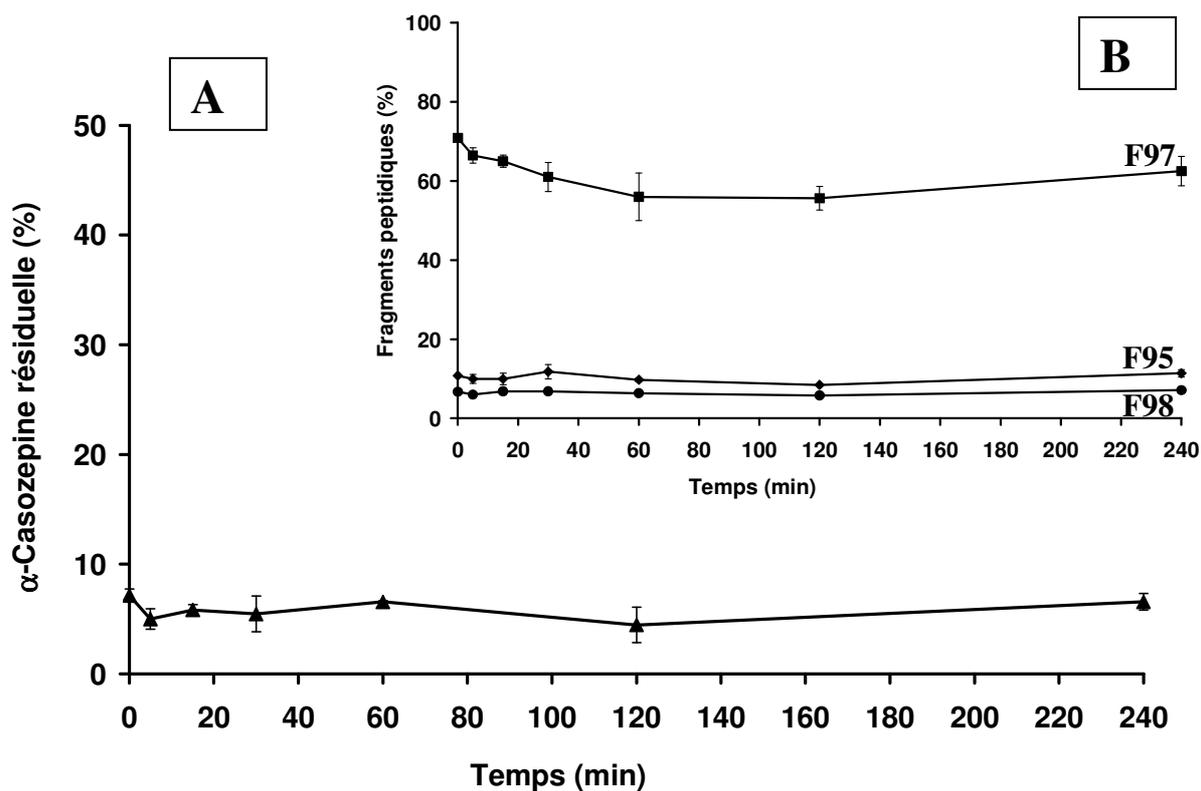


Figure 23 : (A) Pourcentage d'α-Casozépine résiduelle et (B) cinétique de libération des peptides F98, F97 et F95 (%) pendant l'hydrolyse réalisée en présence d'un mélange de trypsine et d'α-chymotrypsine.

L'α-casozépine (▲) (0,15 mg/mL) est soumise préalablement à une hydrolyse pepsique réalisée à pH 2,0 et à 37°C avec un rapport massique enzyme/substrat de 1/200, pendant 2 h. L'α-casozépine résiduelle est ensuite soumise à l'hydrolyse par un mélange d'α-chymotrypsine et de trypsine avec un rapport massique enzyme/substrat de 1/50 pour chaque enzyme dans une solution tampon phosphate à pH 8,0 pendant 4 h à 37°C. L'α-casozépine résiduelle et les fragments libérés, F97 (■), F95 (◆) et F98 (●) sont séparés et détectés à 280 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique, puis caractérisés par spectrométrie de masse (LC/ESI-MS et MALDI-TOF). Les peptides formés et la proportion d'α-casozépine résiduelle sont exprimés en pourcentage par rapport à la quantité d'α-casozépine initiale.

II.4.2. Etude de la dégradation pepsique de l' α -casozépine suivie d'une hydrolyse par la Corolase PP®

Après deux heures de traitement par la pepsine à pH 2,0 il ne reste que 6 % d' α -casozépine résiduelle et les fragments F95, F97 et F98 sont générés (figure 24A).

Après l'ajout de la Corolase PP®, les 6 % d' α -casozépine restant sont totalement dégradés après 4 h, les produits pepsiques F97 et F98 ne sont pas dégradés, leur pourcentage reste constant tout au long de la réaction, le fragment F95 est de nouveau faiblement généré, passant de 10 % au temps 0 de l'ajout de la Corolase PP® à 20 % en fin de réaction et le fragment F99 est généré (figure 24A et 24B).

La Corolase PP® hydrolyse encore la faible proportion d' α -casozépine résiduelle. La Corolase PP® génère le fragment F99 impliquant l'action de la carboxypeptidase B, augmente le taux de F95 et ne modifie pas les proportions de F98 et F97 générés par la pepsine. Aucune activité aminopeptidasique n'a été mise en évidence lors de l'action de la Corolase PP® sur l' α -casozépine.

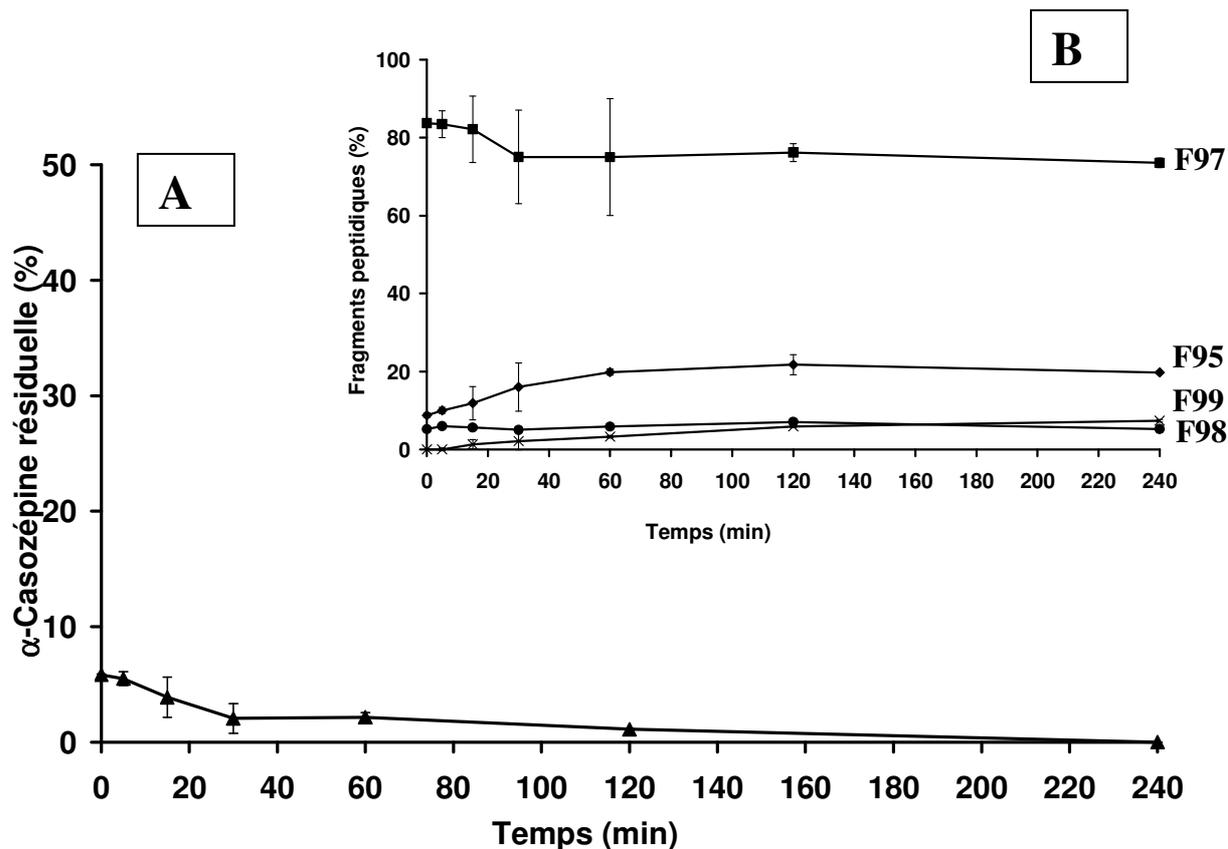


Figure 24 : (A) Pourcentage d'α-Casozépine résiduelle et (B) cinétique de libération des peptides F99, F98, F97 et F95 (%) pendant l'hydrolyse réalisée en présence de corolasePP®. L'α-casozépine (▲) (0,15 mg/mL) est soumise préalablement à une hydrolyse pepsique réalisée à pH 2,0 et à 37°C, avec un rapport massique enzyme/substrat de 1/200, pendant 2 h. L'α-casozépine résiduelle est ensuite soumise à l'hydrolyse par la CorolasePP® avec un rapport massique enzyme/substrat de 1/100 dans une solution tampon phosphate à pH 8,0 pendant 4 h à 37°C. L'α-casozépine résiduelle et les fragments libérés, F97 (■), F95(◆), F98 (●), F99(x) sont séparés et détectés à 280 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5 % à 40 % (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1 % d'acide trifluoroacétique, puis caractérisés par spectrométrie de masse (LC/ESI-MS et MALDI-TOF). Les peptides formés et la proportion d'α-casozépine résiduelle sont exprimés en pourcentage par rapport à la quantité d'α-casozépine initiale.

Conclusion

L' α -casozépine, décapeptide issu de l'hydrolyse trypsique de la caséine α_{s1} bovine, possède une activité benzodiazépine-mimétique. Elle rentre en compétition avec les benzodiazépines pour le site benzodiazépine du récepteur à l'acide γ -amino-butérique de type A (GABA_A) (Miclo *et al.*, 2001). D'après Lecouvey *et al.* (1997), l'intégralité du décapeptide semble indispensable à l'activité benzodiazépine mimétique.

Le peptide seul a prouvé son efficacité *in vivo* après injection intra péritonéale, voie qui exclut le tractus gastro-intestinal (Miclo *et al.*, 2001), mais aussi après administration orale, de l'hydrolysats trypsique industriel (Lactium®) encapsulé (Kim *et al.*, 2007 ; Messaoudi *et al.*, 2005), ou non (Guesdon *et al.*, 2006 ; Violle *et al.*, 2006).

Cependant lorsque l' α -casozépine est administrée par voie orale on ignore si elle résiste, lors du trajet effectué pour atteindre sa cible potentielle au niveau du système nerveux central, aux enzymes du tractus gastro-intestinal. C'est pourquoi, dans un premier temps, le devenir de l' α -casozépine dans des modèles de digestion *in vitro* utilisant la pepsine (estomac), la trypsine, l' α -chymotrypsine ou la Corolase PP® (intestin grêle) ou la pepsine associée à la trypsine et à l' α -chymotrypsine ou la pepsine associée à la Corolase PP® (estomac puis intestin grêle) a été étudié. Les conditions expérimentales peuvent être considérées comme particulièrement drastiques pour le peptide d'intérêt.

Ces études de modélisation de digestion *in vitro* ont permis d'évaluer le degré de dégradation et les sites d'hydrolyse de l' α -casozépine par les différentes enzymes étudiées.

Dans nos conditions expérimentales, l' α -casozépine n'est pas épargnée par l'action de la pepsine à pH 2,0 et pH 4,0. Toutefois 14 % reste intact après une heure de réaction et encore 3 à 6 % après 4 h. Cette résistance partielle provient probablement du fait que la pepsine est une protéase plus spécifique des oligopeptides et des protéines que des peptides. Des cinétiques de 2 et 4 heures ont été effectuées alors que vraisemblablement, *in vivo*, la vidange gastrique de l' α -casozépine ingérée seule serait d'une heure environ. Le séjour dans l'estomac peut aller de 1 à 4 h en fonction de la quantité et de la qualité du bol alimentaire. Ainsi environ 15 % de peptide résiduel pourraient se retrouver au niveau du duodénum.

La trypsine n'agit pas sur l' α -casozépine, la chymotrypsine la dégrade faiblement au cours du temps (80 % d' α -casozépine résiduelle après 2 h d'hydrolyse et encore 60 % après 4 h),

tandis que la Corolase PP® la dégrade totalement au bout de 2 h de réaction. Les simulations d'hydrolyses par les enzymes gastriques et pancréatiques indiquent que le faible pourcentage de peptide pepsique résiduel est dégradé par le mélange Corolase PP® et pas par l' α -chymotrypsine.

Pour apporter le peptide actif en plus forte proportion dans le lumen il faudrait dans un premier temps éviter l'hydrolyse gastrique. C'est pourquoi l'hydrolysate commercialisé encapsulé libère au niveau intestinal l' α -casozépine (environ 4% du poids de l'hydrolysate) et les autres fragments tryptiques. La présence de l'ensemble des fragments peptidiques issus de l'hydrolyse tryptique de la caséine α_{s1} peut diminuer le degré d'hydrolyse de l' α -casozépine en la protégeant de l'attaque enzymatique par compétition. Intégrer l' α -casozépine à un aliment protéique, qui devient ainsi fonctionnel et cible supplémentaire pour les protéases digestives, peut également être un moyen de la protéger de l'attaque par de la pepsine et les enzymes pancréatiques.

Des fragments peptidiques sont formés lors de la dégradation *in vitro* de l' α -casozépine par les enzymes d'origine gastrique et pancréatique. Le fragment F97 est le produit majoritairement libéré par la dégradation pepsique de l' α -casozépine, environ 80 % en une heure, ce taux reste constant jusqu'à la fin de la réaction et le peptide n'est pas hydrolysé par la Corolase PP®. D'autres fragments sont également formés par l'hydrolyse pepsique de l' α -casozépine, F95 et F98 (en plus faible proportion). Lors de l'ajout de la Corolase PP® le fragment F95 n'est pas dégradé il est même formé de nouveau, tandis que le fragment F98 est très légèrement dégradé. Un nouveau produit est obtenu par cette hydrolyse, le fragment F99 qui est dû à la présence de la carboxypeptidase B dans le mélange Corolase PP®.

La caractérisation des produits d'hydrolyse a montré que la partie amino-terminale de l' α -casozépine était particulièrement stable. La perte de l'extrémité carboxy-terminale devrait induire une absence d'effet anxiolytique des peptides F97, F98 et F99 étant donnée que le résidu arginyl 100 semble nécessaire pour conserver une structure active mimant celle des cycles aromatiques des benzodiazépines (Lecouvey *et al.*, 1997).

Ainsi à la vue de l'ensemble des résultats obtenus plusieurs hypothèses concernant le mécanisme d'action de l' α -casozépine peuvent être émises :

- Le pourcentage d' α -casozépine résiduelle qui pourrait être obtenue *in vivo* peut suffire si le peptide est ensuite résistant aux peptidases de la bordure en brosse, puis être absorbé en

quantité suffisante au niveau de l'épithélium intestinal pour atteindre la circulation sanguine, et passer la barrière hémato-encéphalique pour se lier au site BZD du récepteur GABA_A.

- L' α -casozépine est active sur des récepteurs localisés au niveau stomacal ou intestinal directement ou indirectement impliqués dans l'activité anxiolytique. Un taux faible de peptide intact pourrait ainsi suffire.

- Les fragments plus courts F97 et F95 libérés en quantité suffisante à la suite des hydrolyses pepsiques et résistants aux enzymes d'origine gastrique et pancréatique pourraient être porteurs de l'activité biologique bien qu'ils soient dépourvus de l'extrémité carboxy-terminale. Ils pourraient agir par le biais de récepteurs localisés au niveau stomacal ou intestinal, auquel cas leur action serait immédiate après libération pepsique ou pancréatique. Ils pourraient aussi exercer leur action sur le site BDZ du récepteur GABA_A situé niveau cérébral ce qui nécessite que ces fragments soient résistants aux enzymes intestinales et plasmatiques et puissent traverser l'épithélium intestinal.

CHAPITRE II

ETUDE DE L'HYDROLYSE DE L' α -CASOZEPINE ET DU FRAGMENT F97 PAR LES PEPTIDASES DES VESICULES MEMBRANAIRES DE BORDURE EN BROSSE D'ENTEROCYTES DE RATS WISTAR

Les deux premières barrières qui limitent la diffusion des peptides à activité biologique, ou thérapeutiques en administration orale sont : la faible perméabilité de l'épithélium intestinal et la dégradation enzymatique. Tout au long du tractus gastro-intestinal la dégradation des peptides peut intervenir, au niveau de l'estomac par la pepsine, au niveau de l'intestin grêle par les enzymes pancréatiques (chapitre I) mais aussi par les peptidases intestinales secrétées et principalement par celles enchâssées dans la membrane de la bordure en brosse dont le site actif est positionné à la surface externe des membranes plasmiques des entérocytes (Bernkop-Schnürch, 1998 ; Kania *et al.*, 1972 ; Langguth, 1997). Les peptidases membranaires, endo-et exopeptidases sont actives sur les tri-, térapeptides et sur les peptides possédant jusqu'à dix résidus d'acide aminé. Parmi les exopeptidases de la bordure en brosse intestinale, les aminopeptidases sont abondantes. L'aminopeptidase N, protéase à zinc abondante au niveau des microvillosités intestinales est présente chez l'Homme et le rat (Miura *et al.*, 1983 ; Pauletti *et al.*, 1996), et possède une large spécificité (Adibi et Kim, 1981). L'aminopeptidase A qui hydrolyse au niveau de l'extrémité amino-terminale les résidus d'acides aminés Glu et Asp, a été caractérisée au niveau des membranes de la bordure en brosse intestinale chez l'Homme, le cochon, le lapin et le rat (Benajiba et Maroux, 1980). La carboxypeptidase M, présente au niveau des membranes des entérocytes, hydrolyse les résidus K et R en position carboxy-terminale. L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) ou peptidyl dipeptidase A, inhibée par le captopril (<http://www.brenda-enzymes.info/>), libère une grande variété de dipeptides carboxy-terminaux, chez l'Homme comme chez le rat (Erickson *et al.*, 1992 ; Yoshioka *et al.*, 1987). Deux endopeptidases ont été identifiées et caractérisées chez le rat comme chez l'Homme, l'endopeptidase 24.11 qui a une activité mimant celle de la chymotrypsine et l'endopeptidase 24.18 qui hydrolyse la liaison ³G-F⁴ des enképhalines, peptides opiacés endogènes (Barnes *et al.*, 1988).

Aux vues de la spécificité de ces peptidases, il nous a semblé pertinent, après les études faites avec la pepsine et les enzymes pancréatiques, d'évaluer le comportement de l' α -casozépine face aux peptidases intestinales de la bordure en brosse. Le modèle d'étude *in vitro*, les vésicules de membrane de la bordure en brosse d'entérocytes de rat, de lapin ou de porc est souvent employé pour évaluer le degré de dégradation enzymatique des peptides et leur taux de transfert au travers des entérocytes (Heizmann *et al.*, 1996 ; Huneau *et al.*, 1994 ; Langguth *et al.*, 1994).

La proportion importante de fragment F97 libéré lors des hydrolyses pepsiques de l' α -casozépine et la résistance de ce peptide vis-à-vis des peptidases pancréatiques nous a poussé à évaluer également la résistance de ce fragment peptidique face aux peptidases intestinales.

Dans nos conditions expérimentales, le degré d'hydrolyse de l' α -casozépine et du fragment F97 par les peptidases de la membrane de la bordure en brosse a été déterminé et les produits formés au cours du temps ont été caractérisés.

Suite aux résultats obtenus lors de la première série d'expériences nous avons réalisé d'autres approches en présence d'inhibiteurs spécifiques d'une certaine classe de peptidases, afin de caractériser la ou les peptidase(s) responsable(s) de la dégradation des peptides étudiés.

I. ETUDE DE L'HYDROLYSE DE L' α -CASOZEPINE ET DU FRAGMENT F97 PAR LES PEPTIDASES MEMBRANAIRES DE LA BORDURE EN BROSSE

I.1. Cinétique de dégradation de l' α -casozépine

Dans nos conditions expérimentales, dès les 10 premières minutes de réaction 50 % de l' α -casozépine initialement présente sont dégradées. Le peptide a totalement disparu après une heure de réaction (figure 25A).

I.1.1. Produits générés et cinétiques de formation

Douze peptides et de la tyrosine libre ont été identifiés et quantifiés dans le milieu réactionnel (tableau 8). La tyrosine est le produit majoritairement libéré (figure 25B).

Les fragments $^{92}\text{LGYLEQLLR}^{100}$, $^{93}\text{GYLEQLLR}^{100}$, $^{94}\text{YLQLLR}^{100}$ sont issus d'hydrolyses intervenant dans la partie amino-terminale de l' α -casozépine (figure 26A).

Le fragment $^{92}\text{LGYLEQLLR}^{100}$ est obtenu par l'action d'une aminopeptidase sur l' α -casozépine. Ce fragment représente au bout de 5 min, 13 % de l' α -casozépine initiale, puis est à son tour dégradé progressivement et disparaît totalement du milieu réactionnel au bout d'une heure. Sa dégradation par une aminopeptidase peut générer le produit $^{93}\text{GYLEQLLR}^{100}$ et, par une dipeptidyl peptidase le produit $^{94}\text{YLEQLLR}^{100}$.

Le produit $^{93}\text{GYLEQLLR}^{100}$ libéré dès les premières minutes, atteint un maximum, représentant 6 % de l' α -casozépine initiale, après 15 minutes. Ce pourcentage stagne entre 15 et 30 minutes, traduisant d'une vitesse de génération égale à la vitesse de dégradation du

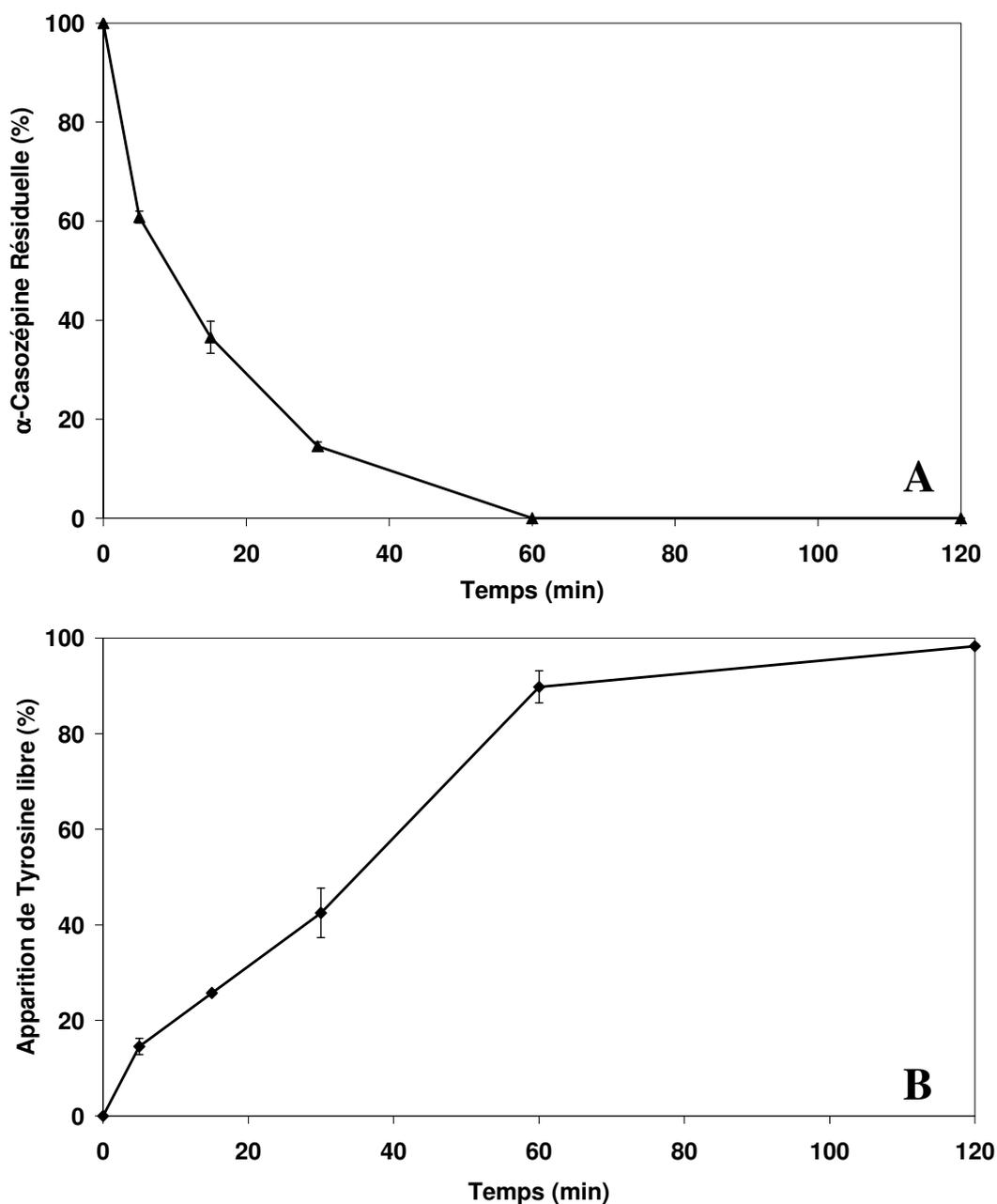


Figure 25 : Cinétiques de dégradation de l' α -casozépine (A) et d'apparition de tyrosine libre (B) au cours du temps lors de l'hydrolyse par les vésicules de membrane de la bordure en brosse d'entérocytes (VMBB) de rats Wistar.

Ces hydrolyses sont réalisées *in vitro* dans un tampon Mes/KOH à pH 7,4 et à 37°C pendant 2 h. L' α -casozépine et la tyrosine libre sont séparés et détectés à 280 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique. La proportion d' α -casozépine résiduelle et la formation de tyrosine libre sont exprimées en pourcentage par rapport à la quantité initiale d' α -casozépine, (N=2).

Tableau 8 : Caractérisation par spectrométrie de masse des fragments peptidiques générés par l'hydrolyse de l' α -casozépine par les peptidases présentes au niveau des vésicules de membrane de la bordure en brosse d'entérocytes de rats.

Ces fragments sont obtenus *in vitro* lors de la dégradation de l' α -casozépine par les peptidases de la bordure en brosse d'épithélium intestinal de rats dans un tampon Mes/KOH à pH 7,4 et à 37°C pendant 2 h. Les fragments peptidiques libérés sont séparés et détectés à 280 nm et 215 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique, puis caractérisés par spectrométrie de masse (LC/ESI-MS et MALDI-TOF). Les acides aminés libres Leucine (L) en concentration trop faible, Glycine (G) et Arginine (R) trop hydrophiles pour être retenus, ne sont pas identifiés par cette méthode.

<i>M_r</i> trouvée	Identification	Séquence	<i>M_r</i> théorique	Nom*
181.1	[91], [94]	Y	181.07	-
287.3	[99-100]	LR	287.20	-
388.4	[95-97] et ou [96-98]	LEQ et ou EQL	388.20	-
400.5	[98-100]	LLR	400.28	-
657.8	[96-100]	EQLLR	657.38	-
721.7	[92-97]	LGYLEQ	621.36	-
770.69	[95-100]	LEQLLR	770.47	-
884.6	[91-97]	YLGYLEQ	884.43	F97
627.7	[91-95]	YLGYL	627.33	F95
933.8	[94-100]	YLEQLLR	933.53	-
990.8	[93-100]	GYLEQLLR	990.55	-
997.7	[91-98]	YLGYLEQL	997.51	F98
1103.9	[92-100]	LGYLEQLLR	1103.63	-
1267.79	[91-100]	YLGYLEQLLR	1267.49	α -casozépine

* Fx= fragment 91-x

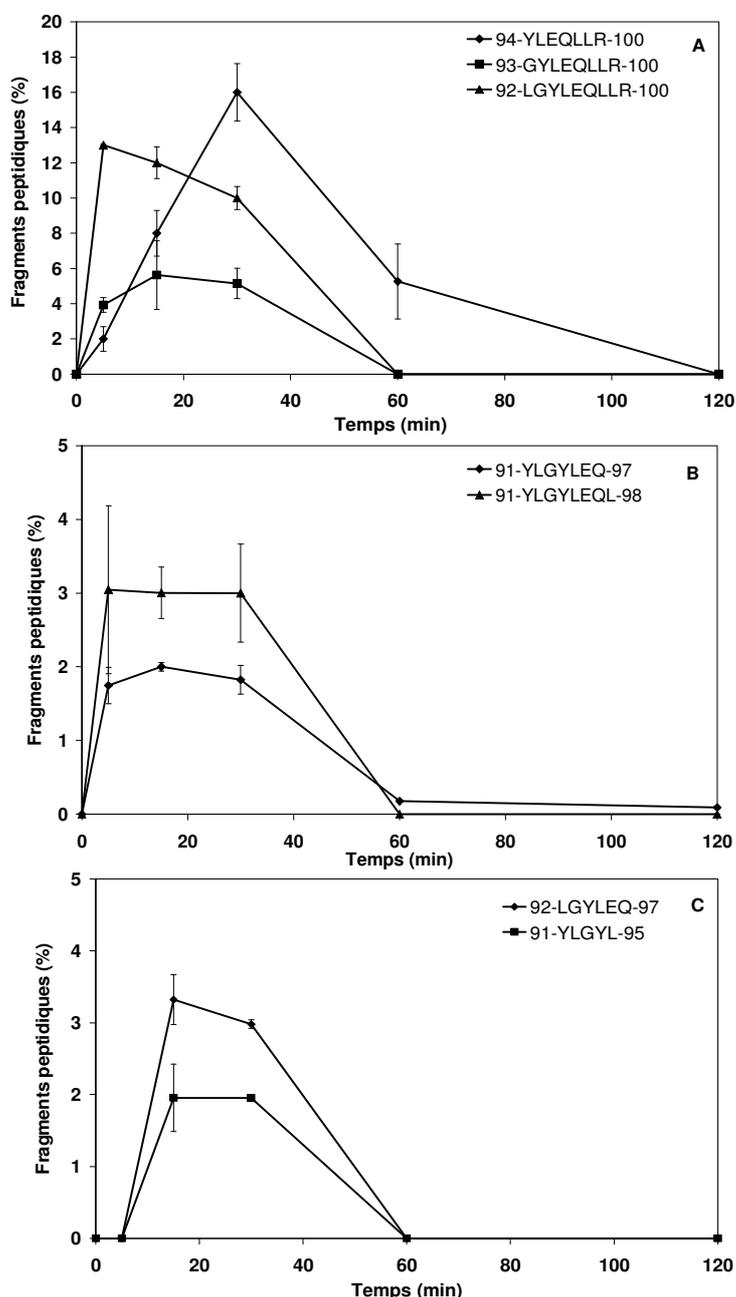


Figure 26 : Cinétiques de formation des peptides YLEQLLR, YLGYLEQ et LGYLEQ obtenus lors de la dégradation de l' α -casozépine par les VMBB d'entérocytes de rats Wistar. Ces fragments sont obtenus *in vitro* lors de la dégradation de l' α -casozépine (0,2 mg/mL) par les peptidases de la bordure en brosse d'épithélium intestinal de rats dans un tampon Mes/KOH à pH 7,4 et à 37°C pendant 2 h. Les fragments peptidiques libérés sont séparés et détectés à 280 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique, puis caractérisés par spectrométrie de masse (LC/ESI-MS et MALDI-TOF). Les taux d'apparition des fragments peptidiques sont exprimés en pourcentage par rapport à la quantité initiale d' α -casozépine, ($N=2$).

fragment, cette dégradation est possible par une aminopeptidase qui génère alors le produit $^{94}\text{YLEQLLR}^{100}$. Le fragment $^{94}\text{YLEQLLR}^{100}$ est libéré dès le début de la réaction mais plus lentement que les fragments $^{92}\text{LGYLEQLLR}^{100}$ ou $^{93}\text{GYLEQLLR}^{100}$ et représente 16 % du taux initial d' α -casozépine en 30 min. Il est ensuite dégradé mais correspond à un taux de 6 % de l' α -casozépine initiale au bout d'une heure de réaction. Sa cinétique de dégradation pourrait correspondre à la cinétique de libération du fragment $^{95}\text{LEQLLR}^{100}$ (figure 27) par l'action d'une aminopeptidase sur la liaison $^{94}\text{Y-L}^{95}$.

Les produits $^{91}\text{YLGYLEQL}^{98}$ et $^{91}\text{YLGYLEQ}^{97}$ issus des hydrolyses intervenant dans l'extrémité carboxy-terminale, sont également libérés dès le début de la réaction mais en très faible quantité par rapport à la quantité d' α -casozépine initiale (figure 26B). Ils représentent respectivement un maximum de 2 % et 3 % du taux initial d' α -casozépine au bout de 5 minutes d'hydrolyse. Ces pourcentages stagnent pendant 25 min traduisant d'une vitesse d'apparition égale à la vitesse de dégradation. Puis la dégradation l'emporte sur la génération entraînant une disparition totale de ces deux fragments au bout d'une heure.

Le produit $^{91}\text{YLGYLEQL}^{98}$ peut être obtenu soit avec deux hydrolyses successives par carboxypeptidase de l' α -casozépine libérant alors un produit intermédiaire non détecté ($^{91}\text{YLGYLEQLL}^{99}$), soit par l'action d'une peptidyl dipeptidase sur l' α -casozépine, mais la cinétique de formation de $^{99}\text{LR}^{100}$ qui est seulement détecté après 15 min de réaction, (figure 27) ne confirme pas cette deuxième hypothèse. Le fragment $^{91}\text{YLGYLEQL}^{98}$ peut ensuite générer le produit secondaire $^{91}\text{YLGYLEQ}^{97}$ par l'action d'une carboxypeptidase.

Les produits $^{91}\text{YLGYL}^{95}$ et $^{92}\text{LGYLEQ}^{97}$ n'apparaissent qu'après 5 minutes de réaction (figure 26C). Leurs proportions respectives correspondent au maximum à 2 % et 3 % du taux d' α -casozépine initial au bout de 15 minutes de réaction puis ils sont dégradés pour disparaître au bout de 60 minutes.

Le peptide $^{92}\text{LGYLEQ}^{97}$ pourrait être généré par l'action d'une aminopeptidase sur le fragment $^{91}\text{YLGYLEQ}^{97}$ ou par l'action d'une endopeptidase sur le fragment $^{92}\text{LGYLEQLLR}^{100}$.

Le peptide $^{91}\text{YLGYL}^{95}$ peut être issu du peptide $^{91}\text{YLGYLEQ}^{97}$ par l'action d'une peptidyl dipeptidase, ou de l' α -casozépine par l'action d'une endopeptidase ou encore du peptide $^{91}\text{YLGYLEQL}^{98}$ par l'action d'une carboxypeptidase puis d'une peptidyl dipeptidase ou de trois hydrolyses faisant intervenir des carboxypeptidases.

Les hypothèses concernant la formation des fragments sont résumées sur la figure 28.

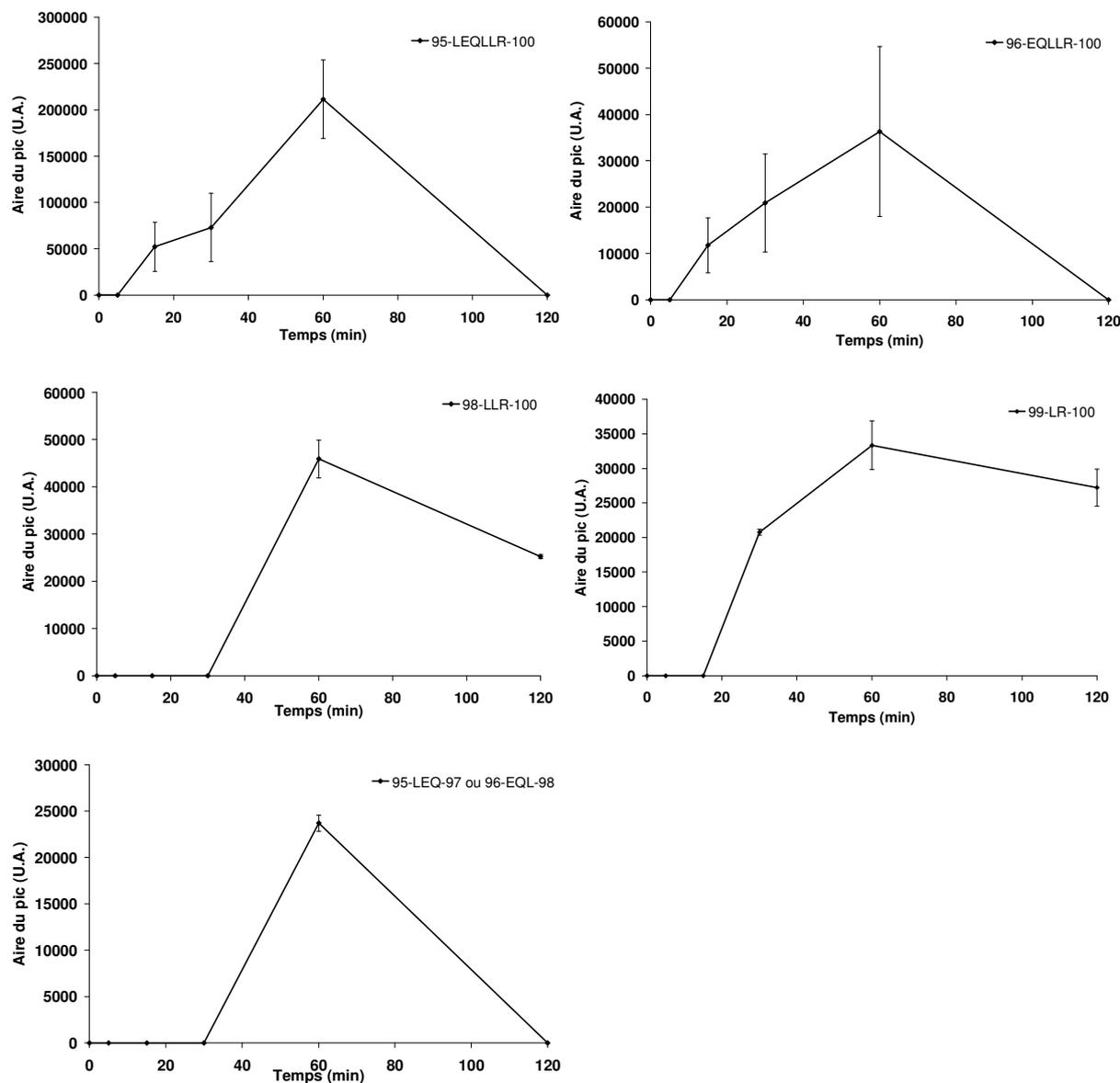


Figure 27 : Cinétiques de formation des peptides LEQLLR, EQLLR, LLR, LR et LEQ ou EQL obtenus lors de la dégradation de l' α -casozépine par les VMBB d'entérocytes de rats Wistar.

Ces fragments sont obtenus *in vitro* lors de la dégradation de l' α -casozépine (0,2 mg/mL) par les peptidases de la bordure en brosse d'épithélium intestinal de rats dans un tampon Mes/KOH à pH 7,4 et à 37°C pendant 2 h. Les fragments peptidiques libérés sont séparés et détectés à 215 nm (car ils ne contiennent pas de résidu aromatique) par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique, puis caractérisés par spectrométrie de masse (LC/ESI-MS et MALDI-TOF), ($N=2$), U.A. (Unité Arbitraire)

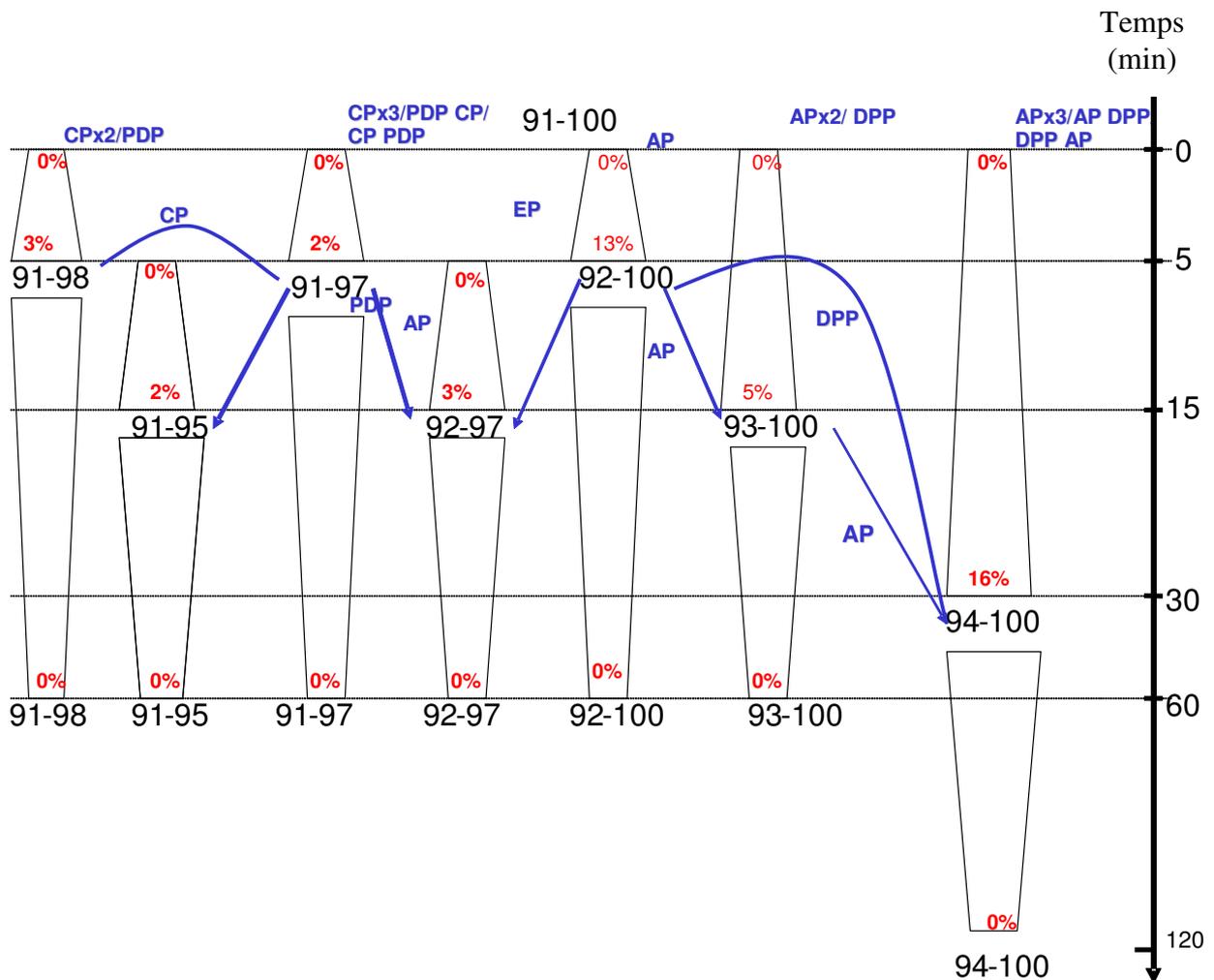


Figure 28 : Hypothèse de formation par les peptidases présentes au niveau des membranes des entérocytes de la bordure en brosse des peptides identifiés

AP pour Aminopeptidase, PDP pour Peptidyl dipeptidase, CP pour Carboxypeptidase, DPP pour Dipeptidyl peptidase et EP pour Endopeptidase. CP ou AP x N signifie N fois l'action de telle ou telle peptidase. Les fragments peptidiques sont exprimés en pourcentage par rapport à la quantité d'α-casozépine initiale. La somme des produits n'atteint pas 100% alors que la totalité de l'α-casozépine est dégradée au bout d'une heure, car les quantités correspondant aux fragments peptidiques non quantifiables à 280 nm (ne possédant pas de résidu de tyrosine) n'est pas pris en compte.

D'autres fragments, non quantifiables par rapport à la quantité initiale d' α -casozépine car ils ne possèdent pas de résidu de tyrosine dans leur séquence, ont été également suivi à 215 nm lors des hydrolyses par les peptidases des vésicules membranaires de la bordure en brosse. Il s'agit des fragments $^{95}\text{LEQLLR}^{100}$, $^{96}\text{EQLLR}^{100}$, $^{95}\text{LEQ}^{97}$ (ou $^{96}\text{EQL}^{98}$), $^{98}\text{LLR}^{100}$ et $^{99}\text{LR}^{100}$ (figure 27).

$^{98}\text{LLR}^{100}$ et $^{99}\text{LR}^{100}$ sont des produits finaux présents dans le milieu à la fin de la réaction.

I.2 Cinétique de dégradation du fragment F97

Le fragment F97 suit la même cinétique de dégradation que l' α -casozépine ; dans nos conditions expérimentales 50 % du peptide sont dégradés dès les 5 premières minutes. Après 30 min il en reste 10 % et le peptide a totalement disparu au bout d'une heure (figure 29A).

I.2.1. Les produits générés et cinétiques de formation

Sept peptides et de la tyrosine libre sont identifiés (tableau 9) et quantifiés dans le milieu réactionnel au cours du temps. La tyrosine libre est le produit majoritairement libéré dans le milieu d'hydrolyse (figure 29B).

Les peptides $^{92}\text{LGYLEQ}^{97}$, $^{93}\text{GYLEQ}^{97}$ et $^{94}\text{YLEQ}^{97}$ ont des cinétiques de libération très proches des produits obtenus avec l' α -casozépine ($^{92}\text{LGYLEQLLR}^{100}$, $^{93}\text{GYLEQLLR}^{100}$, $^{94}\text{YLQLLR}^{100}$). Au vu de leur cinétique de formation il est très probable que l'hydrolyse du peptide $^{91}\text{YLGYLEQ}^{97}$ libère le peptide $^{92}\text{LGYLEQ}^{97}$ dont l'hydrolyse libère à son tour $^{93}\text{GYLEQ}^{97}$. Enfin l'hydrolyse de celui-ci donne le peptide $^{94}\text{YLEQ}^{97}$. Tout ceci peut se faire par l'action successive d'aminopeptidases (figure 30A).

A la vue de leur cinétique de formation les produits $^{91}\text{YLG}^{93}$ et $^{94}\text{YLE}^{96}$ ne peuvent pas être obtenus par l'action d'endopeptidase sur la liaison $^{93}\text{G-Y}^{94}$ de $^{91}\text{YLGYLE}^{96}$, car $^{91}\text{YLG}^{93}$ apparaît immédiatement alors que $^{94}\text{YLE}^{96}$ est détecté seulement après 15 min de réaction (figure 30B).

Il est plus probable que le peptide $^{94}\text{YLE}^{96}$ soit issu de l'hydrolyse par une carboxypeptidase de la liaison $^{96}\text{E-Q}^{97}$ du produit $^{94}\text{YLEQ}^{97}$ qui peut lui-même provenir de l'action d'une endopeptidase sur $^{91}\text{YLGYLEQ}^{97}$, une des formations possibles en plus de celle provenant de l'action successive d'aminopeptidases.

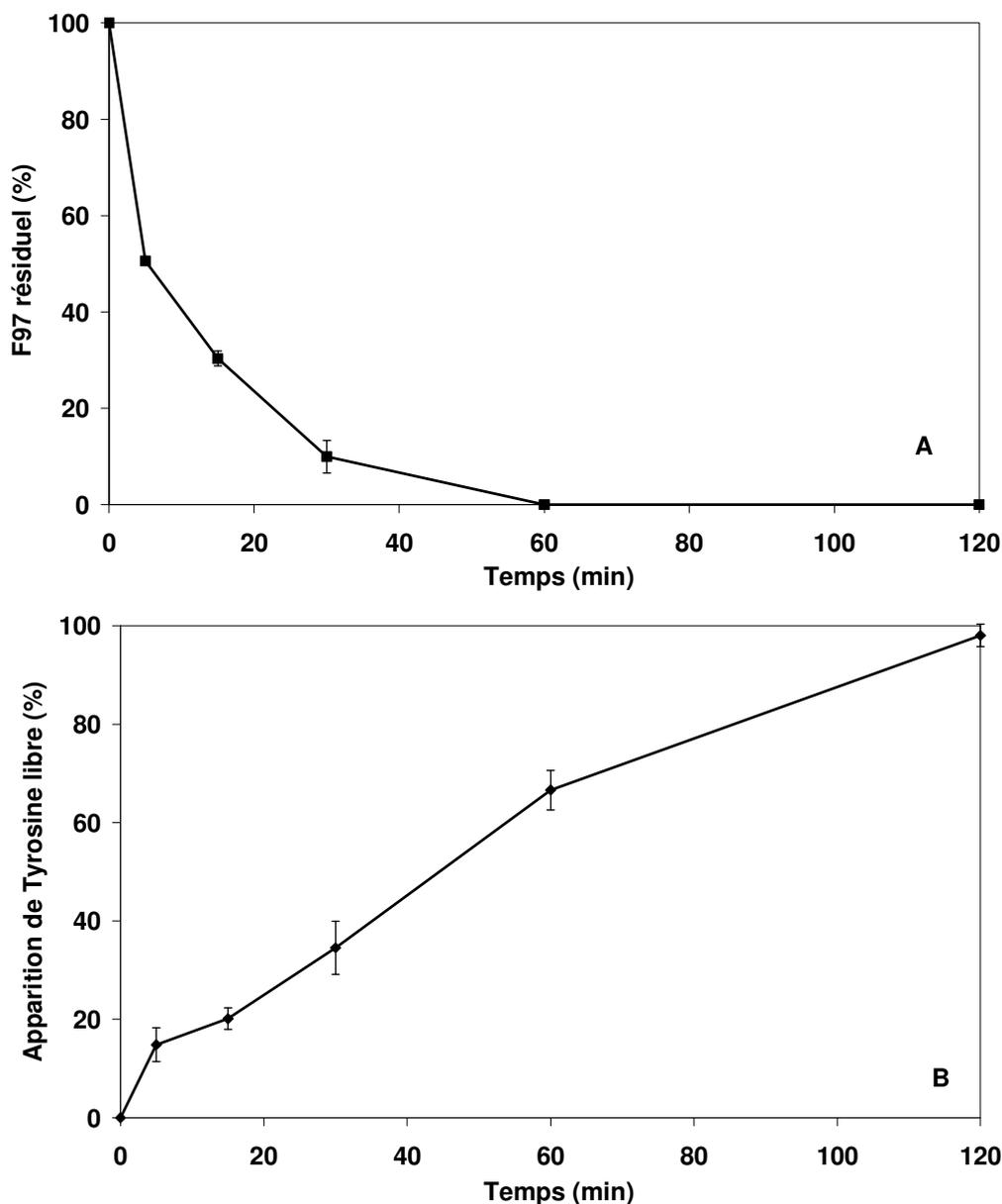


Figure 29 : Cinétiques de dégradation du fragment F97 (A) et d'apparition de tyrosine libre (B) au cours du temps lors de l'hydrolyse par les vésicules de membrane de la bordure en brosse d'entérocytes (VMBB) de rats Wistar.

Ces hydrolyses sont réalisées *in vitro* dans un tampon Mes/KOH à pH 7,4 et à 37°C pendant 2 h. Le fragment F97 et la tyrosine libre sont séparés et détectés à 280 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique. La proportion de fragment F97 et la formation de tyrosine libre sont exprimées en pourcentage par rapport à la quantité initiale de fragment F97, (N=2).

Tableau 9 : Caractérisation par spectrométrie de masse des fragments peptidiques générés par l'hydrolyse du fragment F97 par les peptidases présentes au niveau des VMBB d'entérocytes de rats.

Ces fragments sont obtenus *in vitro* lors de la dégradation du fragment F97 par les peptidases de la bordure en brosse d'épithélium intestinal de rats dans un tampon mes/KOH 50 mM pH 7,4 à 37°C pendant 2 h. Les fragments peptidiques libérés sont identifiés et caractérisés par chromatographie liquide haute performance en phase inversée avec une colonne analytique LichroCart C 18 (240 x 4 mm ; 5 µm de taille de particule ; 10 mm de porosité) et un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique) à 215 nm et 280 nm et caractérisés par spectrométrie de masse (LC/ESI-MS et MALDI-TOF). Les acides aminés libres Leucine (L) en concentration trop faible, Glycine (G) trop hydrophile pour être retenu, ne sont pas identifiés par cette méthode.

M_r trouvée	Identification	Séquence	M_r théorique	Nom*
181.1	[91] ou [94]	Y	181.07	-
388.4	[95-97]	LEQ	388.20	-
551.6	[94-97]	YLEQ	551.26	
351.4	[91-93]	YLG	351.28	-
608.6	[93-97]	GYLEQ	608.28	-
423.3	[94-96]	YLE	423.20	-
721.7	[92-97]	LGYLEQ	721.36	-
884.6	[91-97]	YLGYLEQ	884.43	F97

* F_x= fragment 91-x

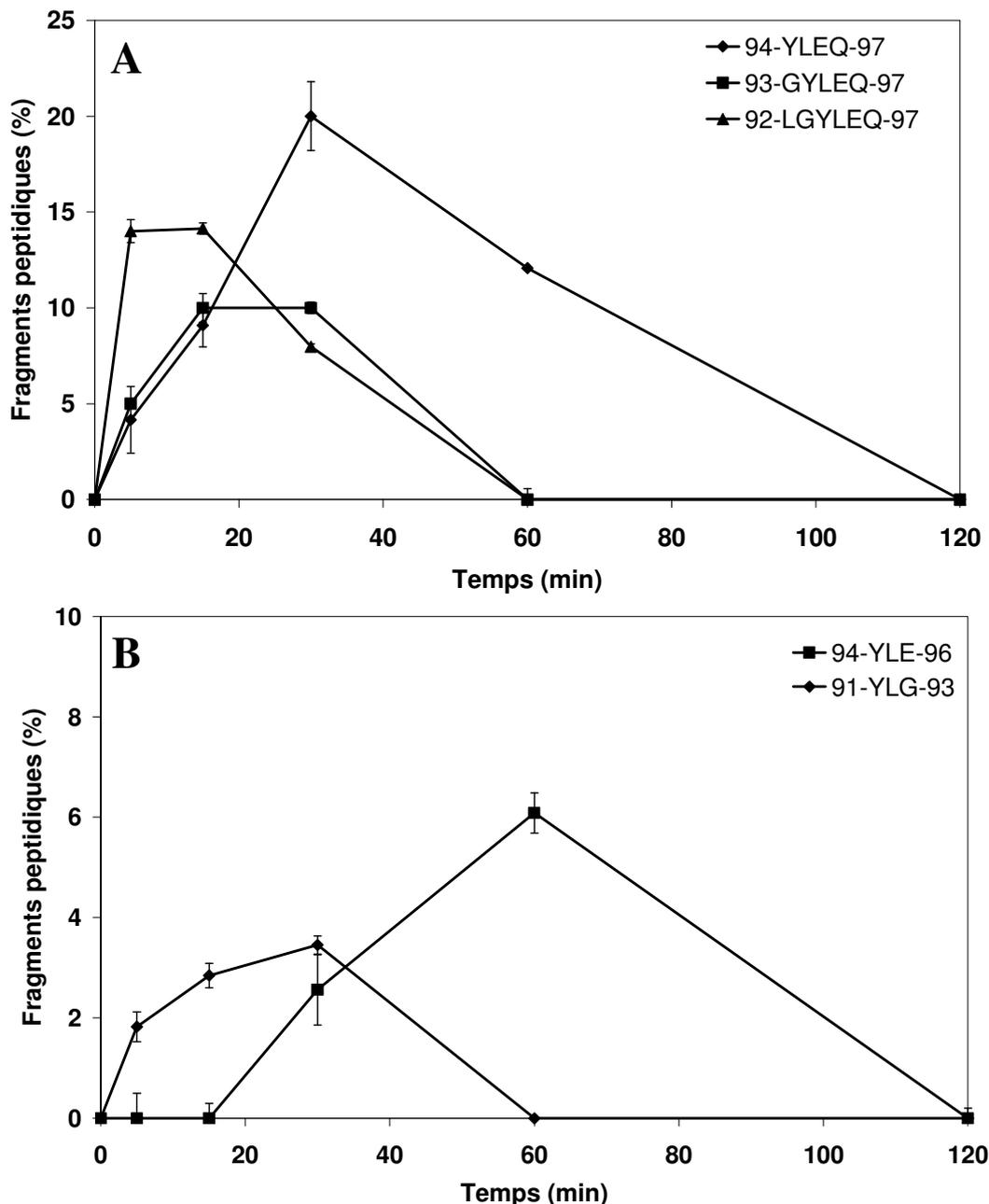


Figure 30 : Cinétiques de formation des peptides YLEQ, GYLEQ, LGYLEQ, YLE et YLG obtenus lors de la dégradation du fragment F97 par les VMBB d'entérocytes de rats Wistar. Ces fragments sont obtenus *in vitro* lors de la dégradation du fragment F97 (0,15 mg/mL) par les peptidases de la bordure en brosse d'épithélium intestinal de rats dans un tampon Mes/KOH à pH 7,4 et à 37°C pendant 2 h. Les fragments peptidiques libérés sont détectés et séparés à 280 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique, puis caractérisés par spectrométrie de masse (LC/ESI-MS et MALDI-TOF). Les peptides formés sont exprimés en pourcentage par rapport à la quantité initiale de fragment F97, (N=2).

II. HYDROLYSE DE L' α -CASOZEPINE ET F97 EN CONTACT AVEC LES PEPTIDASES MEMBRANAIRES DES VESICULES DE LA BORDURE EN BROSSE EN PRESENCE D'INHIBITEURS

Les résultats précédant nous renseignent uniquement sur la classe de peptidases, amino-, carboxy-, dipeptidyl- ou peptidyl- dipeptidases ou endopeptidases impliquées dans la dégradation des peptides étudiés au niveau de la bordure en brosse d'entérocytes de rats, mais cela ne permet pas d'identifier la ou les peptidases incriminées dans la cinétique d'hydrolyse. Les inhibiteurs EDTA, bestatine et captopril ont été utilisés pour tenter de déterminer les peptidases impliquées dans la dégradation de l' α -casozépine et du fragment F97.

Le captopril, aux concentrations utilisées ne semble pas modifier la cinétique de dégradation de l' α -casozépine dans le modèle de vésicules membranaires de la bordure en brosse. Les résultats obtenus en présence de captopril ne sont donc pas présentés.

II.1. Cinétique de dégradation de l' α -casozépine et formation des produits d'hydrolyse en présence d'EDTA

L'EDTA est un inhibiteur spécifique des métalloprotéases telles que des carboxypeptidases, endopeptidases ou aminopeptidases. Il agit en chélatant le Zn^{2+} du site actif (Bernkop-Schnürch, 1998).

La présence d'EDTA (5 mM) ralentit la dégradation de l' α -casozépine (figure 31A). Cinquante pour cent de l' α -casozépine initiale sont encore présents après 30 minutes de réaction, contre 18% pour l'essai sans EDTA. Alors que la totalité de l' α -casozépine est dégradée au bout d'une heure de contact avec les VMBB sans EDTA, il en reste encore 23 % en présence d'EDTA.

Sept produits sont identifiés au cours du temps dans le milieu réactionnel (tableau 10), dont la tyrosine qui a une cinétique de libération ralentie par rapport à la cinétique obtenue sans EDTA (figure 31B).

Les six fragments peptidiques détectés en présence d'EDTA sont les suivant : $^{96}EQLLR^{100}$, $^{95}LEQLLR^{100}$, $^{94}YLEQLLR^{100}$, $^{93}GYLEQLLR^{100}$, $^{91}YLGYLEQL^{98}$ et $^{92}LGYLEQLLR^{100}$ (tableau 11A). L'EDTA inhibe la peptidase responsable de l'hydrolyse de la liaison $^{97}Q-L^{98}$. Les fragments $^{92}LGYLEQLLR^{100}$, $^{94}YLEQLLR^{100}$ et $^{91}YLGYLEQL^{98}$ sont formés plus lentement, en quantité légèrement plus importantes et disparaissent également moins

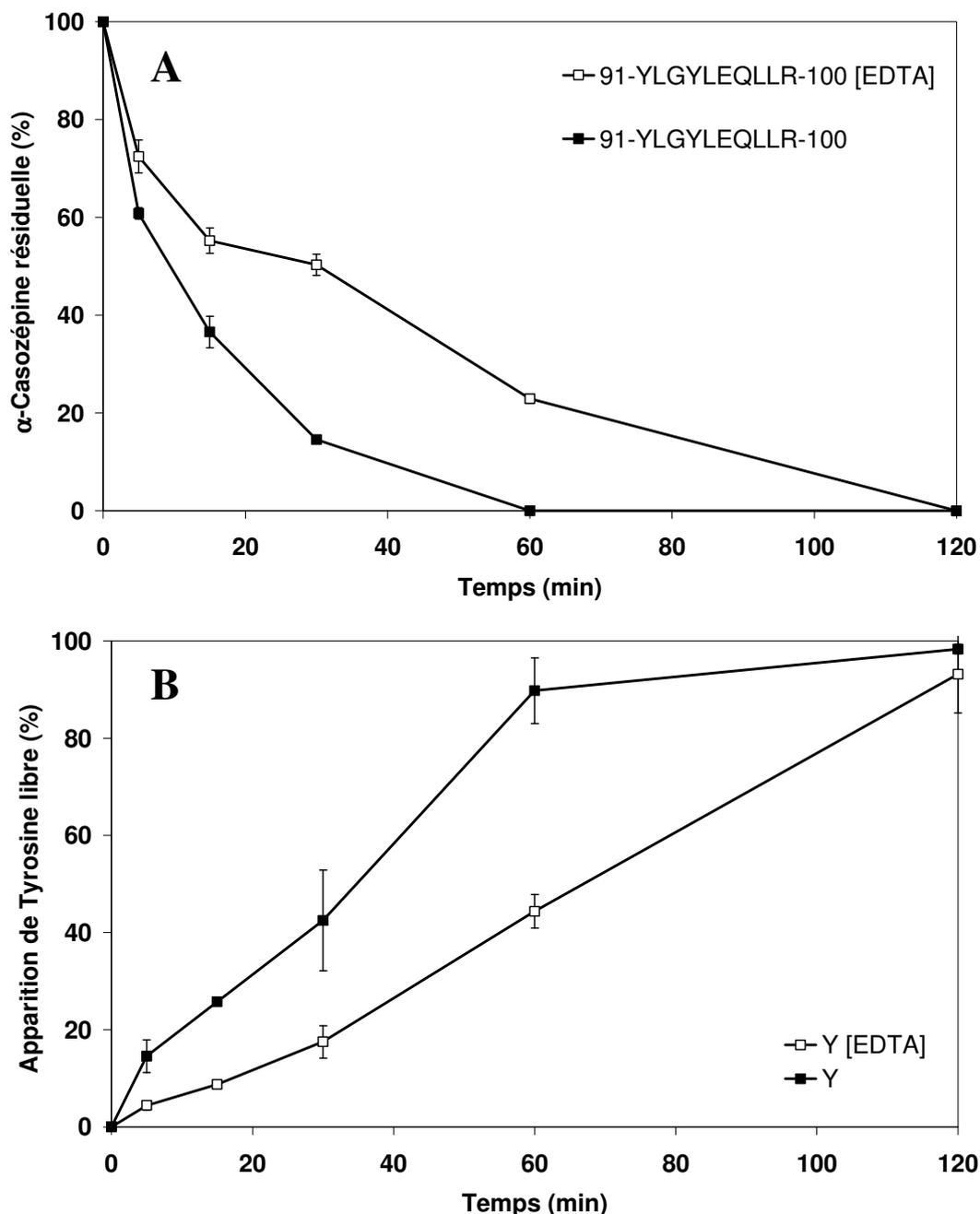


Figure 31: Cinétique de dégradation de l' α -casozépine (A) et d'apparition de tyrosine libre (B) au cours du temps lors de l'hydrolyse par les vésicules de membrane de la bordure en brosse d'entérocytes (VMBB) de rats Wistar en présence ou absence d'EDTA (5mM).

Ces hydrolyses sont réalisées *in vitro* dans un tampon Mes/KOH à pH 7,4 et à 37°C pendant 2 h. L' α -casozépine et le résidu de tyrosine libre sont séparés et détectés à 280 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique. La proportion d' α -casozépine résiduelle et la formation de tyrosine libre sont exprimées en pourcentage par rapport à la quantité initiale d' α -casozépine, ($N=2$).

Tableau 10 : Caractérisation par spectrométrie de masse des fragments peptidiques issus de l'hydrolyse de l' α -casozépine en présence d'EDTA (5mM) par les peptidases présentes au niveau des vésicules de membrane de la bordure en brosse d'entérocytes de rats.

Ces fragments sont obtenus *in vitro* lors de la dégradation de l' α -casozépine par les peptidases de la bordure en brosse d'épithélium intestinal de rats dans un tampon mes/KOH à pH 7,4 et à 37°C pendant 2 h. Les fragments peptidiques libérés sont séparés et détectés à 280 nm et 215 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique, puis caractérisés par spectrométrie de masse (LC/ESI-MS et MALDI-TOF). Les acides aminés libres Leucine (L) en concentration trop faible, Glycine (G) et Arginine (R) trop hydrophiles pour être retenus, ne sont pas identifiés par cette méthode.

M_r trouvée	Identification	Séquence	M_r théorique	Nom
181.1	[91] ou [94]	Y	181.07	-
657.8	[96-100]	EQLLR	657.38	-
770.69	[95-100]	LEQLLR	770.47	-
933.8	[94-100]	YLEQLLR	933.53	-
990.8	[93-100]	GYLEQLLR	990.55	-
997.7	[91-98]	YLGYLEQL	997.51	F98
1103.9	[92-100]	LGYLEQLLR	1103.63	-
1267.79	[91-100]	YLGYLEQLLR	1267.49	α -casozépine

*Fx=fragment 91-x

Tableau 11 : Comparaison des fragments peptidiques obtenus en présence ou absence d'EDTA lors de l'hydrolyse de l' α -casozépine et du fragment F97 par les VMBB. Ces hydrolyses sont réalisées dans un tampon Mes/KOH à pH 7,4 et à 37°C pendant 2 h. Le tableau A et B recensent les fragments peptidiques obtenus au cours du temps issus de la dégradation de l' α -casozépine (A) et du fragment F97 (B) en présence ou absence d'EDTA (5 mM). Les schémas C et D représentent les sites de coupures sur l' α -casozépine (C) et sur le fragment F97 (D) en présence ou absence d'EDTA (5 mM). Les encadrés en pointillés mettent en évidence les liaisons qui sont totalement protégées par l'action d'EDTA.

A α -casozépine		B F97	
sans EDTA	EDTA 5 mM	sans EDTA	EDTA 5 mM
[91]	[91]	[91]	[91]
[99-100]	-	[95-97]	[95-97]
[95-96] et ou [96-98]	-	[94-97]	[94-97]
[98-100]	-	[91-93]	-
[96-100]	[96-100]	[93-97]	[93-97]
[92-97]	-	[94-96]	-
[95-100]	[95-100]	[92-97]	[92-97]
[91-97]	-	<p style="text-align: center;">D</p> <p>Sans EDTA</p> ${}^{91}\text{Y} \updownarrow \text{L} \updownarrow \text{G} \updownarrow \text{Y} \updownarrow \text{L} - \text{E} \updownarrow \text{Q}^{97}$ <p>Avec EDTA</p> ${}^{91}\text{Y} \updownarrow \text{L} \updownarrow \text{G} \updownarrow \text{Y} \updownarrow \text{L} - \text{E} - \text{Q}^{97}$	
[91-95]	-		
[94-100]	[94-100]		
[93-100]	[93-100]		
[91-98]	[91-98]		
[92-100]	[92-100]		

C

Sans EDTA

$${}^{91}\text{Y} \updownarrow \text{L} \updownarrow \text{G} \updownarrow \text{Y} \updownarrow \text{L} \updownarrow \text{E} - \text{Q} \updownarrow \text{L} \updownarrow \text{L} - \text{R}^{100}$$

Avec EDTA

$${}^{91}\text{Y} \updownarrow \text{L} \updownarrow \text{G} \updownarrow \text{Y} \updownarrow \text{L} \updownarrow \text{E} - \text{Q} - \text{L} \updownarrow \text{L} - \text{R}^{100}$$

rapidement (figure 32). Il n'y a pas de différence significative entre les cinétiques de formation du produit $^{93}\text{GYLEQLLR}^{100}$ avec ou sans EDTA (figure 32).

Les produits carboxy-terminaux, $^{96}\text{EQLLR}^{100}$ et $^{95}\text{LEQLLR}^{100}$ détectés à 215 nm n'ont pas les mêmes cinétiques de formation en présence ou absence d'EDTA (figure 33). La présence d'EDTA ralentit très nettement la formation de ces produits qui ne débute qu'à partir de 60 min. Ils ne sont pas dégradés après une heure de contact avec les peptidases de la bordure en brosse.

Le produit complémentaire du fragment $^{96}\text{EQLLR}^{100}$, $^{91}\text{YLGYL}^{95}$, identifié dans le milieu sans EDTA, n'est pas détecté dans le milieu avec EDTA. Soit $^{96}\text{EQLLR}^{100}$ est formé à partir de l'hydrolyse successive des résidus qui le précède, soit le seuil de détection de la méthode employée ne permet de détecter le fragment $^{91}\text{YLGYL}^{95}$ (sans EDTA ce peptide représente au maximum 2 % du taux initial de casozépine) (figure 26).

De la même manière, le fragment carboxy-terminal $^{99}\text{LR}^{100}$ n'est pas retrouvé dans le milieu avec EDTA alors que le peptide $^{91}\text{YLGYLEQL}^{98}$ y est identifié (figure 32).

II.2. Cinétique de dégradation du fragment F97 en présence d' EDTA

La présence d'EDTA ralentit également la dégradation du fragment F97 et la libération de la tyrosine (figure 34). Quatre peptides $^{92}\text{LGYLEQ}^{97}$, $^{93}\text{GYLEQ}^{97}$, $^{94}\text{YLEQ}^{97}$, $^{95}\text{LEQ}^{97}$ sont identifiés lors de l'hydrolyse de F97 par les VMBB en présence d'EDTA (tableau 12, 11A et 11B). La liaison $^{96}\text{E-Q}^{97}$ n'est donc pas hydrolysée, l'EDTA inhibe donc totalement la carboxypeptidase responsable de cette hydrolyse.

Le fragment $^{91}\text{YLE}^{93}$ n'est pas détecté dans le milieu avec EDTA alors que l'on suit la formation du produit $^{94}\text{YLEQ}^{97}$. On peut donc supposer que le fragment $^{94}\text{YLEQ}^{97}$ est issu du peptide $^{93}\text{GYLEQ}^{97}$ et non du peptide $^{91}\text{YLGYLEQ}^{97}$ et que l'EDTA inhibe également l'hydrolyse de la liaison $^{93}\text{G-Y}^{94}$ par une endopeptidase.

Les produits détectés en présence d'EDTA n'ont pas la même cinétique de formation que lorsque l'EDTA est absent du milieu réactionnel. D'une manière générale les peptidases responsables de leur libération et de leur dégradation sont ralenties. L'EDTA exerce une inhibition partielle sur ces peptidases (figure 35).

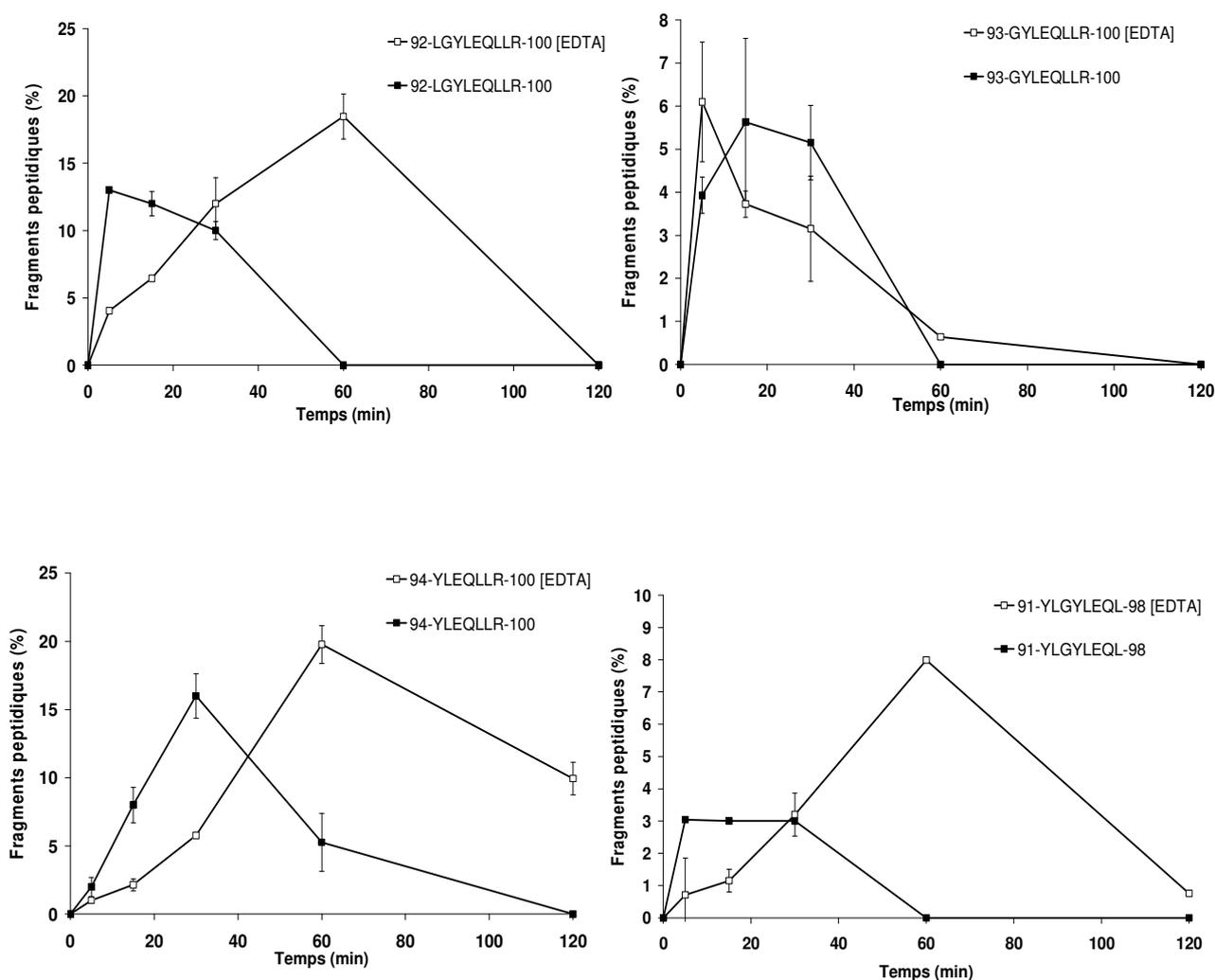


Figure 32 : Cinétiques de formation des peptides LGYLEQLLR, GYLEQLLR, YLEQLLR et YLGYLEQL obtenus lors de la dégradation de l' α -casozépine par les peptidases des VMBB d'entérocytes de rats Wistar, en présence ou absence d'EDTA (5mM).

Ces fragments sont obtenus *in vitro* lors de la dégradation de l' α -casozépine (0,2 mg/mL) par les peptidases de la bordure en brosse d'épithélium intestinal de rats dans un tampon Mes/KOH à pH 7,4 et à 37°C pendant 2 h. Les fragments peptidiques libérés sont séparés et détectés à 280 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique, puis caractérisés par spectrométrie de masse (LC/ESI-MS et MALDI-TOF). Les peptides formés sont exprimés en pourcentage par rapport à la quantité initiale d' α -casozépine, (N=2).

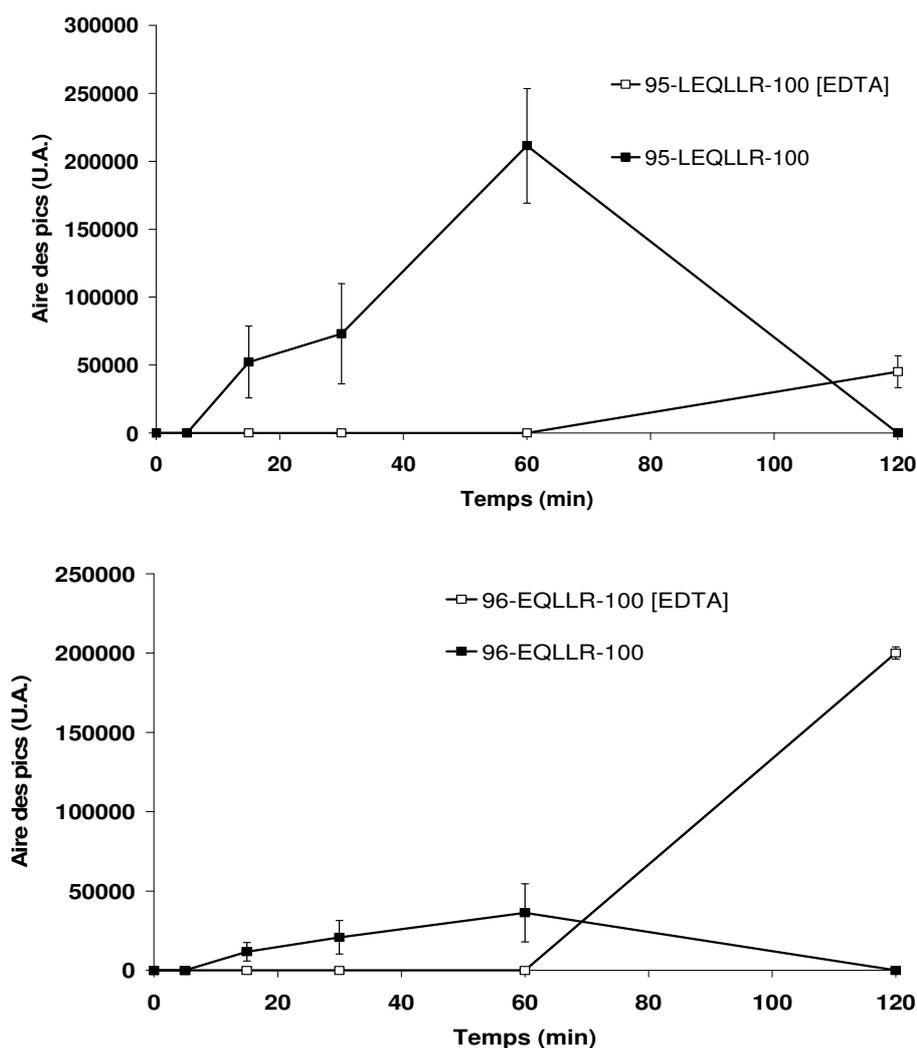


Figure 33 : Cinétiques de formation des peptides LEQLLR et EQLLR obtenus lors de la dégradation de l' α -casozépine par les peptidases des VMBB d'entérocytes de rats Wistar, en présence ou absence d'EDTA (5mM).

Ces fragments sont obtenus *in vitro* lors de la dégradation de l' α -casozépine (0,2 mg/mL) par les peptidases de la bordure en brosse d'épithélium intestinal de rats dans un tampon Mes/KOH à pH 7,4 et à 37°C pendant 2 h. Les fragments peptidiques libérés sont séparés et détectés à 215 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique, puis caractérisés par spectrométrie de masse (LC/ESI-MS et MALDI-TOF), (N=2).

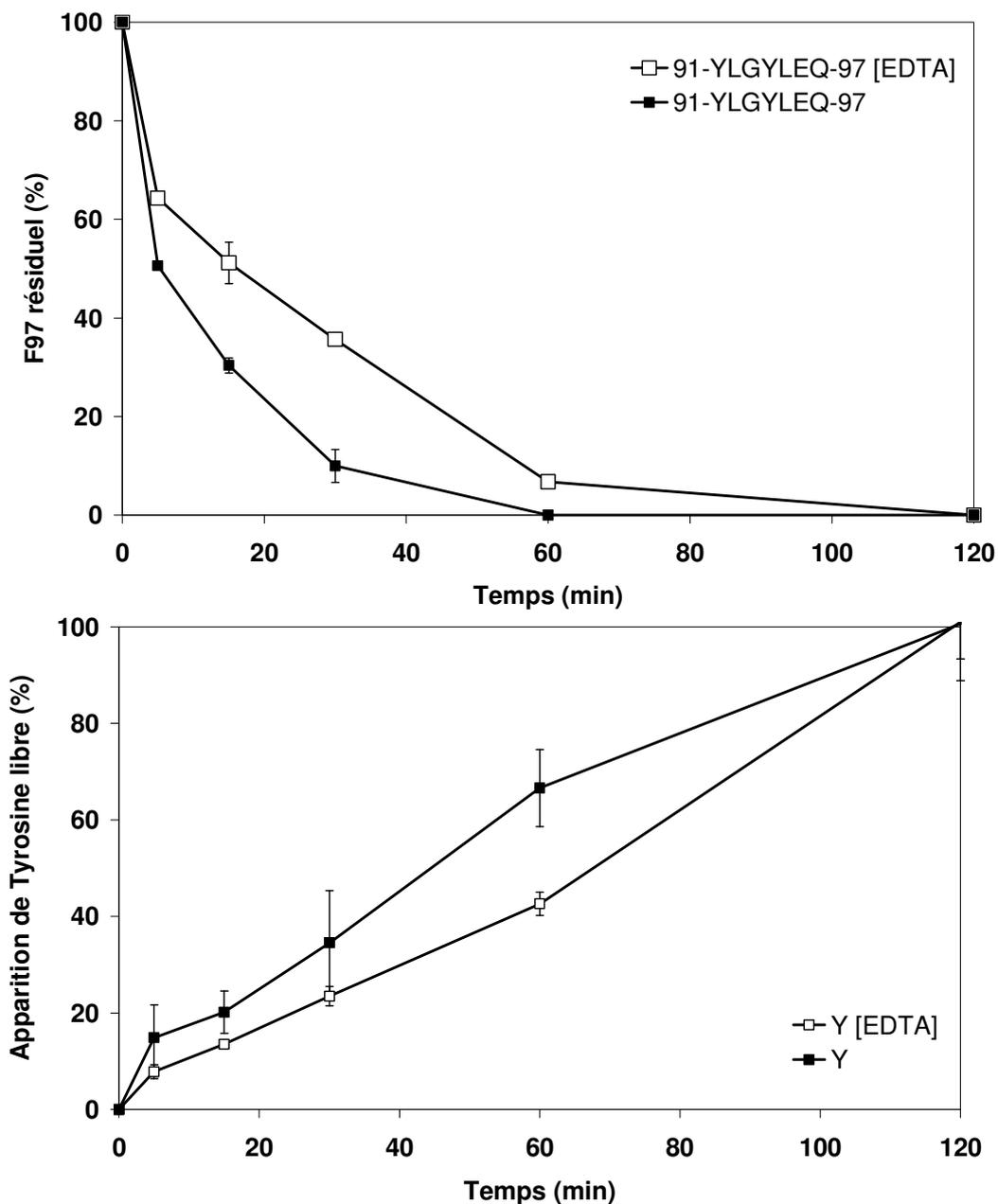


Figure 34: Cinétique de dégradation du fragment F97 (A) et d'apparition de tyrosine libre (B) au cours du temps lors de l'hydrolyse par les vésicules de membrane de la bordure en brosse d'entérocytes (VMBB) de rats Wistar.

Ces hydrolyses sont réalisées *in vitro* dans un tampon Mes/KOH à pH 7,4 et à 37°C pendant 2 h. Le fragment F97 et le résidu tyrosine sont détectés et séparés à 280 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique, puis caractérisés par spectrométrie de masse (LC/ESI-MS et MALDI-TOF). La proportion de fragment F97 et la formation de tyrosine libre sont exprimées en pourcentage par rapport à la quantité initiale de fragment F97, ($N=2$).

Tableau 12 : Caractérisation par spectrométrie de masse des fragments peptidiques générés par l'hydrolyse du fragment F97 par les peptidases présentes au niveau des VMBB d'entérocytes de rats, en présence d'EDTA (5mM).

Ces fragments sont obtenus *in vitro* lors de la dégradation du fragment F97 par les peptidases de la bordure en brosse d'épithélium intestinal de rats dans un tampon mes/KOH à pH 7,4 et à 37°C pendant 2 h. Les fragments peptidiques libérés sont séparés et détectés à 280 nm et 215 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique, puis caractérisés par spectrométrie de masse (LC/ESI-MS et MALDI-TOF). Les acides aminés libres Leucine (L) en concentration trop faible, Glycine (G) trop hydrophile pour être retenu, ne sont pas identifiés par cette méthode.

<i>M_r</i> trouvée	Identification	Séquence	<i>M_r</i> théorique	Nom*
181.1	[91]	Y	181.07	-
388.4	[95-97]	LEQ	388.20	-
551.6	[94-97]	YLEQ	551.26	
608.6	[93-97]	GYLEQ	608.28	-
721.7	[92-97]	LGYLEQ	721.36	-
884.6	[91-97]	YLGYLEQ	884.43	F97

*Fx=Fragment 91-x

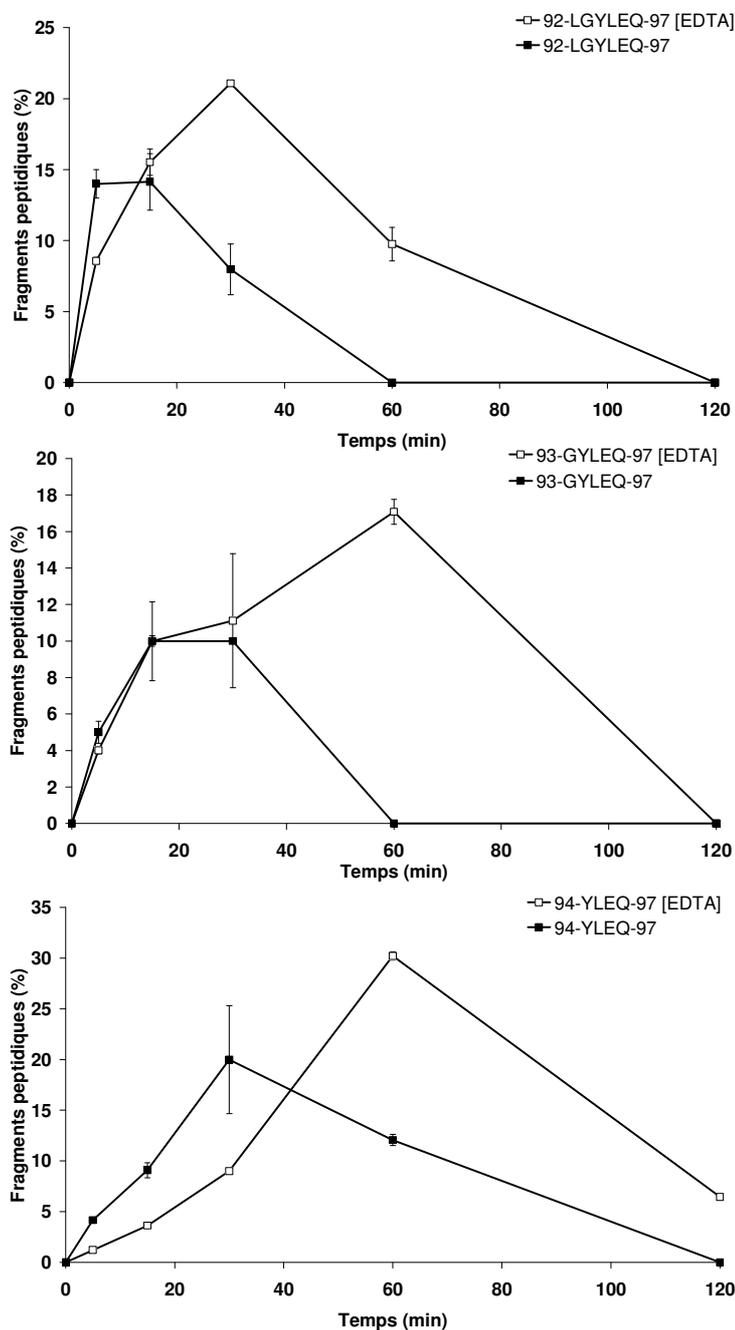


Figure 35 : Cinétiques de formation des peptides LGYLEQ, GYLEQ et YLEQ obtenus lors de la dégradation du fragment F97 par les VMBB d'entérocytes de rats Wistar en présence ou non d'EDTA (5mM).

Ces fragments sont obtenus *in vitro* lors de la dégradation du fragment F97 (0,15 mg/mL) par les peptidases de la bordure en brosse d'épithélium intestinal de rats dans un tampon Mes/KOH à pH 7,4 et à 37°C pendant 2 h. Les fragments peptidiques libérés sont détectés et séparés à 280 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique, puis caractérisés par spectrométrie de masse (LC/ESI-MS et MALDI-TOF). Les peptides formés sont exprimés en pourcentage par rapport à la quantité initiale de fragment F97, (N=2).

II.3. Cinétique de dégradation de l' α -casozépine et du fragment F97 en présence de bestatine

La bestatine (inhibiteur des aminopeptidases), aux deux concentrations de 0,01 et 0,1 mM, ralentit partiellement la dégradation de l' α -casozépine et du fragment F97. Cette inhibition partielle est plus importante avec la bestatine à 0,1 mM pour les deux substrats peptidiques. Après une heure de contact avec les VMBB, l' α -casozépine et le fragment F97 en absence d'inhibiteur sont totalement dégradés. En revanche, en présence de bestatine à 0,1 mM il reste 15% d' α -casozépine et 12% de F97 après 2 h (figure 36).

II.3.1 Produits d'hydrolyse de l' α -casozépine

La bestatine à 0,01 mM ralentit la ou les peptidases impliquées dans l'apparition et la disparition des peptides $^{92}\text{LGYLEQLLR}^{100}$ et $^{94}\text{YLEQLLR}^{100}$. A 0,1 mM d'inhibiteur ces deux peptides sont toujours présents à 120 min et leur taux correspond à 6 % et 15 % respectivement de l' α -casozépine initialement présente. Les peptidases impliquées dans leur disparition semblent totalement inhibées par la bestatine car après 120 min aucune dégradation n'est constatée. En revanche, la cinétique d'apparition et de disparition du peptide $^{93}\text{GYLEQLLR}^{100}$ est identique aux deux concentrations de bestatine ; sa dégradation est toutefois ralentie par rapport à celle observée en absence d'inhibiteur dans le milieu réactionnel (figure 37).

La bestatine à 0,01 mM inhibe les peptidases responsables de la dégradation du peptide $^{91}\text{YLGYLEQL}^{98}$. Elle ne semble pas avoir d'effet significatif sur le fragment $^{91}\text{YLGYLEQ}^{97}$. A 0,1mM, la bestatine inhibe fortement la libération de ces deux peptides ; environ 5% de l' α -casozépine initiale sont toujours présents dans le milieu réactionnel à 120 min. La bestatine à 0,01 mM et 0,1 mM inhibe légèrement la formation du peptide $^{92}\text{LGYLEQ}^{97}$. L'effet d'inhibition de la dégradation du peptide LGYLEQ est plus important avec la bestatine à 0,1 mM (figure 38).

II.3.2. Produits d'hydrolyse du fragment F97

En fonction de sa concentration et des fragments peptidiques, la bestatine va agir sur la vitesse d'hydrolyse de ou des peptidases impliquées dans la cinétique d'apparition du produit, la

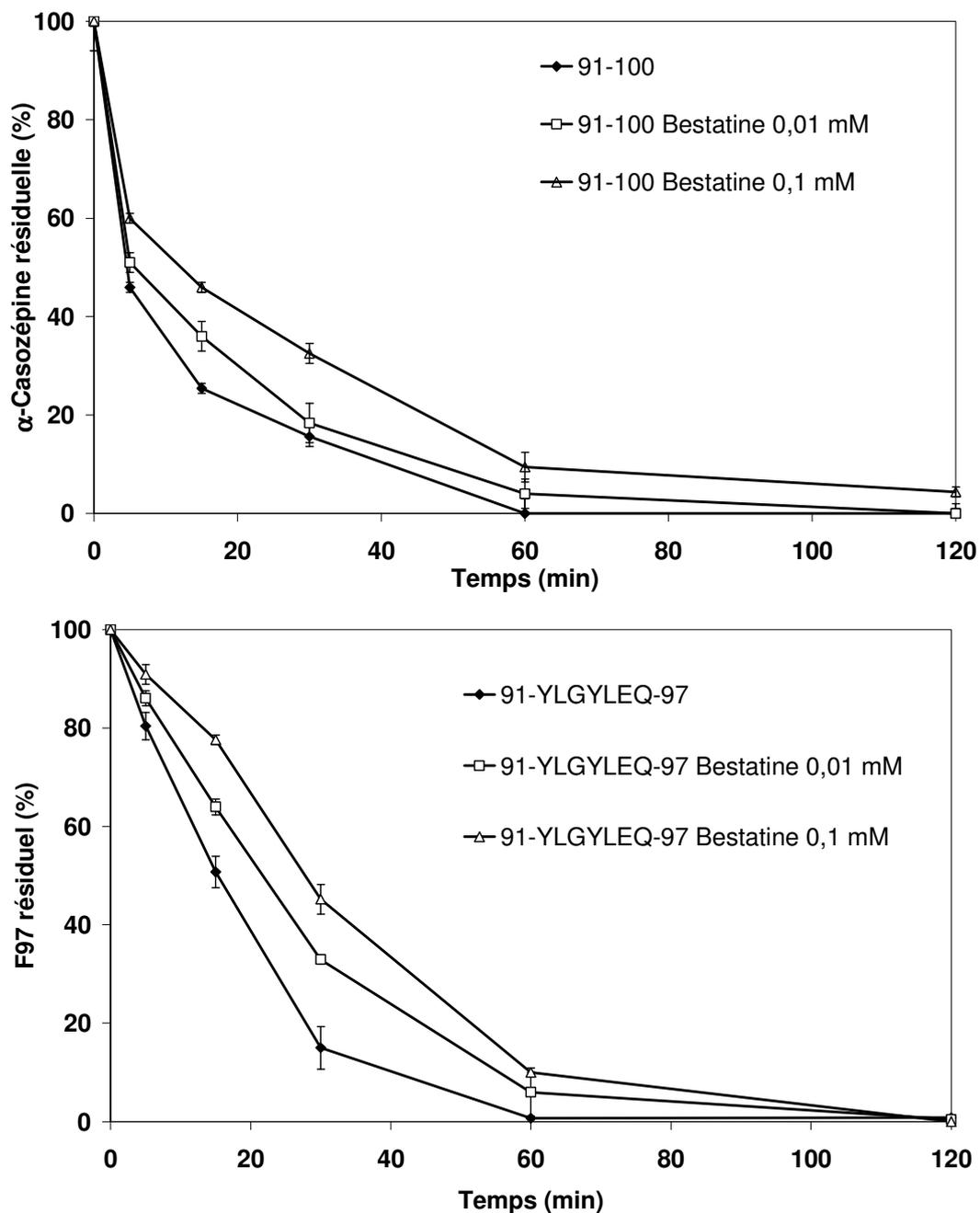


Figure 36 : Cinétiques de dégradation de l'α-casozépine et du fragment F97 par les VMBB d'entérocytes de rats Wistar, en présence ou non de bestatine (0,01 mM et 0,1 mM).

Ces hydrolyses sont réalisées *in vitro* dans un tampon Mes/KOH à pH 7,4 et à 37°C pendant 2 h. L'α-casozépine et le fragments F97 sont séparés et détectés à 280 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique, puis caractérisés par spectrométrie de masse (LC/ESI-MS et MALDI-TOF). L'α-casozépine et le fragment F97 résiduels sont exprimés en pourcentage par rapport à la quantité d'α-casozépine initiale et à la quantité initiale de fragment F97, (N=2).

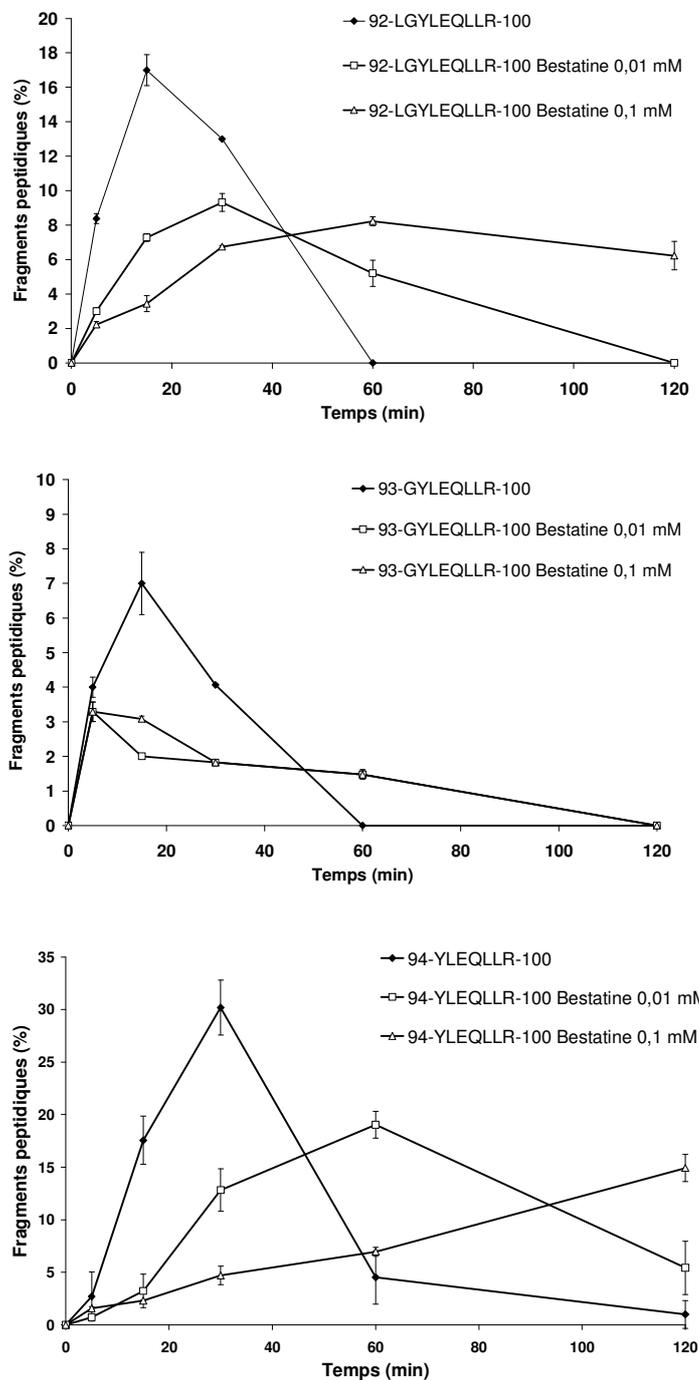


Figure 37 : Cinétiques de formation des peptides LGYLEQLLR, GYLEQLLR et YLEQLLR obtenus lors de la dégradation de l' α -casozépine par les VMBB d'entérocytes de rats Wistar, en présence ou non de bestatine (0,01 mM et 0,1 mM).

Ces fragments sont obtenus *in vitro* lors de la dégradation de l' α -casozépine (0,2 mg/mL) par les peptidases de la bordure en brosse d'épithélium intestinal de rats dans un tampon Mes/KOH à pH 7,4 et à 37°C pendant 2 h. Les fragments peptidiques libérés sont séparés et détectés à 280 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique, puis caractérisés par spectrométrie de masse (LC/ESI-MS et MALDI-TOF). Les peptides formés sont exprimés en pourcentage par rapport à la quantité initiale d' α -casozépine, (N=2).

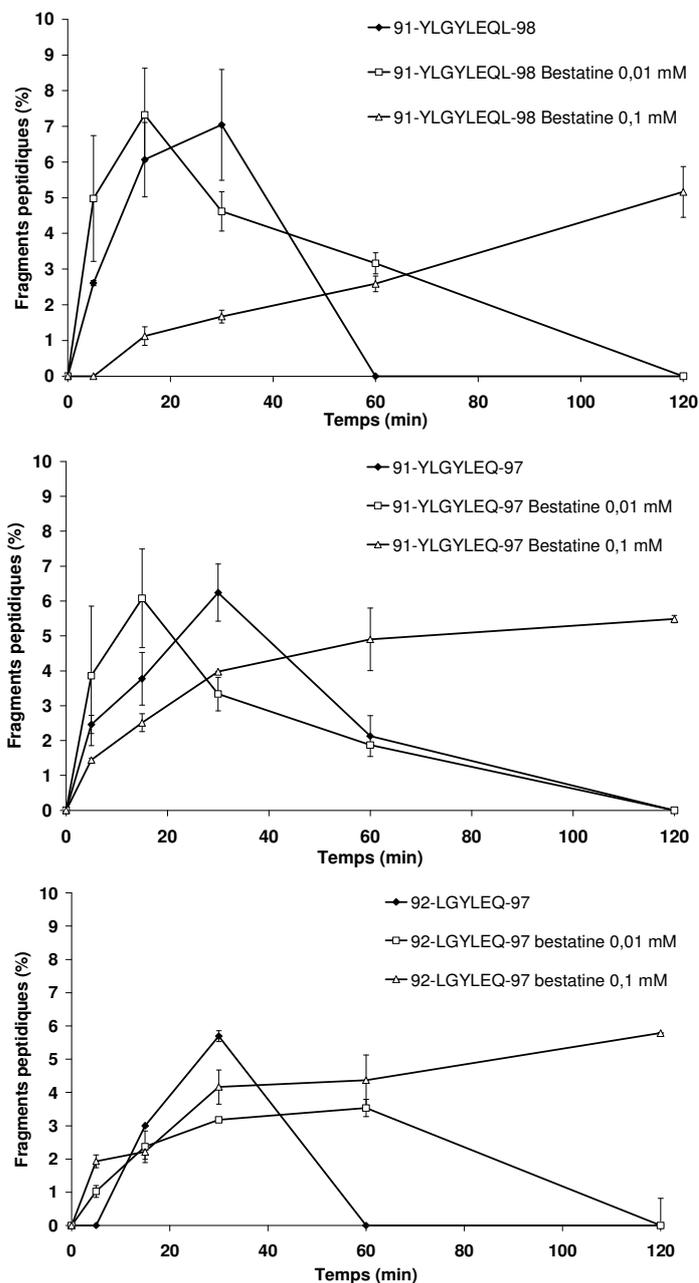


Figure 38 : Cinétiques d'apparition et de disparition des peptides YLGYLEQL, YLGYLEQ et LGYLEQ obtenus lors de la dégradation de l' α -casozépine par les VMBB d'entérocytes de rats Wistar, en présence ou non de bestatine (0,01 mM et 0,1 mM).

Ces fragments sont obtenus *in vitro* lors de la dégradation de l' α -casozépine (0,2 mg/mL) par les peptidases de la bordure en brosse d'épithélium intestinal de rats dans un tampon Mes/KOH à pH 7,4 à et 37°C pendant 2 h. Les fragments peptidiques libérés sont séparés et détectés à 280 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique, puis caractérisés par spectrométrie de masse (LC/ESI-MS et MALDI-TOF). Les peptides formés sont exprimés en pourcentage par rapport à la quantité initiale d' α -casozépine, (N=2).

cinétique de disparition ou sur les deux successivement (figure 39 et 40). La bestatine entraîne aux deux concentrations utilisées, la persistance dans le milieu réactionnel, du fragment $^{94}\text{YLEQ}^{97}$ jusqu'à 120 min.

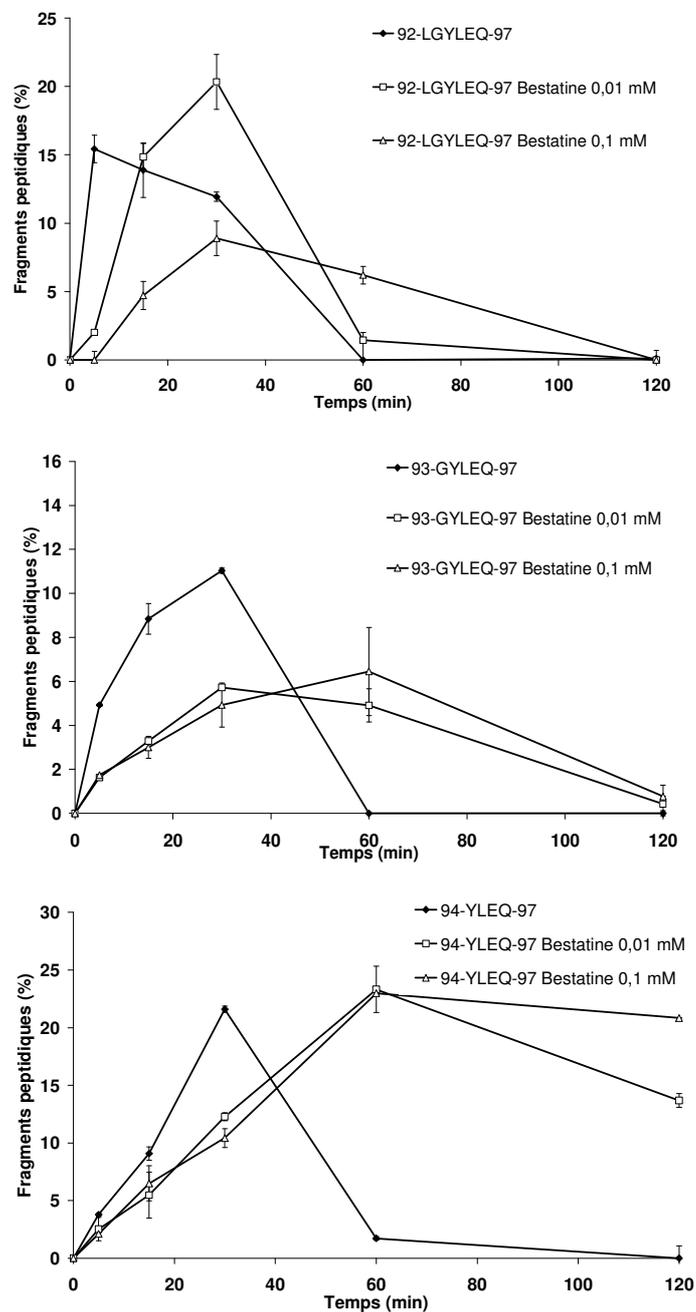


Figure 39 : Cinétiques d'apparition et de disparition des peptides LGYLEQ, GYLEQ et YLEQ obtenus lors de la dégradation du fragment F97 par les VMBB d'entérocytes de rats Wistar, en présence ou non de bestatine (0,01 mM et 0,1 mM).

Ces fragments sont obtenus *in vitro* lors de la dégradation du fragment F97 (0,15 mg/mL) par les peptidases de la bordure en brosse d'épithélium intestinal de rats dans un tampon Mes/KOH à pH 7,4 et à 37°C pendant 2 h. Les fragments peptidiques libérés sont séparés et détectés à 280 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique, puis caractérisés par spectrométrie de masse (LC/ESI-MS et MALDI-TOF). Les peptides formés sont exprimés en pourcentage par rapport à la quantité initiale de fragment F97, (N=2).

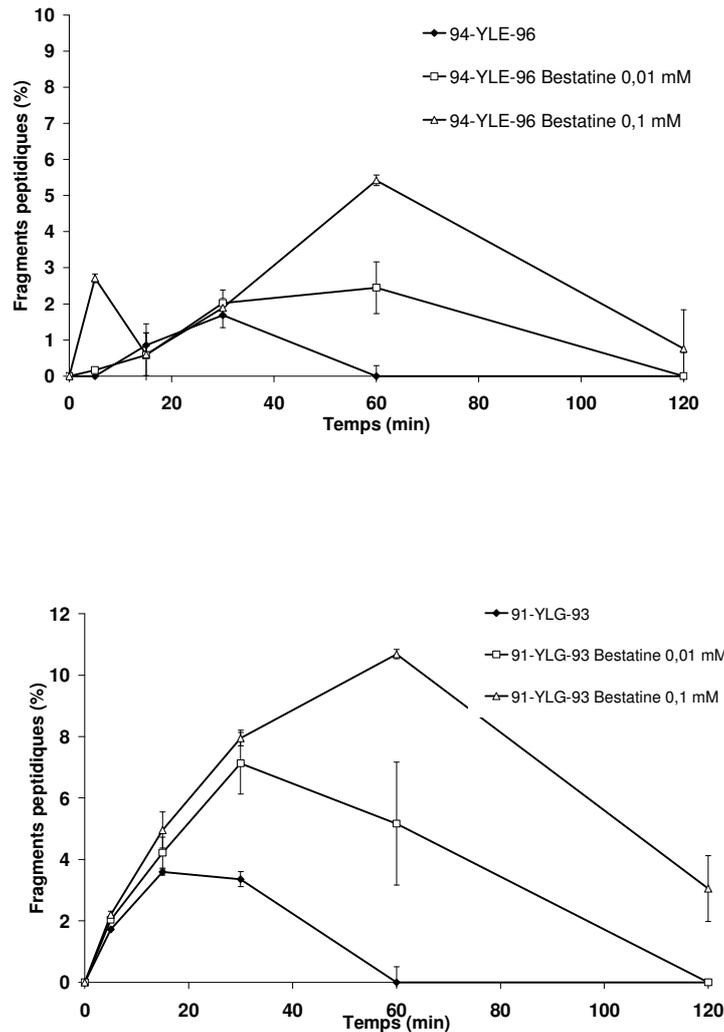


Figure 40 : Cinétiques d'apparition et de disparition des peptides YLE et YLG lors de la dégradation du fragment F97 par les VMBB d'entérocytes de rats Wistar, en présence ou non de bestatine (0,01 mM et 0,1 mM).

Ces fragments sont obtenus *in vitro* lors de la dégradation du fragment F97 (0,15 mg/mL) par les peptidases de la bordure en brosse d'épithélium intestinal de rats dans un tampon Mes/KOH à pH 7,4 et à 37°C pendant 2 h. Les fragments peptidiques libérés sont séparés et détectés à 280 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique, puis caractérisés par spectrométrie de masse (LC/ESI-MS et MALDI-TOF). Les peptides formés sont exprimés en pourcentage par rapport à la quantité initiale de fragment F97, (N=2).

Conclusion

Pour une distribution systémique des peptides par voie orale : la stabilité du ou des peptides dans sa forme active vis-à-vis des peptidases intestinales est un des paramètres majeurs.

L'objectif de cette étude était d'évaluer le degré d'hydrolyse de l' α -casozépine et du fragment F97 (fragment résistant à la dégradation par les enzymes d'origine gastrique et pancréatique), lors de l'hydrolyse par les peptidases intestinales de la bordure en brosse d'entérocytes, de caractériser les produits formés et identifier la ou les peptidases responsables de la dégradation de ces peptides ; ceci afin de savoir si l' α -casozépine résiste aux multiples hydrolyses ayant lieu dans le tractus digestif et d'atteindre des récepteurs GABA_A situés au niveau du système nerveux central.

Pour cela le modèle vésiculaire de la bordure en brosse d'entérocytes de rats a été utilisé. Ce modèle d'étude est largement employé pour évaluer le degré de dégradation de peptides d'intérêt thérapeutique par les peptidases intestinales enchâssées dans la membrane plasmique des entérocytes. Cette hydrolyse représente le plus grand obstacle à l'utilisation de peptides en médecine. Ces vésicules membranaires de la bordure en brosse sont faciles à obtenir dans des délais courts, et les résultats obtenus mettent en évidence une bonne reproductibilité.

In vitro, l' α -casozépine et le fragment F97 ne résistent pas aux peptidases intestinales de la bordure en brosse à plus d'une heure de contact. Cinquante pour cent de la quantité initiale mise en jeu disparaissent après 5 et 10 minutes de réaction pour l' α -casozépine et le fragment F97 respectivement et la majorité des produits générés ne sont pas non plus résistants aux peptidases intestinales dans nos conditions expérimentales. Toutefois les di- et tripeptides ⁹⁹LR¹⁰⁰ et ⁹⁸LLR¹⁰⁰ (pour l' α -casozépine) et ⁹⁵LEQ⁹⁷ (pour le fragment F97) persistent dans le milieu réactionnel même après deux heures de cinétique. Une forte quantité de tyrosine libre est également présente dans le milieu réactionnel.

Au terme de l'analyse des résultats, des hypothèses d'hydrolyse par des peptidases de la famille des aminopeptidases, carboxypeptidases et endopeptidases sont proposées. La libération successive des peptides 92-100, 93-100, 94-100 et 95-100 (cinétique de l' α -casozépine), 92-97, 93-97, 94-97 et 95-97 (cinétique de F97) et la libération importante de tyrosine libre pourraient être la résultante de l'action des aminopeptidases N et/ou W (tableau 4) (Kenny *et al.*, 1987).

D'autre part les peptides x-99 (x pouvant aller de 91 à 98) ne sont pas détectés dans le milieu réactionnel lors des cinétiques de dégradation de l' α -casozépine, seuls les produits 91-97, 91-98 sont libérés, ce qui pourrait mettre en évidence l'inactivation de la carboxypeptidase M. Néanmoins le peptide intermédiaire x-99 pourrait être libéré puis transformé en x-98 par une carboxypeptidase (comme la CP), sans être détecté dans le milieu réactionnel. D'autres peptidases telles que l'endopeptidase 24-11, 24-18, l'aminopeptidase A, la γ -glutamyl-carboxypeptidase, les dipeptidyl peptidases ou les peptidyl dipeptidases pourraient agir sur certaines liaisons de l' α -casozépine et du fragment F97. Mais nos résultats ne nous permettent pas d'attribuer un rôle spécifique dans les différentes séquences d'hydrolyse.

L'utilisation d'inhibiteur avait pour objectif de déterminer les enzymes responsables de la dégradation des peptides d'intérêt. Le captopril, inhibiteur de l'ECA, aux concentrations choisies (0,1 et 1 mM) n'a exercé aucune inhibition, les résultats obtenus avec ou sans captopril sont identiques. Cet inhibiteur semble incapable de préserver l' α -casozépine et le fragment F97 de l'hydrolyse, ce qui indique que l'enzyme de conversion de l'angiotensine n'est pas impliquée dans le catabolisme de ces peptides.

La bestatine est un inhibiteur qui possède une spécificité large sur diverses aminopeptidases (Checler, 1993 ; Tiekou et Hooper, 1992). Cet inhibiteur n'exerce qu'une inhibition partielle sur les peptidases actives. Les produits formés sont identiques en présence ou non de bestatine aux deux concentrations choisies, mais les concentrations de ces peptides libérés sont différentes. Cela ne permet pas de nous renseigner sur l'implication d'une aminopeptidase spécifique. Les concentrations de bestatine choisies ne sont peut-être pas assez fortes pour inhiber totalement les enzymes impliquées. A la concentration de 0,1 mM de bestatine l'hydrolyse de l' α -casozépine génère de nombreux fragments qui ne sont pas hydrolysés au bout de 120 min de réaction, 94-100, 91-98, 91-97 et 92-97 (figures 37 et 38). De manière surprenante le fragment 91-97 résultant de l'hydrolyse de l' α -casozépine en présence de bestatine 0,1 mM résiste dans le milieu réactionnel (figure 38) tandis qu'il reste sensible à l'hydrolyse même en présence de bestatine 0,1 mM lorsqu'il est le substrat initial (figure 36).

L'inhibiteur le plus efficace sur la dégradation de l' α -casozépine et du fragment F97 est l'EDTA, il agit comme chélateur d'ions zinc du site actif des métalloprotéases telles que les carboxypeptidases A et B pancréatiques, et aminopeptidase N (Beynon et Salvesen, 1989). La présence d'EDTA 5 mM inhibe la peptidase responsable de l'hydrolyse de la liaison $^{97}\text{Q-L}^{98}$ de l' α -casozépine et la peptidase responsable de l'hydrolyse de la liaison $^{96}\text{E-Q}^{97}$ du fragment F97.

Les résultats obtenus permettent de cibler les différentes peptidases impliquées dans la dégradation de l' α -casozépine et du fragment F97. Pour avoir la certitude de leur action ces peptidases suspectées pourraient être testées séparément sur les deux peptides d'intérêt par l'ajout d'inhibiteur spécifique non cytotoxique (Langguth *et al.*, 1997).

Ces expériences ont été réalisées *in vitro* sur des VMBB d'entérocytes de rats, extrapolation du catabolisme enzymatique susceptible d'être mis en œuvre chez l'Homme, *in vivo*. Le mécanisme enzymatique mis en œuvre *in vivo* ne peut donc pas être établi avec exactitude, d'autant plus que dans ce modèle *in vitro* l' α -casozépine et le fragment F97 sont exposés seuls face aux peptidases. Malgré ces limites le modèle permet d'obtenir facilement des résultats préliminaires à l'étude du catabolisme peptidique.

Comment l' α -casozépine peut agir alors qu'elle est rapidement dégradée dans un milieu qui mime le lumen aux abords de la bordure en brosse ?

Ces cinétiques ont été obtenues *in vitro* dans des conditions drastiques d'hydrolyse. *In vivo* l'ingestion du peptide bioactif au sein de l'hydrolysats tryptique ou mélangé au bol alimentaire ou à un aliment permettrait de le protéger de la dégradation enzymatique par la présence d'autres éléments. Il pourrait ainsi se retrouver en quantité suffisante et intact pour traverser l'épithélium.

CHAPITRE III

ETUDE

DE L' α -CASOZEPINE

ET SES FRAGMENTS F97 ET F95

CHEZ LE RAT WISTAR

L'activité de l' α -casozépine a été mise en évidence dans le test de l'enfouissement défensif conditionné *in vivo* (Miclo *et al.*, 2001). Pour permettre une meilleure compréhension du devenir métabolique de l' α -casozépine, des hydrolyses *in vitro* par les enzymes gastriques, pancréatiques et intestinales ont été effectuées. Le decapeptide bien que sensible à certaines de ces enzymes digestives est toujours présent dans des pourcentages significatifs quelles que soient les protéases ou complexes protéolytiques utilisés. Les fragments peptidiques plus court, F97 et F95, qui semblent posséder une bonne résistance vis-à-vis des protéases digestives ont été mis en évidence.

Leur séquence $^{91}\text{YLGYLEQ}^{97}$ et $^{91}\text{YLGYL}^{95}$ conservent la partie amino-terminale de l' α -casozépine, partie possédant les deux résidus de tyrosine pouvant mimer les cycles aromatiques présents dans les molécules de BZD. Cependant ces peptides ne possèdent plus l'extrémité carboxy-terminale et notamment de résidu Arg¹⁰⁰ nécessaire à la stabilisation de l'hélice amphipatique plaçant, en milieu micellaire, ces deux résidus de tyrosine dans une position similaire à celle des cycles aromatiques du nitrazépam (Lecouvey *et al.*, 1997). Il a été montré que la substitution du résidu d'arginine 100 par un résidu d'alanine diminue fortement l'hélicité du decapeptide et l'affinité de ce peptide pour le site benzodiazépine du récepteur GABA_A d'un facteur 300.000 (Frochot, 1998).

A la vue de ces données structurales, les fragments F97 et F95 issus du decapeptide ne devraient pas conserver une activité de type benzodiazépine-mimétique.

I. ETUDE DE L'ACTIVITE DU FRAGMENT F97 DANS LE TEST DE L'ENFOUISSEMENT DEFENSIF CONDITIONNE

Le temps de latence d'enfouissement de la sonde après réception du choc électrique de faible intensité, est identique pour les animaux ayant reçu par voie intra-péritonéale de 0,4 mg/kg de fragment F97 et ceux traités avec le diazépam ou l' α -casozépine à 0,7 mg/kg ; le temps de latence pour les animaux contrôles traités avec du NaCl à 0,9 % (m/v) est significativement plus faible (figure 41A). Les durées moyennes d'enfouissement de la sonde ne diffèrent pas significativement entre les traitements au seuil $P < 0,05$; toutefois, une tendance peut être notée : les animaux traités avec le NaCl 0,9 % (m/v) semblent enfouir la sonde pendant un temps plus long que les animaux traités avec le diazépam, l' α -casozépine ou le fragment F97 (80s vs. 19s, 42s, 29s, respectivement à $P=0,11$) (figure 41B).

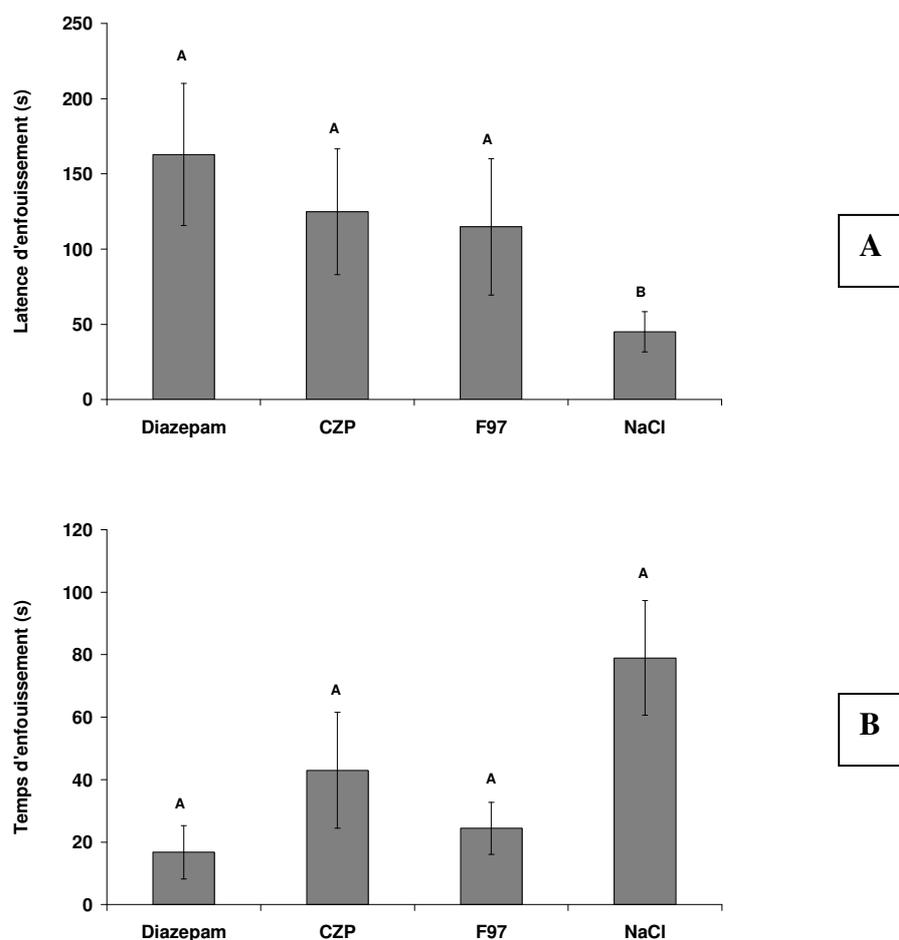


Figure 41 : Effet du fragment F97 sur le comportement d'enfouissement défensif conditionné chez les rats Wistar mâles âgés de 6 semaines.

L'expérimentation est effectuée pendant la phase d'activité des animaux, en lumière blanche de faible intensité (30 lux).

Diazépam à 0,5 mg/kg (1,7 μ mol/kg), α -casozépine à 0,7 mg/kg (0,55 μ mol/kg), F97 à 0,4 mg/kg (0,45 μ mol/kg) et NaCl à 0,9% sont préparés dans un mélange de méthylcellulose (0,2% du volume final) et de glycérol 100% (1% du volume final). 0,5 mL/rat (poids moyen de 250 g) sont injectés par voie i.p. 30 min avant l'expérience.

Après avoir reçu le choc électrique, le comportement des animaux est enregistré pendant 5 min. Les paramètres comportementaux étudiés sont : (A) le temps de latence avant enfouissement, (deux points portant au moins une lettre identique ne diffèrent pas significativement, $N=8$, $P<0,05$) et (B) les temps d'enfouissement (deux points portant au moins une lettre identique ne diffèrent pas significativement, $N=8$, $P=0,11$).

Cette non signification statistique semble avoir comme origine plus un manque de puissance de l'essai (variabilité entre traitement trop élevé) que par un manque d'effet biologique.

Comme son précurseur l' α -casozépine, le fragment F97 (⁹¹YLGYLEQ⁹⁷) semble présenter un potentiel anxiolytique chez le rat Wistar.

II. ETUDE DE L'ACTIVITE DES FRAGMENTS F97 ET F95 DANS LES TESTS DU LABYRINTHE EN CROIX SURELEVE ET DE LA BOÎTE CLAIRE/OBSCURE

II.1 Labyrinthe en croix surélevé

Dans un premier temps pour déterminer si les traitements administrés engendrent ou non une modification de l'activité motrice et exploratoire des animaux, ceux-ci sont placés dans un Open Field (compartiment familier, compartiment non familier), avant d'être observés dans le labyrinthe en croix surélevé (LCS).

Les résultats obtenus lors du passage dans l'Open Field montrent que l'activité locomotrice, la fréquence de passage et de temps passé dans les deux compartiments ne sont pas significativement différents quel que soit le traitement appliqué (tableau 13) (Griebel *et al.*, 1993).

Le nombre total d'entrées dans les différentes branches du LCS, confirme également les résultats obtenus avec l'Open Field. En effet, les valeurs de ce paramètre, renseignant sur l'activité motrice et exploratoire des rats, ne sont pas significativement différents (au seuil $P < 0,05$) pour les différents traitements (diazépam, CZP, F97 et F95), le témoin et le contrôle (figure 42).

II.1.1 Temps de latence avant l'entrée en branche fermée

L'animal est placé au centre du labyrinthe, le nez en direction d'une branche ouverte. Le temps de latence avant son entrée dans une branche fermée est très variable, d'un traitement à l'autre (figure 43). Trois groupes se distinguent : 1- diazépam, 2- α -casozépine et ses dérivés F97 et F95, et 3- contrôle et témoin.

Tableau 13 : Nombre de passage et temps passé dans les compartiments familier et non-familier des rats Wistar mâles âgés de 6 semaines de l'Open Field précédent le test du labyrinthe en croix surélevé.

L'expérimentation est effectuée pendant la phase d'activité des animaux.

L' α -casozépine à 1 mg/kg (0,79 μ mol/kg), F97 à 0,7 mg/kg (0,79 μ mol/kg) et F95 à 0,5 mg/kg (0,79 μ mol/kg) sont préparés dans un mélange de méthylcellulose (0,2% du volume final) et de glycérol 100% (1% du volume final), le témoin ne reçoit pas d'injection et le contrôle reçoit la solution véhicule. 0,5 mL/rat (poids moyen de 250 g) sont administrés par voie intrapéritonéale 30 min avant le passage dans le test de l'Open Field.

Le comportement des animaux est enregistré pendant 10 min, en lumière rouge. Il n'y a pas de différence significative du paramètre exploratoire entre les animaux témoins, contrôles et les animaux traités aux fragments peptidiques, que ça soit dans le compartiment familier ou non-familier.

Traitements	Fréquence (Nombre de passage)		Fréquence (Temps passé)	
	Familier	Non Familier	Familier	Non Familier
Témoin	26 \pm 2,25 %	72 \pm 2,16 %	41 \pm 3,37 %	58 \pm 3,37 %
Contrôle	26 \pm 1,5 %	73 \pm 1,53 %	45 \pm 4,22 %	54 \pm 4,34 %
α -casozépine	27 \pm 2,08 %	72 \pm 2,87 %	38 \pm 3,87 %	61 \pm 4,23 %
F97	22 \pm 1,78 %	77 \pm 1,54 %	37 \pm 3,34 %	62 \pm 4,87 %
F95	23 \pm 1,87 %	76 \pm 1,65 %	33 \pm 2,68 %	66 \pm 2,56 %

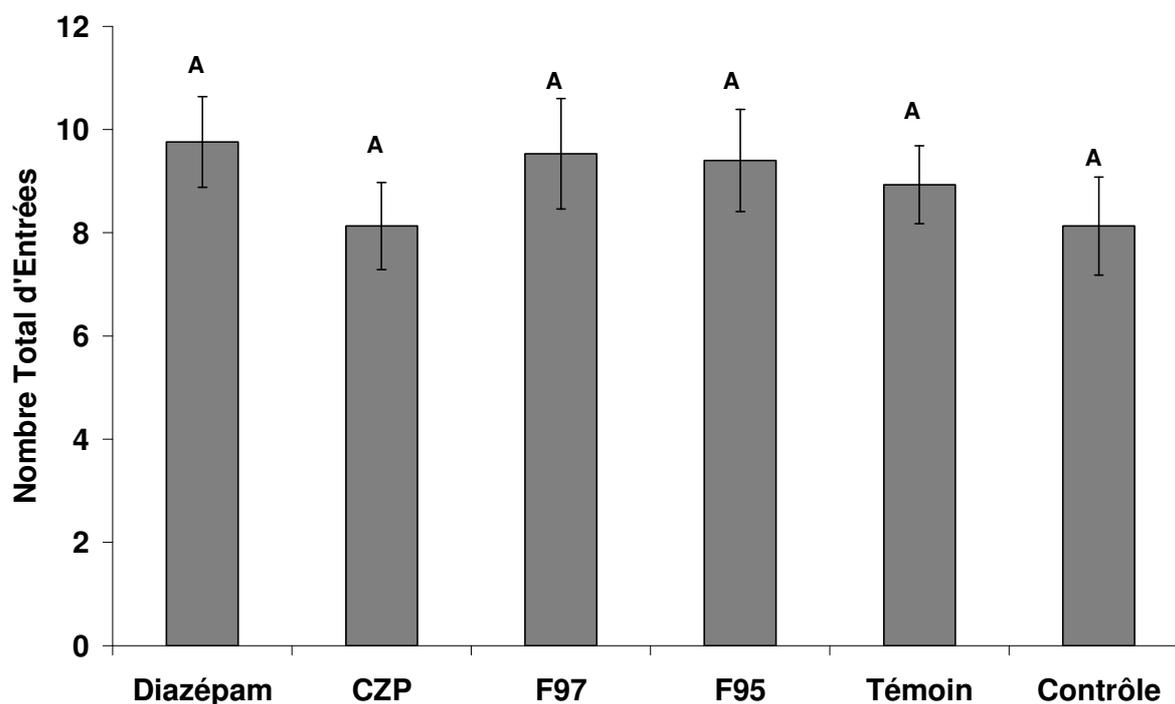


Figure 42 : Nombre total d'entrées dans les différentes branches des rats Wistar mâles âgés de 6 semaines étudiés dans le test du labyrinthe en croix surélevé.

L'expérimentation est effectuée pendant la phase d'activité des animaux.

Diazépam à 1 mg/kg (3,5 μ mol/kg), α -casozépine à 1 mg/kg (0,79 μ mol/kg), F97 à 0,7 mg/kg (0,79 μ mol/kg) et F95 à 0,5 mg/kg (0,79 μ mol/kg) sont préparés dans un mélange de méthylcellulose (0,2% du volume final) et de glycérol 100% (1% du volume final), le témoin ne reçoit pas d'injection et le contrôle reçoit la solution véhicule. 0,5 mL/rat (poids moyen de 250 g) sont administrés par voie i.p. 40 min avant le passage dans le LCS. Trente minutes après injection les animaux passent 10 min en Open Field, puis ils sont observés dans le LCS. Le comportement des animaux est enregistré pendant 5 min, en lumière blanche (500 lux). (Deux points portant au moins une lettre identique ne diffèrent pas significativement, $N=15$, $P<0,05$).

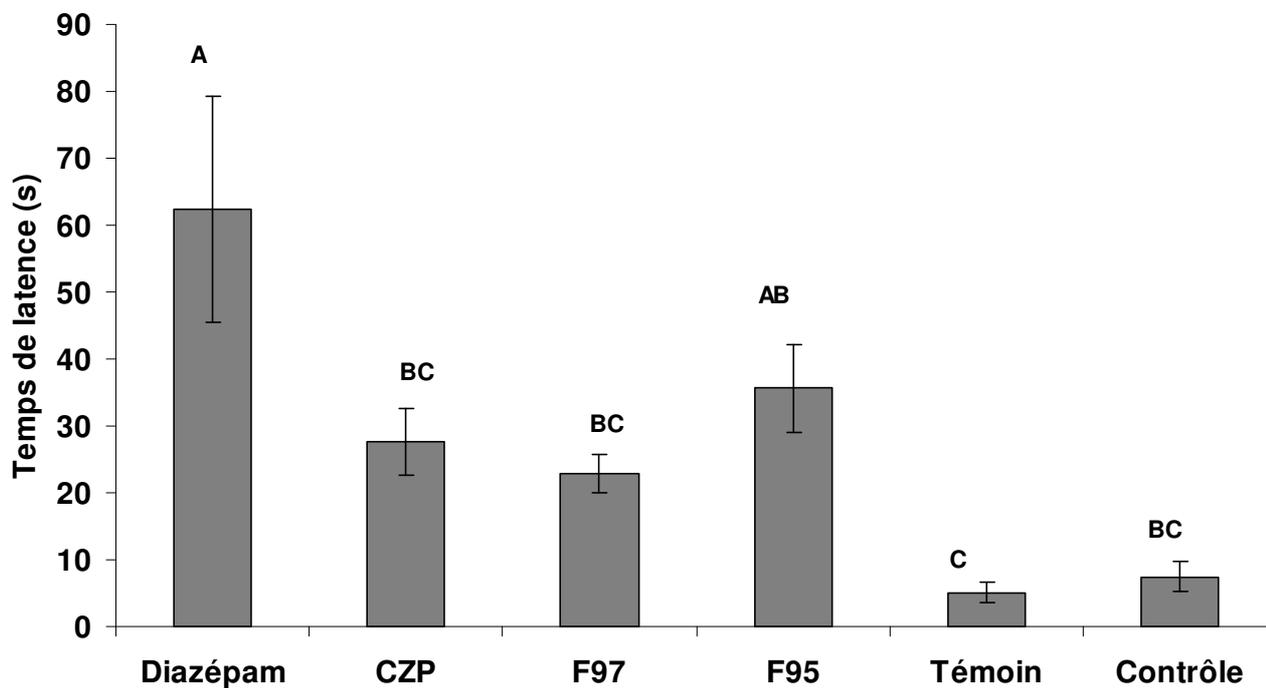


Figure 43 : Temps de latence avant l'entrée en branche fermée des rats Wistar mâles âgés de 6 semaines étudiés dans le labyrinthe en croix surélevé.

L'expérimentation est effectuée pendant la phase d'activité des animaux.

Diazépam à 1 mg/kg (3,5 $\mu\text{mol/kg}$), α -casozépine à 1 mg/kg (0,79 $\mu\text{mol/kg}$), F97 à 0,7 mg/kg (0,79 $\mu\text{mol/kg}$) et F95 à 0,5 mg/kg (0,79 $\mu\text{mol/kg}$) sont préparés dans un mélange de méthylcellulose (0,2% du volume final) et de glycérol 100% (1% du volume final), le témoin ne reçoit pas d'injection et le contrôle reçoit la solution véhicule. 0,5 mL/rat (poids moyen de 250 g) sont administrés par voie i.p. 40 min avant le passage dans le LCS. Trente minutes après injection les animaux passent 10 min en Open Field, puis ils sont observés dans le LCS.

Le comportement des animaux est enregistré pendant 5 min, en lumière blanche (500 lux). (Deux points portant au moins une lettre identique ne diffèrent pas significativement, $N=15$, $P<0,05$).

II.1.2 Nombre d'entrées en branche ouverte

Les animaux traités par l'un des trois fragments peptidiques (α -casozépine, F97 et F95) passent un temps moyen dans les branches ouvertes significativement identique à celui des animaux traités au diazépam et significativement différent de celui des groupes témoin et contrôle (141 s, 137 s, 140 s et 164 s vs. 51 s et 60 s respectivement, $P < 0,05$) (figure 44A).

Le pourcentage d'entrée en branche ouverte donne des résultats similaires ($P < 0,10$) (figure 44B).

Le nombre d'entrées en branche ouverte des animaux témoins et contrôles ne dépassent pas en moyenne 3 entrées alors qu'il est de plus de 4 pour les autres traitements. Le test de Tukey, test par ailleurs très conservateur, ne permet pas d'observer de différences significatives entre le traitement par l' α -casozépine et les témoins et contrôles. La méthode des contrastes qui permet de comparer 2 groupes de moyennes, indique une différence significative entre témoins, contrôles et les autres traitements. Ces différences entre les deux méthodes ne sont pas contradictoires mais plutôt complémentaires lorsque les différences entre les moyennes sont en limite de signification (figures 45A et 45B).

L'ensemble de ces résultats confirme l'effet de l' α -casozépine comme peptide anxiolytique, mimétique des benzodiazépines déjà décrit par Miclo *et al.* (2001). Les fragments F97 (YLGYLEQ) et F95 (YLGYL), semblent également avoir un potentiel d'action anxiolytique à la dose testée équivalente en molarité à celle de l' α -casozépine.

II.2 Boîte claire/obscur (BCO)

La comparaison des valeurs du temps de latence avant l'entrée des animaux dans le compartiment non familier éclairé indiquent qu'il n'y a pas de différences significatives en fonction des groupes (contrôle 124 s ; diazépam 144 s ; α -casozépine 124 s ; F97 164 s ; F95 118 s ; $P = 0,54$) (figure 46A). Le nombre total de compartiments explorés ne varie pas significativement selon le traitement ce qui indique que les animaux ont la même activité exploratoire quel que soit le traitement administré (figure 46B).

Les animaux « contrôle » explorent plus souvent (8,6 fois) et passent plus de temps (556 s) dans le compartiment obscur qui leur est familier que les animaux traités au diazépam (5,6 fois, et 458 s) ou avec l'un des 3 fragments peptidiques étudiés (α -casozépine : 4,9 fois et 493 s ; F97 : 4 fois et 457 s, F95 : 5 fois et 457 s) ($P < 0,01$) (figure 47A et 47B).

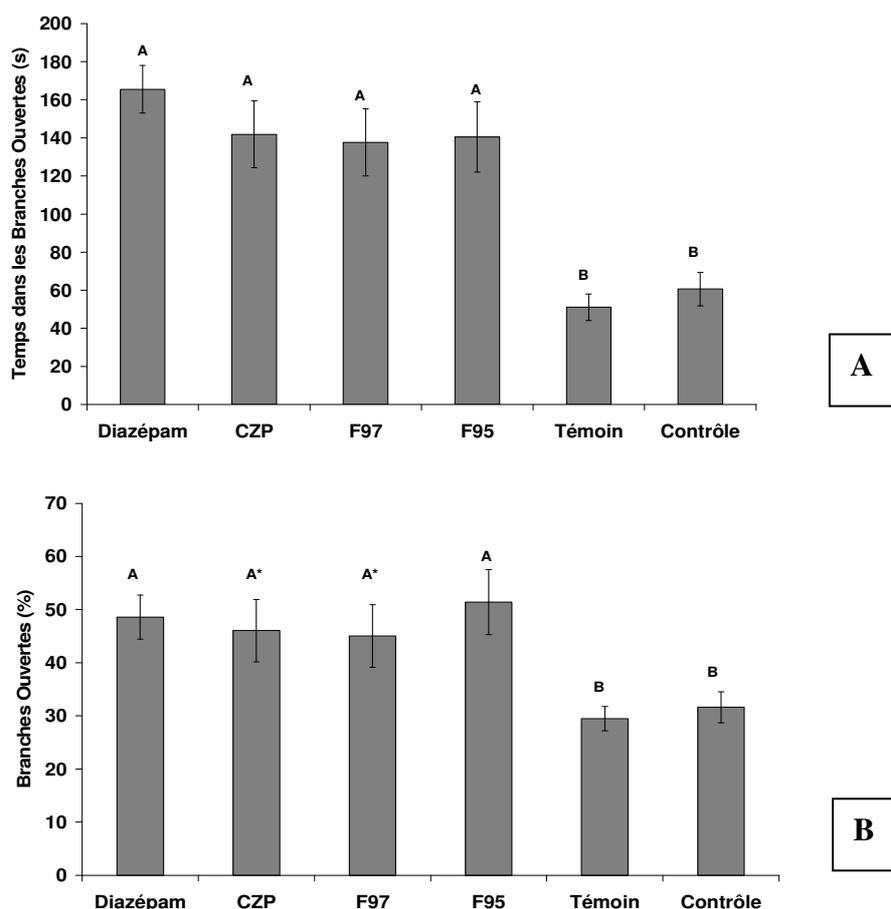


Figure 44 : Temps passé (A) et pourcentage par rapport au temps total (B) en branches ouvertes des rats Wistar mâles âgés de 6 semaines étudiés dans le test du labyrinthe en croix surélevé.

L'expérimentation est effectuée pendant la phase d'activité des animaux.

Diazépam à 1 mg/kg (3,5 μ mol/kg), α -casozépine à 1 mg/kg (0,79 μ mol/kg), F97 à 0,7 mg/kg (0,79 μ mol/kg) et F95 à 0,5 mg/kg (0,79 μ mol/kg) sont préparés dans un mélange de méthylcellulose (0,2% du volume final) et de glycérol 100% (1% du volume final), le témoin ne reçoit pas d'injection et le contrôle reçoit la solution véhicule. 0,5 mL/rat (poids moyen de 250 g) sont administrés par voie i.p. 40 min avant le passage dans le LCS. Trente minutes après injection les animaux passent 10 min en Open Field, puis ils sont observés dans le LCS. Le comportement des animaux est enregistré pendant 5 min après avoir déposé le rat au centre du labyrinthe, en lumière blanche (500 lux). (Deux points portant au moins une lettre identique ne diffèrent pas significativement, (Deux points portant au moins une lettre identique ne diffèrent pas significativement, $N=15$, $P<0,05$, $*P<0,10$).

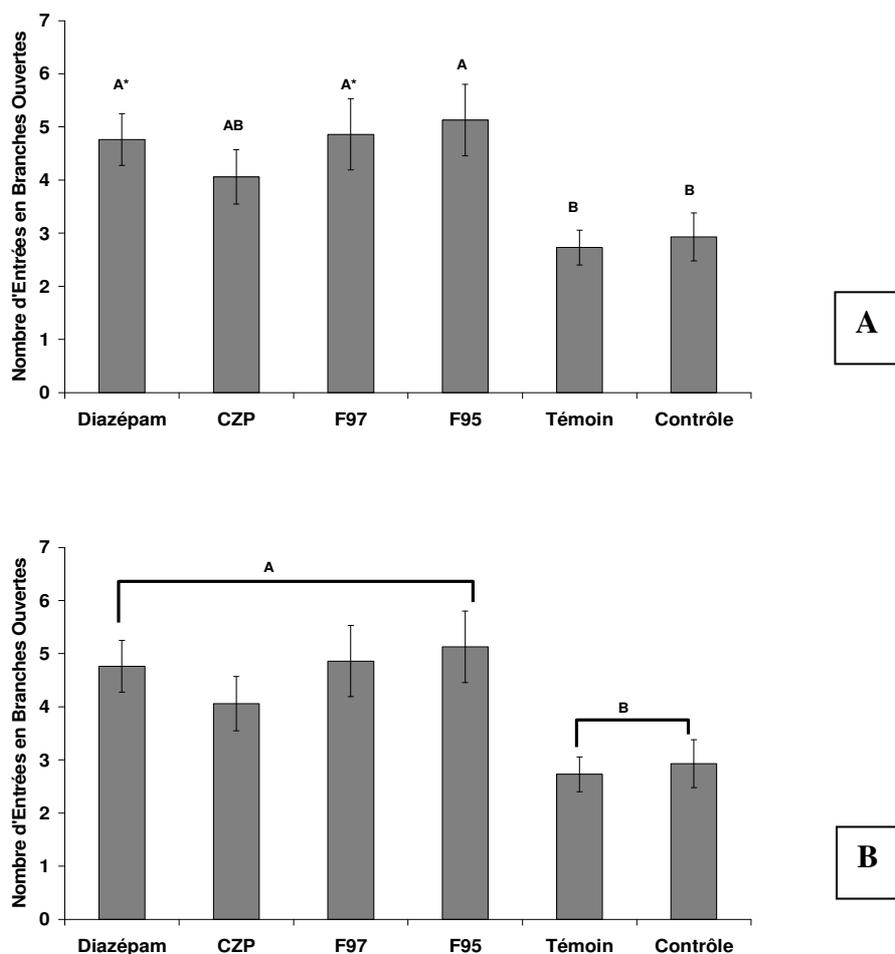


Figure 45 : Nombre d'entrées en branche ouverte des rats Wistar mâles âgés de 6 semaines étudiés dans le test du labyrinthe en croix surélevé.

L'expérimentation est effectuée pendant la phase d'activité des animaux.

Diazépam à 1 mg/kg (3,5 μ mol/kg), α -casozépine à 1 mg/kg (0,79 μ mol/kg), F97 à 0,7 mg/kg (0,79 μ mol/kg) et F95 à 0,5 mg/kg (0,79 μ mol/kg) sont préparés dans un mélange de méthylcellulose (0,2% du volume final) et de glycérol 100% (1% du volume final), le témoin ne reçoit pas d'injection et le contrôle reçoit la solution véhicule. 0,5 mL/rat (poids moyen de 250 g) sont administrés par voie i.p. 40 min avant le passage dans le LCS. Trente minutes après injection les animaux passent 10 min en Open Field, puis ils sont observés dans le LCS. Le comportement des animaux est enregistré pendant 5 min après avoir déposé le rat au centre du labyrinthe, en lumière blanche (500 lux). (A) (Deux points portant au moins une lettre identique ne diffèrent pas significativement, $N=15$, $P<0,05$, $*P<0,10$) ; (B) regroupement des traitements comparés par la méthode des contrastes.

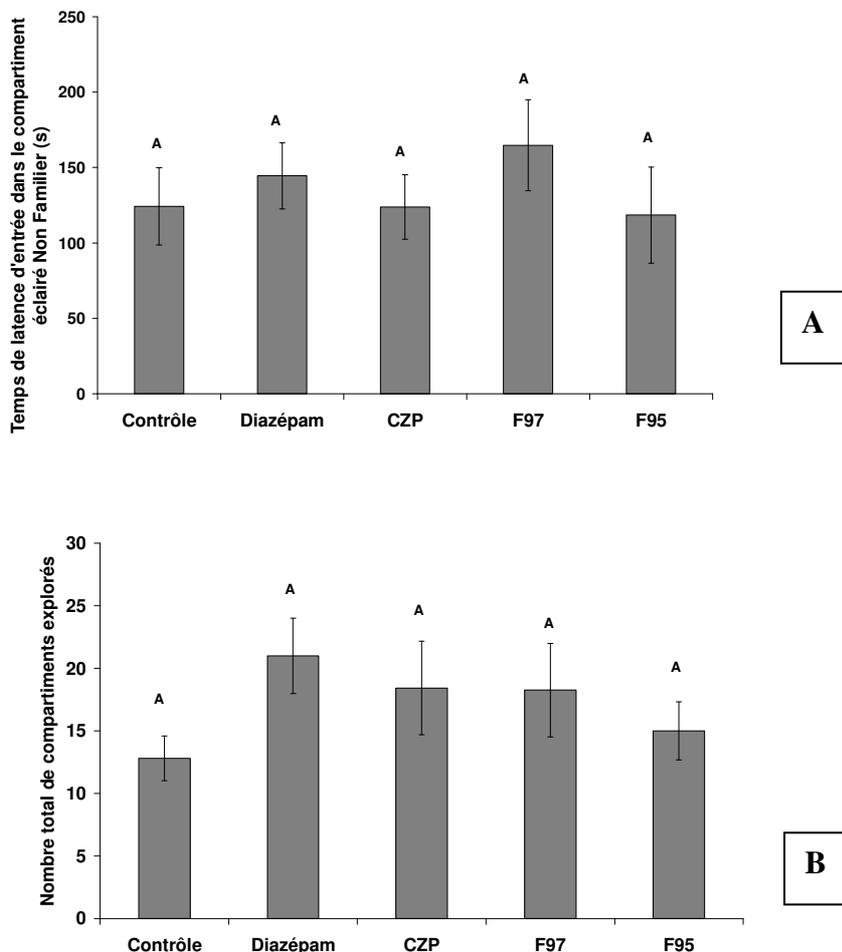


Figure 46 : Temps de latence avant l'entrée dans le compartiment non-familier éclairé (A) et nombre total de compartiments explorés (B) par les rats Wistar mâles âgés de 6 semaines étudiés dans le test de la boîte claire/obscur.

L'expérimentation est effectuée pendant la phase d'activité des animaux. Le compartiment familier, obscur est sous lumière blanche (250 lux) tandis que le compartiment non familier, aversif est sous lumière blanche (1500 lux).

Diazépam à 1 mg/kg (3,5 $\mu\text{mol/kg}$), α -casozépine à 1 mg/kg (0,79 $\mu\text{mol/kg}$), F97 à 0,7 mg/kg (0,79 $\mu\text{mol/kg}$) et F95 à 0,5 mg/kg (0,79 $\mu\text{mol/kg}$) sont préparés dans un mélange de méthylcellulose (0,2% du volume final) et de glycérol 100% (1% du volume final), le contrôle reçoit la solution véhicule. 0,5 mL/rat (poids moyen de 250 g) sont administrés par voie i.p. 30 min avant le passage dans la boîte

Le comportement des animaux est enregistré pendant 10 min. (Deux points portant au moins une lettre identique ne diffèrent pas significativement ; (A) $N=12$, $P=0,54$; (B) $N=12$, $P=0,22$).

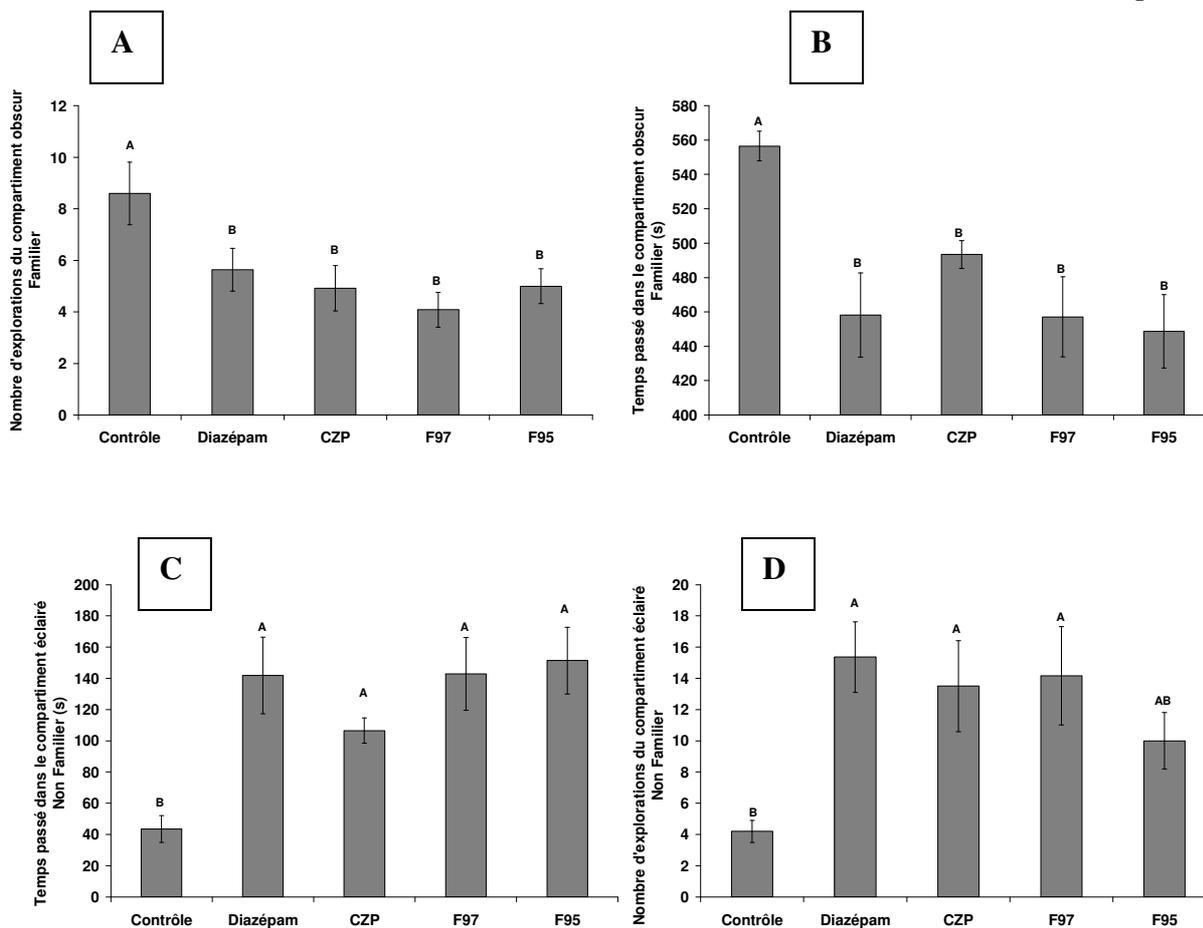


Figure 47 : Nombre d'explorations du compartiment familier obscur et temps passé dans ce compartiment (A, B) et dans le compartiment non-familier, éclairé (C, D) par les rats Wistar mâles âgés de 6 semaines placés dans la boîte claire/obscur.

L'expérimentation est effectuée pendant la phase d'activité des animaux. Le compartiment familier, obscur est sous lumière blanche (250 lux) tandis que le compartiment non-familier, aversif est sous lumière blanche (1500 lux).

Diazépam à 1 mg/kg (3,5 $\mu\text{mol/kg}$), α -casozépine à 1 mg/kg (0,79 $\mu\text{mol/kg}$), F97 à 0,7 mg/kg (0,79 $\mu\text{mol/kg}$) et F95 à 0,5 mg/kg (0,79 $\mu\text{mol/kg}$) sont préparés dans un mélange de méthylcellulose (0,2% du volume final) et de glycérol 100% (1% du volume final), le contrôle reçoit la solution véhicule. 0,5 mL/rat (poids moyen de 250 g) sont administrés par voie i.p. 30 min avant le passage dans la boîte.

Le comportement des animaux est enregistré pendant 10 min

(Deux points portant au moins une lettre identique ne diffèrent pas significativement, $N=12$, $P<0,01$).

A l'inverse, les animaux traités (diazépam, α -casozépine, F97 et F95) explorent plus souvent (moyenne des 4 traitements : 13 fois) et passent plus de temps (moyenne des 4 traitements : 135 s) dans le compartiment éclairé non familier, plus aversif et anxiogène, que les animaux contrôle (compartiment exploré 4,2 fois en moyenne, avec un temps moyen de 43 s) (figure 47C et 47D).

Conclusion

Miclo *et al.*, (2001) ont mis en évidence le potentiel anxiolytique *in vivo* dans le test d'enfouissement défensif conditionné de l' α -casozépine à 0,4 mg/kg administré par voie i.p. à des rats Wistar. Cette activité biologique semble lier, *in vitro*, à une activité de type benzodiazépine. Toute interaction avec les récepteurs périphériques aux benzodiazépines localisés dans la membrane externe des mitochondries a été exclue.

L'ensemble des résultats obtenus à l'aide des tests EDC, LCS et BCO confirme le potentiel anxiolytique de l' α -casozépine testée à 0,7 mg/kg (EDC) ou 1 mg/kg (LCS et BCO), par voie i.p.). Cet effet est significativement identique à celui du diazépam, à 0,5 mg/kg (EDC) ou à 1 mg/kg (LCS et BCO).

Le test du LCS reste depuis sa mise au point en 1985 par Pellow *et al.*, le test le plus fréquemment utilisé pour mettre en évidence l'effet anxiolytique d'une molécule (Dawson *et al.*, 1995). Le nombre d'entrée et le temps passé dans les branches ouvertes, aversives pour le rongeur, permettent de montrer une différence de comportement entre un animal anxieux et un animal sous anxiolyse (Lister, 1987 ; Rodgers *et al.*, 1997). Toutefois, la multiplication des tests utilisés (EDC, LCS et BCO) permet de consolider les résultats.

L'hydrolyse d'un peptide bioactif peut conduire à 3 possibilités : la conservation de l'activité biologique, l'augmentation de l'activité biologique ou la perte de celle-ci. Les données structurales et l'Ala-scan obtenues avec l' α -casozépine (Frochot, 1998) laissant supposer que la perte de la partie carboxy-terminale du peptide conduisait à une perte totale d'activité. Néanmoins, malgré l'apparente nécessité de la présence du résidu Arg100 pour permettre l'interaction avec le site BZD du récepteur GABA_A, les fragments F97 et F95 générés majoritairement par les enzymes gastriques, pancréatiques et/ou intestinales, *in vitro*, ont été testés pour déterminer s'ils pouvaient également être porteur ou non d'un potentiel anxiolytique. Ces deux fragments ont été choisis parmi l'ensemble des produits d'hydrolyse pour deux raisons : 1) leur résistance relative à la dégradation par la pepsine et les enzymes pancréatiques et 2) leur séquence peptidique contenant les 2 résidus de tyrosine dont les cycles aromatiques pourraient permettre l'interaction avec le site benzodiazépine du récepteur GABA_A (Lecouvey *et al.*, 1997).

De façon inattendue, l'injection i.p. de 0,79 μ mol/kg du fragment F97 ou F95 à des rats mâles adultes montre une activité anxiolytique dans les tests du LCS, de l'EDC (F97 uniquement) et de la BCO. Cette activité est comparable à celle observée pour l' α -casozépine et le diazépam

à 1 mg/kg. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées concernant les mécanismes d'action des fragments F97 et F95 :

- Ces peptides agiraient de la même manière que l' α -casozépine, au niveau du système nerveux central, sur le site benzodiazépine du récepteur GABA_A. Ceci nécessite que la conformation des 2 résidus de tyrosine soit stabilisée à l'approche du récepteur GABA_A dans une conformation BZD-mimétique semblable à celle mise en évidence par RMN en milieu micellaire pour l' α -casozépine (Lecouvey *et al.*, 1997). Tout comme l' α -casozépine, les fragments F97 et F95 doivent également pouvoir accéder aux récepteurs GABA_A centraux et donc franchir les barrières intestinale (physique et enzymatique) et hémato-encéphalique.

- Ces fragments peptidiques n'ont peut-être pas la même cible d'action que l' α -casozépine et pourraient peut-être agir en tant que messagers primaires au niveau du tractus digestif.

- Des récepteurs périphériques aux benzodiazépines (PBR) localisés sur les membranes externes des mitochondries présentes dans les épithélia gastriques et intestinaux ont été caractérisés, chez le rat (Ostuni *et al.*, 2004). Cette voie d'action n'a pas été mise en évidence pour l' α -casozépine (Miclo *et al.*, 2001). Cependant, en absence de résultats expérimentaux nous ne pouvons pas complètement exclure cette hypothèse concernant les fragments F97 et F95.

- Le fragment peptidique F95 a une faible affinité pour les récepteurs opiacés (μ et δ) (Loukas *et al.*, 1983). Même si le fragment F95 semble avoir nettement moins d'affinité pour les récepteurs opiacés que le fragment CN α ₁ f(90-95) (Loukas *et al.*, 1983 ; Pihlanto-Leppälä *et al.*, 1994), il ne faut pas totalement exclure *a priori* l'hypothèse selon laquelle le fragment F95, et éventuellement F97 pourrait agir via la voie des récepteurs opiacés, et plus précisément de type μ localisés au niveau du système nerveux central mais aussi périphérique (récepteurs gastrique et intestinaux) (Nishimura *et al.*, 1986, Gray *et al.*, 2006).

CHAPITRE IV

**ETUDE *IN VITRO* DU TRANSFERT et DE LA
DEGRADATION DE L' α -CASOZEPINE ET DES
FRAGMENTS F97 ET F95 EN CONTACT AVEC UN
EPITHELIUM ENTEROCYTAIRE MODELISE PAR
LES CELLULES DE LA LIGNEE Caco-2**

Dans le chapitre précédent nous avons confirmé *in vivo* l'activité de l' α -casozépine et mis en évidence le potentiel anxiolytique des fragments F95 et F97.

Si, pour être actifs, les fragments F97 et F95 doivent, au même titre que l' α -casozépine, accéder aux récepteurs GABA_A centraux, alors ces peptides doivent, après ingestion, résister - au moins partiellement - aux peptidases du tractus digestif et traverser l'épithélium intestinal pour atteindre la circulation sanguine.

Pour évaluer leur biodisponibilité et étudier leur devenir aux abords de la barrière physique et enzymatique que représente l'épithélium intestinal, le modèle cellulaire Caco-2 a été utilisé. C'est un modèle fiable pour l'étude du transfert et du métabolisme de xénobiotiques (Artursson *et al.*, 1996 ; Bailey *et al.*, 1996 ; Hidalgo *et al.*, 1989 ; Ingels *et al.*, 2002). Certains auteurs ont utilisé ce modèle cellulaire pour étudier le transfert de peptides, di- et tripeptides (Ganapathy *et al.*, 1985 ; Matthews et Adibi, 1976 ; Terada et Inui, 2004), mais également pour des peptides de taille et de poids moléculaire élevés (Augustijns et Brocharadt, 1995 ; Iwan *et al.*, 2008 ; Lundin *et al.*, 1990 ; Quiros *et al.*, 2008). Dans le but de valider, dans nos conditions expérimentales, l'utilisation du modèle Caco-2, différentes méthodes de culture et d'étude du transfert ont été réalisées. Des indicateurs fiables, rapides et simples d'obtention, certifiant le bon fonctionnement du modèle cellulaire cultivé sur filtre, ont été établis. Par la suite, la mise en place de ces indicateurs assurant la qualité de l'épithélium entérocytaire, reconstitué *in vitro* par les cellules Caco-2, nous a permis de valider la majeure partie des résultats obtenus sur l'étude du transfert et de la dégradation des peptides d'intérêt.

I. INDICATEURS DE VALIDATION DE LA CULTURE DU MODELE Caco-2

A la suite de modifications apportées à la technique de culture des cellules de la lignée Caco-2, des résultats contradictoires sur le transfert de l' α -casozépine ont été obtenus. Cette variabilité des résultats semble être la conséquence des modifications apportées dans la méthode de culture au niveau de l'origine des cellules, du nombre de passage, de la composition du milieu de culture et de transfert, du taux d'ensemencement... Partant de ce constat, une méthode de culture a été choisie et consolidée par la mise en place d'indicateurs de conformité physique et biochimique de l'épithélium mimé utilisé.

I.1. Validation de la perméabilité du tapis cellulaire en formation par mesure de la résistance électrique transépithéliale

La valeur de la résistance électrique transépithéliale entre le compartiment apical et le compartiment basal augmente du 5^e au 15^e jour de 113 à 242 ohm.cm² (figure 48A). A partir du 17^e jour de culture sur filtre, les cellules sont bien différenciées, les jonctions serrées entre les cellules au pôle apical sont mises en place maintenant une différence de potentiel électrochimique moyenne d'environ 330 ohm.cm² du 17^e au 21^e jours.

Cet indicateur relatif à la perméabilité du tapis cellulaire est majoritairement employé, il est facile et rapide à obtenir et surtout son obtention ne détériore pas l'épithélium.

I.2. Suivi de la différenciation cellulaire par le dosage enzymatique de la phosphatase alcaline et des protéines totales

Le dosage de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL) et des protéines totales sont des méthodes invasives. Elles seront réalisées *a posteriori* après utilisation de la monocouche cellulaire obtenue sur filtre. Lors de la phase de mise au point, tous les deux jours, la mesure répétée de ces deux indicateurs est effectuée sur un filtre (figure 48B et 48C). Du 5^e au 9^e jour la concentration en protéines passe de 22 à 216 µg de protéines totales/cm². Au delà, le dosage atteint un plateau d'environ 253 µg de protéines totales/cm². Trois étapes d'expression de l'activité de la PAL sont mises en évidence, 1) du 5^e au 9^e jour la quantité de PNP formé ne dépasse pas 80 µmol/ filtre de 4,2 cm², ensuite 2) du 11^e au 15^e jour la quantité de PNP formé stagne à 434 µmol en moyenne par filtre, puis 3) du 17^e au 21^e, la quantité de produit formé plafonne à 960 µmol en moyenne par filtre.

Les histogrammes B et C montrent bien la multiplication des cellules sur environ 9 jours : la concentration en protéines totales augmente, mais l'expression de la PAL est peu élevée. Puis, pour un taux de protéines totales fixe du 11^e au 21^e jour, une augmentation d'expression de la PAL montre que les cellules sont en phase de différenciation. Ensuite, à partir du 11^e jour un taux d'expression moyen de la PAL montre des cellules différenciées.

Lors des séries expérimentales effectives la mesure de la résistance transépithéliale est réalisée tous les jours, quatre jours après l'ensemencement des filtres, jusqu'au jour de l'utilisation du système. En revanche les indicateurs « protéines totales » et « activité de la PAL » seront effectués *a posteriori* et valideront les résultats, si la valeur de la quantité de

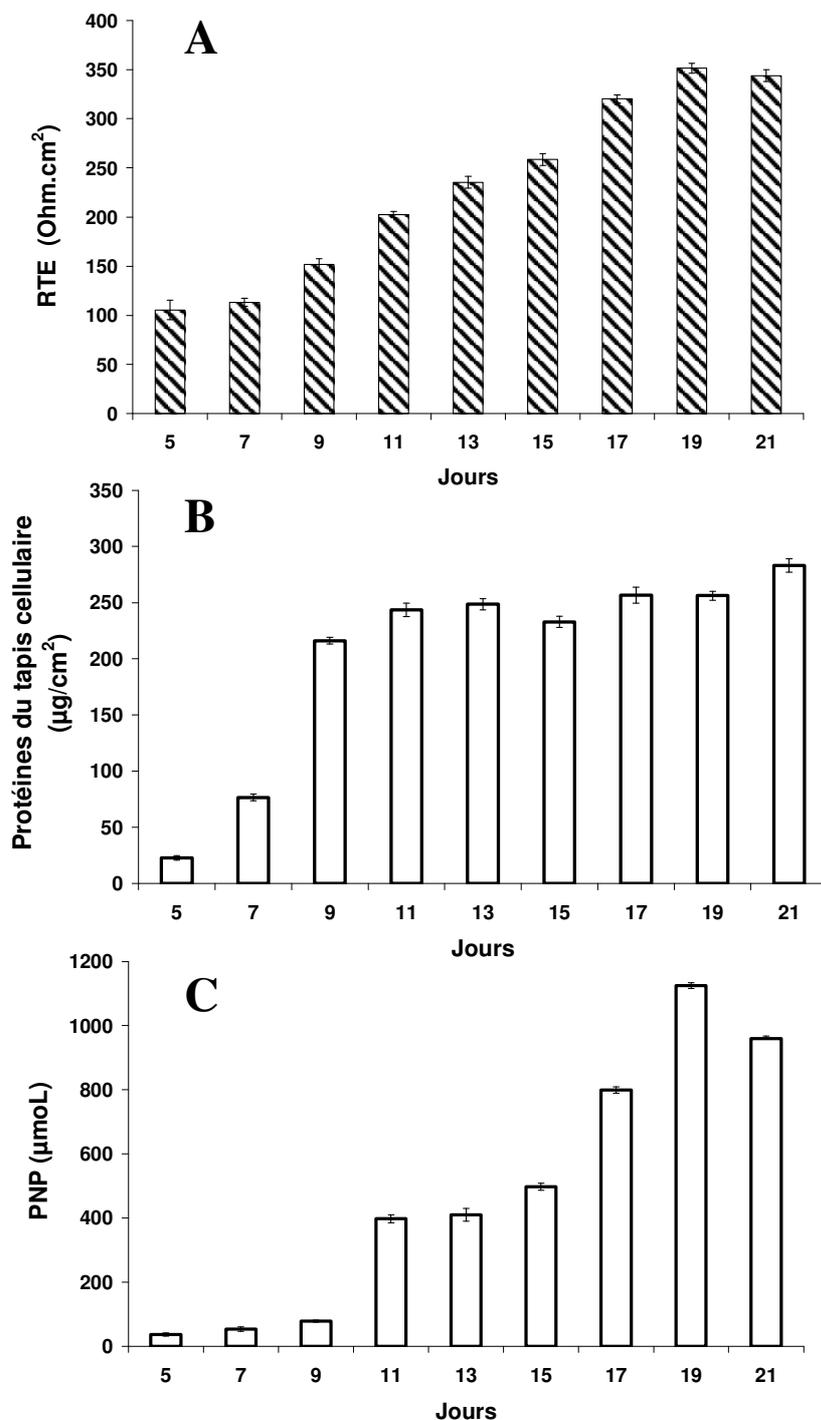


Figure 48 : Les indicateurs de différenciation : Résistance trans-épithéliale (A), protéines totales (B) et dosage de l'activité de la phosphatase alcaline (C) pendant les phases de multiplication et de différenciation du tapis cellulaire Caco-2.

Les filtres sontensemencés avec les cellules Caco-2/TC7 à 10^5 cellules/4,2 cm² et incubés à 37°C. Le milieu de culture (2 mL ; pH 7,4) constitué de DMEM, de 1 % d'acides aminés non essentiels, de 1 % d'antibiotiques et 20 % de sérum de vœu foetal est changé tous les jours.

La mesure de résistance, la concentration en protéines du tapis cellulaire et l'activité de la PAL, déterminée par le dosage du substrat coloré PNP, sont réalisées tous les deux jours à partir du 5^e jour de culture (N=2). RTE : résistance transépithéliale, PNP : paranitrophénol, PAL : phosphatase alcaline.

PNP formé et la valeur de la quantité de protéines totales correspondent aux valeurs visibles sur les histogrammes (figure 48B et 48C) soit en moyenne environ 250 μg de protéines totales/ cm^2 et 960 μmol de PNP formé par filtre.

II. ETUDE DU TRANSFERT DE L' α -CASOZEPINE ET DES FRAGMENTS F97 ET F95, EN UTILISANT LA LIGNEE CELLULAIRE Caco-2 COMME MODELE DE BARRIERE EPITHELIALE INTESTINALE

II.1. Etude préliminaire du transfert de l' α -casozépine du pôle apical vers le pôle basal de l'épithélium intestinal

Les conditions de culture utilisées pour l'étude préliminaire sont détaillées dans le tableau 14. L'analyse par CLHP des milieux apicaux et basaux met en évidence d'une part la disparition progressive dans le milieu apical de l' α -casozépine, le taux résiduel est d'environ 30 % après une heure de contact et d'autre part l'apparition d'environ 1,2 % de la quantité initiale d' α -casozépine dans le compartiment basal après 15 min de transfert. Ce taux se maintient jusqu'à la fin de la cinétique (figure 49A et 49B). Ce résultat préliminaire suggère qu'il existerait un flux d' α -casozépine intacte du compartiment apical vers le compartiment basal. La disparition progressive de l' α -casozépine du milieu apical et l'apparition de nombreux peptides indiquent qu'il existe une dégradation de l' α -casozépine dans ce compartiment.

II.2. Optimisation des paramètres de culture des cellules Caco-2 sur filtres ; conséquences sur l'étude du transfert de l' α -casozépine

Pour utiliser le modèle Caco-2 dans des conditions physiologiques et biochimiques conformes aux conditions entérocytaires *in vivo*, certains paramètres de culture (milieu de culture, nombre de passage, clone cellulaire) ont été modifiés. Le tableau 14 résume les différents protocoles testés lors de l'étude du transfert de l' α -casozépine.

Cependant, les cellules utilisées pour reconstituer cet épithélium sont, au moment de l'étude, à un nombre de passage élevé (entre 200 et 220). Ces repiquages multiples peuvent avoir entraînés des dérives génétiques de la lignée et affecter les propriétés biologiques des

Tableau 14 : Ensemble des protocoles de culture cellulaire effectués pour l'étude de biodisponibilité des peptides d'intérêt.

Culture entretien				
	<u>Origine des cellules</u>	<u>Nombre de passage</u>	<u>Milieu de culture</u>	<u>Taux ensemencement cellules/cm² (boîtes)</u>
Etudes préliminaires	Caco-2, lignée parentale	210-225	A) BDM sans sérum, milieu défini	160 000
	Caco-2, lignée parentale	20-30	B) EMEM 20% sérum	120 000
	Caco-2, lignée parentale	40-50	C) DMEM 1% acides aminés non essentiels 1% pénicilline gentamycine 15% SVF	40 000
Méthode validée par le laboratoire	Caco-2 clone TC7	20-30	D) *DMEM (avec glutamax), 1% Pénicilline Streptomycine 1% acides aminés non essentiels 20% de SVF décomplémenté (30 min à 56°C)	10 000 à 12 000
Culture sur filtres				
	<u>Paramètre du filtre</u>	<u>Porosité</u>	<u>Taux d'ensemencement cellules/cm²</u>	<u>Milieu de culture</u>
Etudes préliminaires	Membrane 4,2 cm ² microporeuse en polyéthylène téréphtalate sur support coaté collagène type I	1,6.10 ⁶ pores de 1µm de diamètre	160 000	BDM sans sérum, milieu défini Apical et basal Changer tous les 2 jours
	Membrane 4,2 cm ² microporeuse en polyéthylène téréphtalate Coaté	1,6.10 ⁶ pores de 1µm de diamètre	50 000	DMEM 1% acides aminés non essentiels 1% pénicilline gentamycine 15% SVF Apical et basal Changer tous les jours
Méthode validée par le laboratoire	Membrane 4,2 cm ² microporeuse en polyéthylène téréphtalate Support non coaté	1,6.10 ⁶ pores de 3 µm de diamètre	50 000	Même milieu de culture que celui de l'entretien (milieu D) des cellules. Apres confluence des cellules sur le filtre, plus de SVF dans le compartiment apical. Changer tous les jours
Etude du transfert				
	<u>Jours d'utilisation</u>	<u>Mesure de résistance ohm.cm²</u>	<u>Milieu de transfert</u>	<u>Protocole</u>
Etudes préliminaires	21 ^e jour	200	Milieu de culture de 24h pH 6	Un puits par point de cinétique
	Entre 17 et 21	400	MES pH 6 en apical HEPES pH 7,4 en basal	Un puits par point de cinétique
	Entre 17 et 21	-	Tampon HBSS	Un puits par point de cinétique Un puits pour tous les points de cinétique
Méthode validée par le laboratoire	Entre 19 et 21	350	Milieu de culture frais sans SVF pré incubation de 15 min	Un puits par point de cinétique

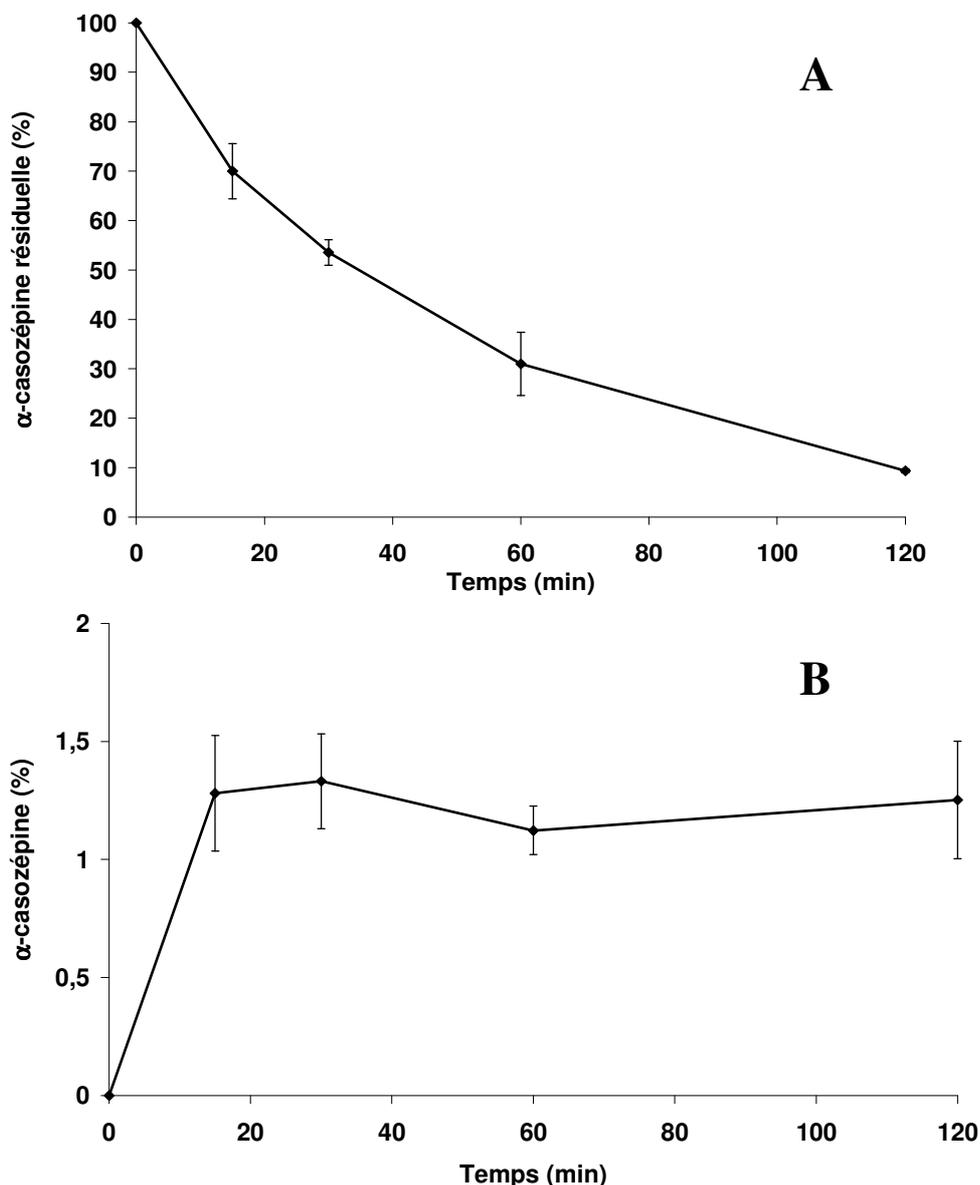


Figure 49 : Etude préliminaire du transfert de l' α -casozépine du compartiment apical (A) vers le compartiment basal (B) de cellules Caco-2 cultivées sur filtre.

Les cellules (nombre de passages entre 210 et 225) sontensemencées à $1,6 \cdot 10^5 / \text{cm}^2$ sur des filtres ($4,2 \text{ cm}^2$) coatés (collagène de type D), incubées à 37°C . Les systèmes puits/filtre sont utilisés au 21^e jour de culture. Le milieu de transfert est le milieu de culture (sans sérum) de 24h, le volume est de 2 mL dans les compartiments apical et basal, ($N=2$, avec un filtre par temps et par répétition). L' α -casozépine ($150 \mu\text{g/mL}$) est détectée à 215 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C_{18} avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique. Les taux résiduels sont exprimés en pourcentage de la quantité initiale d' α -casozépine.

entérocytes. Ces modifications peuvent concerner les systèmes de transfert sans modifier la mesure de la résistance transépithéliale.

Hormis dans les conditions préliminaires (paramètres donnés dans le tableau 13), aucun flux de peptide n'a été mis en évidence : ni de l' α -casozépine ni des produits d'hydrolyse ne sont détectés dans le milieu basal après analyse par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inversée.

Toutefois, l'analyse par CLHP des milieux apicaux montre que l'aire du pic correspondant à l' α -casozépine diminue progressivement au cours du temps d'incubation. Cette diminution semble liée à l'apparition de nouveaux pics sur les chromatogrammes, ce qui met en évidence une hydrolyse de l' α -casozépine par des peptidases membranaires.

La présence de l' α -casozépine ou de ses produits d'hydrolyse n'a pu être établie dans le milieu intracellulaire du fait des difficultés d'identification de produits non radiomarqués au sein d'un milieu complexe comme le milieu intracellulaire.

Shimizu *et al.* (1997) ont mis en évidence le passage du pôle apical vers le pôle basal de la bradykinine (RPPGFSPFR) par voie transcellulaire au travers d'un l'épithélium constitué de cellules Caco-2 cultivées sur filtre. Nous n'avons pas pu mettre en évidence le transfert de ce peptide dans nos conditions expérimentales : aucun transfert de bradykinine n'a été détecté lors de l'analyse par CLHP des milieux basaux. Le milieu de culture, de transfert, le taux d'ensemencement, le nombre de passages des cellules, la concentration des peptides étaient ceux décrits par Shimizu *et al.* (1997), seules l'origine des cellules et l'utilisation de filtres non coatés au collagène I différaient.

II.2.1. Augmentation de la perméabilité de la monocouche cellulaire Caco-2 par ajout de cytochalasine et de glucose

La cytochalasine D ($C_{30}H_{35}NO_6$) (Madara, 1989 ; Shimizu *et al.*, 1997) augmente la perméabilité paracellulaire de l'épithélium reconstitué en altérant la structure du cytosquelette (par inhibition de la polymérisation des filaments d'actine) au niveau des jonctions serrées. L'ajout de cet agent (0,5 μ g/mL) dans le compartiment apical n'a pas permis de mettre en évidence un flux apico-basal d' α -casozépine par la voie paracellulaire (résultats non montrés). Une forte concentration de glucose (25 mM) du côté apical des cellules augmente également la perméabilité en induisant l'altération des jonctions serrées, plus précisément, des filaments d'actine F et de la protéine zonula occludens-1 (Atisook et Madara., 1991 ; D'Souza *et al.*,

2003 ; Pappenheimer *et al.*, 1994). L'ajout de 25 mM de glucose dans le compartiment apical ou dans le compartiment basal, n'a pas entraîné de flux paracellulaire d' α -casozépine (résultats non montrés). La valeur de la résistance transépithéliale qui était de 200 ohm.cm² en présence de glucose (contre approximativement 300 ohm.cm² en son absence) traduit pourtant une légère augmentation de perméabilité de l'épithélium.

II.2.2. Augmentation de la résistance de l' α -casozépine aux peptidases de la bordure en brosse de l'épithélium intestinal par ajout d'inhibiteurs non cytotoxiques

Fujita *et al.*, 1998 ; Hua *et al.*, 2004 ; Huneau *et al.*, 1994 et Quan *et al.*, 1999 attribuent le faible taux de perméabilité, voire l'absence de transfert de certains peptides au travers de l'épithélium intestinal, au manque de stabilité du peptide d'intérêt face aux peptidases de la bordure en brosse. Les expériences réalisées montrent que l' α -casozépine montre une sensibilité vis-à-vis des systèmes protéasiques intestinaux. Pour augmenter la stabilité de l' α -casozépine, et accroître ses possibilités de transfert, un cocktail d'inhibiteurs protéolytiques non cytotoxiques (aprotinine, bestatine, leupeptine, E-64 et pepstatine A) a été ajouté dans le compartiment apical. En présence de ces inhibiteurs, 80 % de la quantité d' α -casozépine initiale sont encore présents dans le milieu apical après 120 minutes d'incubation à 37°C, contre approximativement 12 % en absence d'inhibiteurs (figure 50). Toutefois, l'augmentation de la résistance de l' α -casozépine vis-à-vis de l'hydrolyse dans le milieu apical (obtenue par l'inhibition des peptidases de la bordure en brosse) n'a pas permis, dans nos conditions expérimentales, d'observer son transfert vers le compartiment basal (résultats non montrés).

II.3. Devenir des peptides F97 et F95 en contact avec la membrane apicale de cellules Caco-2

Les deux fragments peptidiques, F97 (⁹¹YLGYLEQ⁹⁷) et F95 (⁹¹YLGYL⁹⁵), résistants *in vitro* aux protéases gastrique et pancréatiques, ont été administrés à des rats par injection intra-péritonéale. Ils s'avèrent être porteur *in vivo* d'une activité anxiolytique, bien qu'ils soient tronqués de la partie carboxy-terminale qui semblait indispensable à la structuration active l' α -casozépine (Lecouvey *et al.*, 1997). Ceci suggère donc que ces peptides puissent atteindre les récepteurs GABA_A centraux après franchissement de l'épithélium intestinal.

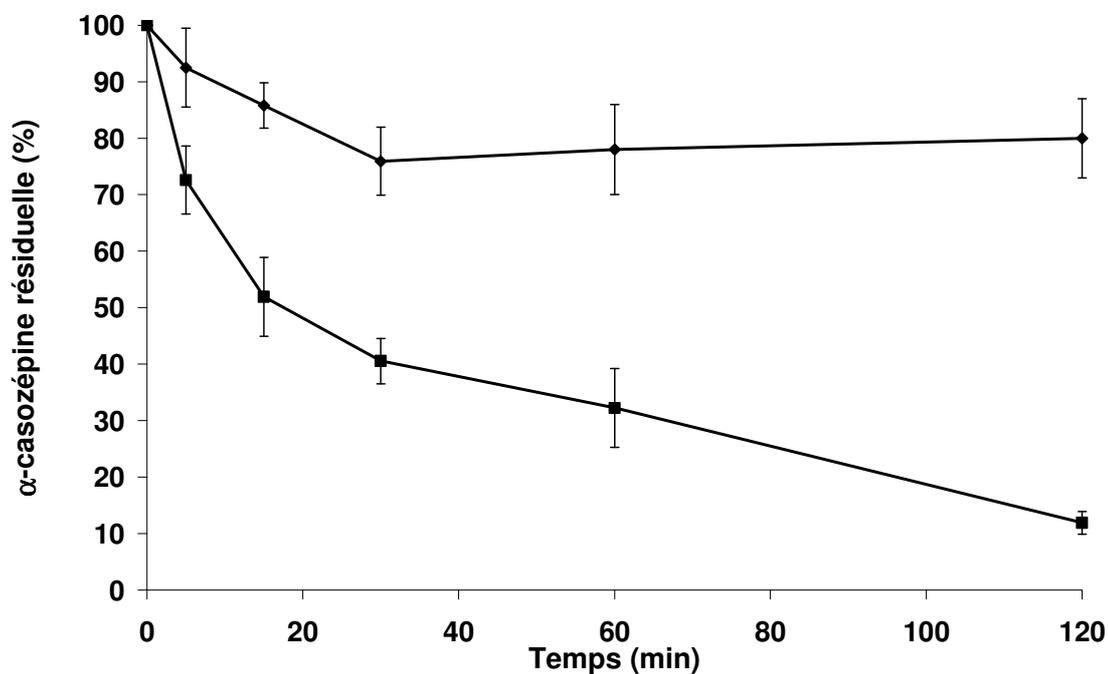


Figure 50 : Cinétiques de dégradation de l'α-casozépine dans le compartiment apical, en présence ou non d'inhibiteurs de protéases non cytotoxiques.

L'α-casozépine (400 µg) est présente dans le compartiment apical (2 mL de milieu de transfert HBSS) des systèmes puits/filtre à 37°C, en contact avec les cellules Caco-2 (passage 27) au 17^e jour de culture, en présence d'inhibiteurs protéasiques (●), et sans inhibiteur (■), (*N*=2, avec un filtre par temps et par répétition). L'α-casozépine est détectée à 215 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique. Les taux résiduels sont exprimés en pourcentage de la quantité initiale d'α-casozépine.

II.3.1. Etude du transfert des fragments F97 et F95 avec le modèle cellulaire Caco-2

Le transfert des fragments F97 et F95 a été individuellement testé avec les cellules Caco-2 sur filtre comme modèle d'épithélium intestinal. Les conditions expérimentales étaient les mêmes que pour l'étude du transfert de l' α -casozépine. Comme pour l' α -casozépine, après dépôt dans le compartiment apical et pour des temps d'incubations allant de 15 à 180 minutes à 37°C, aucune trace des peptides F97 et F95 n'a pu être détectée dans le milieu basal par CLHP en phase inversée sur colonne C₁₈ (résultats non montrés). L'ajout d'une forte concentration de glucose (25 mM) dans le compartiment apical n'a pas influencé leur transfert vers le pôle basal.

III. DEGRADATION DE L' α -CASOZEPINE ET DES PEPTIDES F97 ET F95 PAR LES PEPTIDASES DE LA BORDURE EN BROSSE DES CELLULES Caco-2

III.1. Hydrolyse de l' α -casozépine dans le milieu apical

Les analyses CLHP des prélèvements effectués dans le compartiment apical à différents temps d'incubation montrent que le taux d' α -casozépine diminue progressivement, sans que cela soit dû au passage du peptide vers le compartiment basal. L'apparition conjointe de nouveaux pics sur les chromatogrammes issus de l'analyse de ces prélèvements, et les références bibliographiques indiquant la présence de nombreuses peptidases membranaires pour les cellules Caco-2 différenciées en cellules entérocytaires écartent l'hypothèse d'une éventuelle adsorption et/ou absorption de l' α -casozépine par les cellules.

III.1.1. Potentiel protéolytique de la bordure en brosse des cellules Caco-2 et des milieux apicaux

Les peptides d'intérêt sont dégradés dans le compartiment apical. La présence des peptidases de la bordure en brosse explique ces hydrolyses. Certaines des peptidases membranaires mises en évidence au niveau des microvillosités formées par la membrane plasmique apicale des cellules Caco-2 différenciées : dipeptidylpeptidase IV, leucine aminopeptidase (Fricker et Drewe 1995), aminopeptidase N, peptidylpeptidase A, aminopeptidase P, endopeptidase 24-11 (Howells *et al.*, 1992) aminopeptidase B (Quan *et al.*, 1999), sont responsables de la

dégradation de l' α -casozépine. Nous avons également constaté que les milieux apicaux ayant été en contact avec la bordure en brosse pendant divers temps d'incubation possèdent également un potentiel protéolytique.

Pour plus de simplicité dans la lecture nous appellerons milieu « *in vitro* » le milieu en contact avec la bordure en brosse, et milieu « *ex vitro* » le milieu pré-incubé un temps défini avec la bordure en brosse puis extrait du compartiment apical.

III.1.1.1 Protéolyse de l' α -casozépine par les milieux apicaux « *ex vitro* »

Les milieux « *ex vitro* » en contact pendant différents temps avec le pôle apical de la monocouche de cellules Caco-2 différenciées possèdent un potentiel protéolytique. Le milieu du compartiment apical, après un contact de 15, 30, 60, ou 120 minutes avec la monocouche de cellules Caco-2, a été testé. Les cinétiques correspondant aux différents temps d'incubation de l' α -casozépine à 37°C avec ces milieux sans cellules sont présentées. Les résultats montrent que plus les milieux sont restés longtemps en contact avec les cellules Caco-2 dans le compartiment apical, plus ils possèdent une activité hydrolytique sur l' α -casozépine. Après deux heures de cinétique, le taux résiduel d' α -casozépine est de 65 %, 47 %, 32 % et 22 % avec les milieux ayant été respectivement 15 min, 30 min, 60 min et 120 min au contact du pôle apical des cellules Caco-2 (figure 51). Ces hydrolyses sont le résultat de peptidases solubles. Ces peptidases solubles peuvent être des peptidases excrétées par les cellules mais aussi des peptidases libérées par des cellules Caco-2 mortes. Ceci signifie que lors des études de transfert, plus le milieu apical (dans lequel le peptide est déposé) aura été longtemps au contact des cellules avant l'ajout du peptide plus il exercera une activité hydrolytique forte. Cette activité s'ajoutera à celle exercée par les peptidases membranaires.

III.1.1.2. Comparaison des cinétiques de dégradation de l' α -casozépine par les milieux apicaux « *ex vitro* » et « *in vitro* »

Pour essayer de mettre en évidence la part d'hydrolyse attribuable aux peptidases solubles dans le milieu apical et celle résultant des peptidases membranaires, les cinétiques d'hydrolyse de l' α -casozépine par deux milieux apicaux « *ex vitro* », pré incubés 2 heures et 24 heures dans le compartiment apical, ont été comparées aux cinétiques de dégradation de l' α -casozépine par des milieux « *in vitro* » de 2 heures et 24 heures (figure 52).

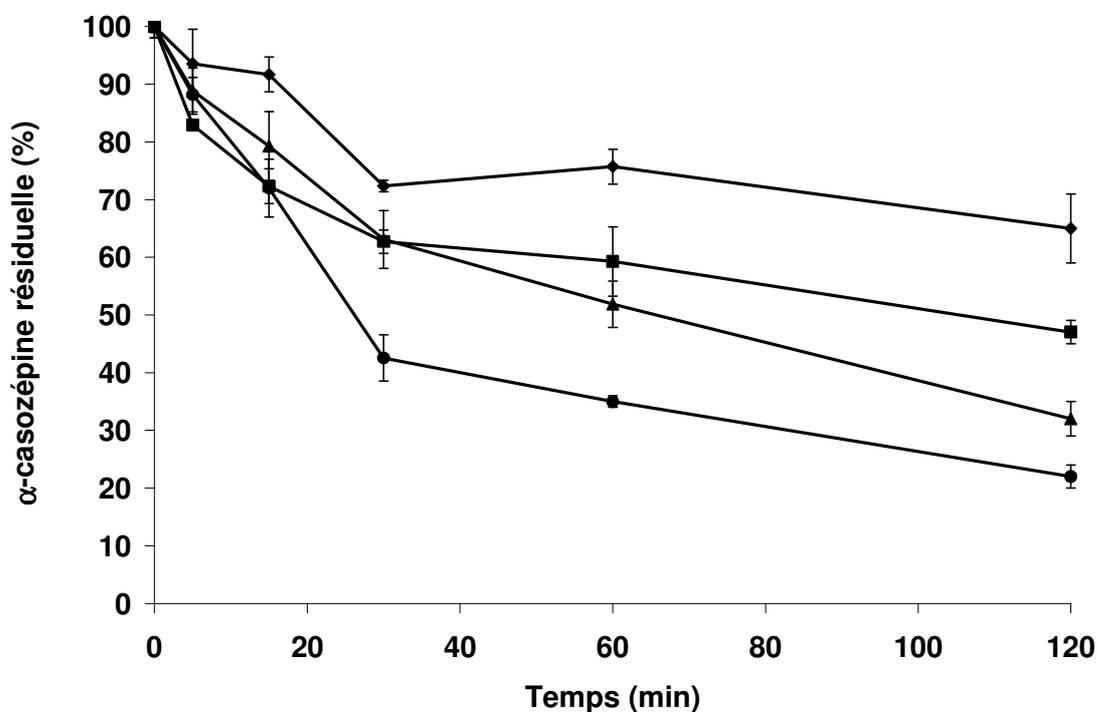


Figure 51: Cinétiques d'hydrolyse de l' α -casozépine par les milieux apicaux « *ex vitro* » en contact préalable pendant 15, 30, 60, 120 minutes avec le pôle apical des cellules Caco-2.

Les hydrolyses de l' α -casozépine (200 μ g/mL) ont lieu dans les différents milieux apicaux (tampon HBSS, 2mL) pré-incubés 15 (♦), 30 (■), 60 (▲), 120 (●) min, à 37°C avec les cellules Caco-2 au 19^e jour de culture ; ($N=2$).

L' α -casozépine est détectée à 215 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ (240 x 4 mm ; 5 μ m de taille de particule ; 10 mm de porosité) avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique. Les taux résiduels sont exprimés en pourcentage de la quantité initiale d' α -casozépine.

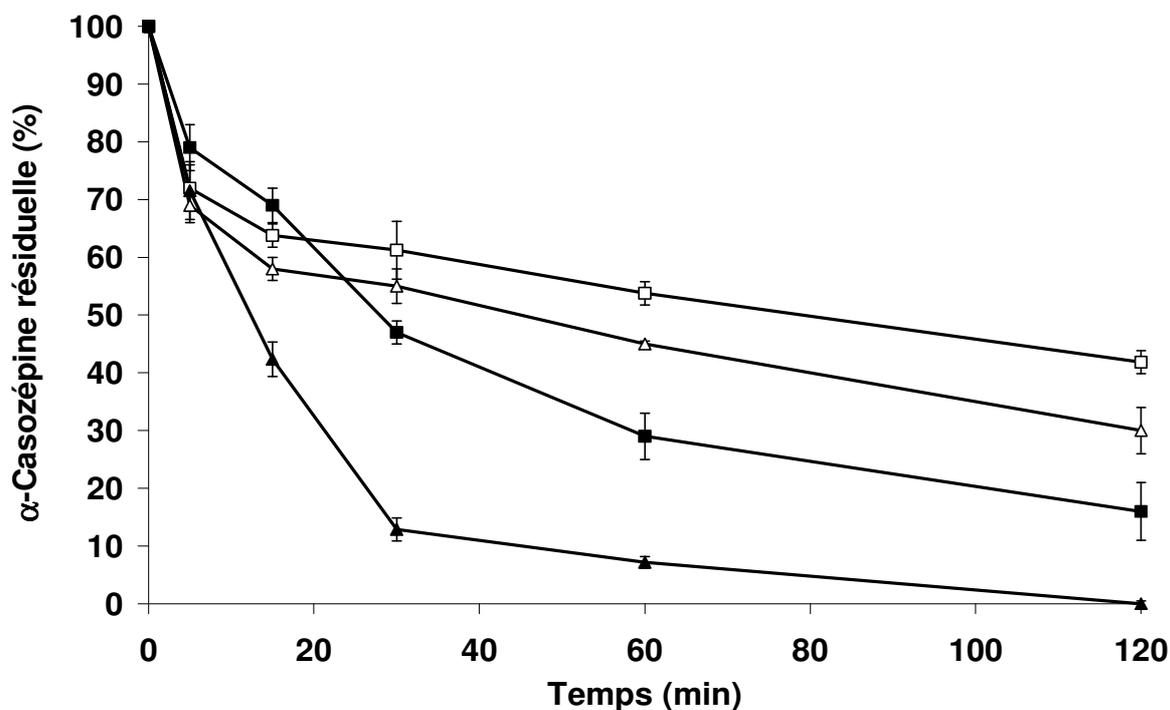


Figure 52: Cinétiques d'hydrolyse de l' α -casozépine par deux milieux « *in vitro* » pré-incubés 2h (■) et 24h (▲) avec le pôle apical des cellules Caco-2, et par deux milieux « *ex vitro* » pré-incubés 2h (□) et 24h (△) avec le tapis cellulaire puis extraits du compartiment apical, à 37°C.

L' α -casozépine (200 $\mu\text{g/mL}$) est détectée à 215 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique LichroCart C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique. Les taux résiduels sont exprimés en pourcentage par rapport à la quantité initiale de peptide. (N=2).

Sur les 5 premières minutes les taux résiduels d' α -casozépine sont quasiment identiques entre les 4 milieux, soit $69 \pm 4 \%$, $72 \pm 3 \%$ et $72 \pm 4 \%$, $79 \pm 5 \%$ pour les milieux 24 h et 2 h « *ex vitro* » et 24 h et 2 h « *in vitro* » respectivement. On peut donc supposer que la dégradation serait due dans un premier temps aux peptidases solubles. Après 15 minutes d'incubation, et jusqu'à la fin de l'incubation, on observe des différences importantes dans les taux résiduels d' α -casozépine en fonction du milieu dans lequel le peptide se trouve.

Le milieu de 24h « *in vitro* » possède un potentiel protéolytique plus fort que le milieu de 2h « *in vitro* » avec des taux résiduels d' α -casozépine respectif de 16 % et 0 % par rapport à la quantité initiale. De même le milieu de 24 h « *ex vitro* » exerce une hydrolyse plus forte que le milieu de 2 h « *ex vitro* » avec respectivement à la fin de la réaction, un taux résiduel de 30 % et 42 % de la quantité initiale d' α -casozépine.

Ces résultats mettent en évidence le fort potentiel de dégradation des peptidases de la bordure en brosse, et la présence dans le milieu apical de peptidases dites solubles. Dans nos conditions de culture du modèle cellulaire Caco-2, les peptidases solubles semblent avoir un potentiel protéolytique plus important que les peptidases membranaires (tableau 15).

III.2. Caractérisation des produits issus de la dégradation partielle de l' α -casozépine par les cellules Caco-2

Cinq produits issus de la dégradation de l' α -casozépine sont mis en évidence par CHPL en phase inversée sur colonne C₁₈ à 215 nm. Les fragments peptidiques correspondant aux pics de temps de rétention suivant : 37 min, 46 min, 51 min, 52 min, 56 min n'ont pas été identifiés par spectrométrie de masse.

L'identification par LC-MS/MS-MS des fragments peptidiques (ayant le même temps de rétention) obtenus lors de l'hydrolyse de l' α -casozépine par les peptidases gastriques, pancréatiques et intestinales (VMBB), suggère que le pic possédant un au temps de rétention 37 min correspondrait au fragment F97. Pour faciliter la lecture, nous nommerons FTR_x les fragments peptidiques correspondant aux pics de temps de rétention X min.

La figure 53 présente les cinétiques de libération des produits d'hydrolyse de l' α -casozépine détectés dans le milieu apical (étude *in vitro*). Le fragment F97 est libéré de manière croissante sur les 15 premières minutes de cinétique, puis son taux reste constant jusqu'à la fin de la réaction.

Tableau 15: Potentiel protéolytique des peptidases solubles (milieu « *ex vitro* ») et des peptidases membranaires (« *in vitro* » - « *ex vitro* »), obtenu par soustraction du pourcentage d'hydrolyse de l' α -casozépine par les peptidases solubles au pourcentage d'hydrolyse de l' α -casozépine (CZP) par les peptidases totales (milieu « *in vitro* ») (d'après les résultats de la figure 52).

Temps de cinétique enzymatiques (min)	% CZP hydrolysée		% CZP hydrolysée		% CZP hydrolysée	
	24h "in vitro"	2h "in vitro"	24h "ex vitro"	2h "ex vitro"	24h "in vitro"- "ex vitro"	2h "in vitro"- "ex vitro"
5	28	21	21	13	7	8
15	58	31	33	23	25	8
30	87	53	45	32	42	21
60	93	71	50	36	43	35
120	100	86	64	45	36	41

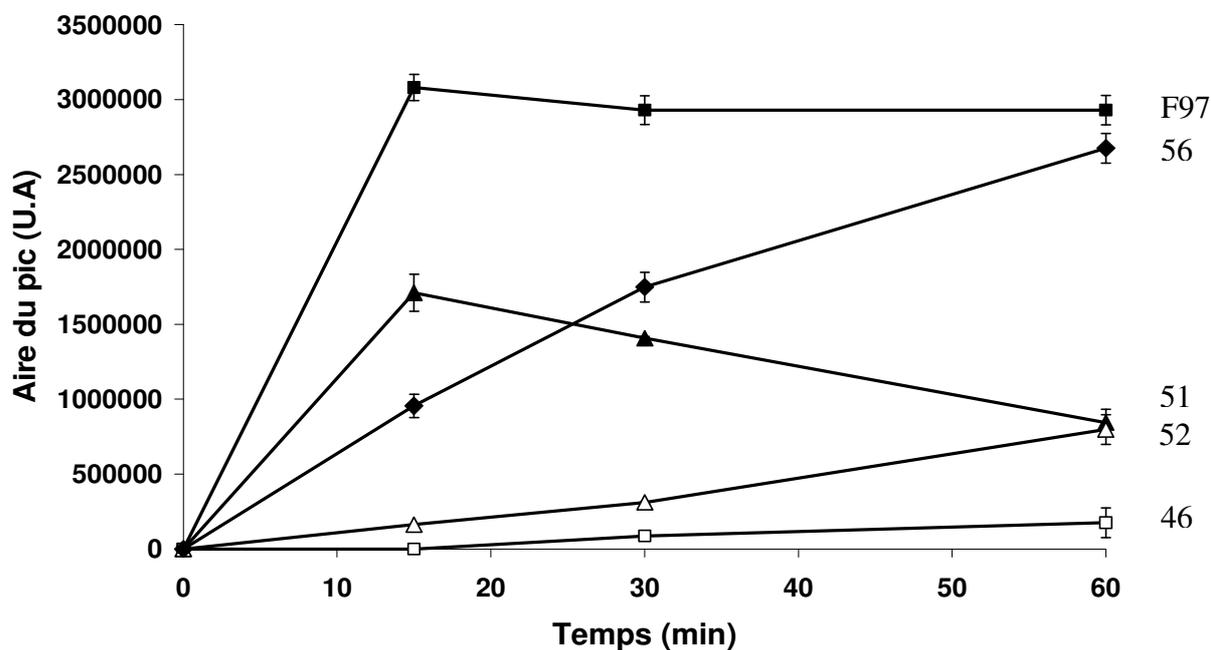


Figure 53: Cinétiques de formation des produits obtenus lors de l'hydrolyse de l' α -casozépine par les peptidases des cellules Caco-2.

Les hydrolyses ont lieu dans le compartiment apical des cultures de cellules Caco-2 (passage 28) incubées à 37°C. Deux cent $\mu\text{g/mL}$ d' α -casozépine sont mis en solution dans le milieu de transfert (milieu de culture sans SVF) dans un volume apical final de 1,5 mL, au 20^e jour de culture du système, ($N=2$, avec un filtre par temps et par répétition).

Les produits sont détectés à 215 nm dans le milieu apical par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique Lichrospher C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique. ■ : F97, ▲ : FTR₅₁, ◆ : FTR₅₆, □ : FTR₄₆, △ : FTR₅₂.

U.A. (unité arbitraire)

Les taux de libération des fragments FTR₅₂ et FTR₅₆ croissent progressivement tout au long de la cinétique. Le fragment FTR₄₆ n'est obtenu qu'après 15 min de réaction, temps à partir duquel le taux de libération de FTR₅₁ diminue. Le fragment FTR₄₆ pourrait être un produit secondaire de FTR₅₁.

III.2.1 Comparaison des cinétiques de formation des produits de dégradation de l' α -casozépine par les milieux « *ex vitro* » et « *in vitro* »

Les cinétiques de libération de la tyrosine libre, du fragment F97 et du produit FTR₅₂ présents lors de l'hydrolyse de l' α -casozépine dans les milieux apicaux « *in vitro* » et « *ex vitro* » (2 et 24 h de contact avec les cellules Caco-2) ont été comparés.

De la tyrosine libre est libérée dans les 3 milieux. Sa libération est nettement plus importante dans le système comportant les cellules Caco-2, et donc en présence des peptidases membranaires de la bordure en brosse (figure 54 A).

Les cinétiques de libération du fragment FTR₅₂ dans le milieu apical « *in vitro* » et dans le milieu apical « *ex vitro* 24 h d'incubation » sont très semblables. Ce fragment est également généré par le milieu « *ex vitro* 2 h d'incubation », mais en proportion moindre (figure 54 B).

Le fragment F97 est libéré de façon très semblable dans les trois milieux pendant une heure, puis sa libération stagne voire diminue dans le compartiment apical « *in vitro* », alors que son taux augmente encore dans les deux milieux « *ex vitro* » jusqu'à la fin de l'incubation (figure 54 C).

III. 3. Hydrolyse des fragments F97 et F95 et les produits formés

Comme l' α -casozépine, les fragments F97 et F95 subissent une dégradation par les peptidases membranaires et solubles présentes dans les milieux apicaux « *in vitro* ».

L'allure des cinétiques de dégradation *in vitro* de l' α -casozépine et des fragments F97 et F95 dans les milieux apicaux en présence de la bordure en brosse sont similaires (figure 55) ; la quantité résiduelle de peptide décroît au cours du temps. Après une heure d'incubation il reste respectivement 58 %, 41 % et 33 % des taux initiaux de F97, F95 et α -casozépine déposées à t₀ dans le compartiment apical.

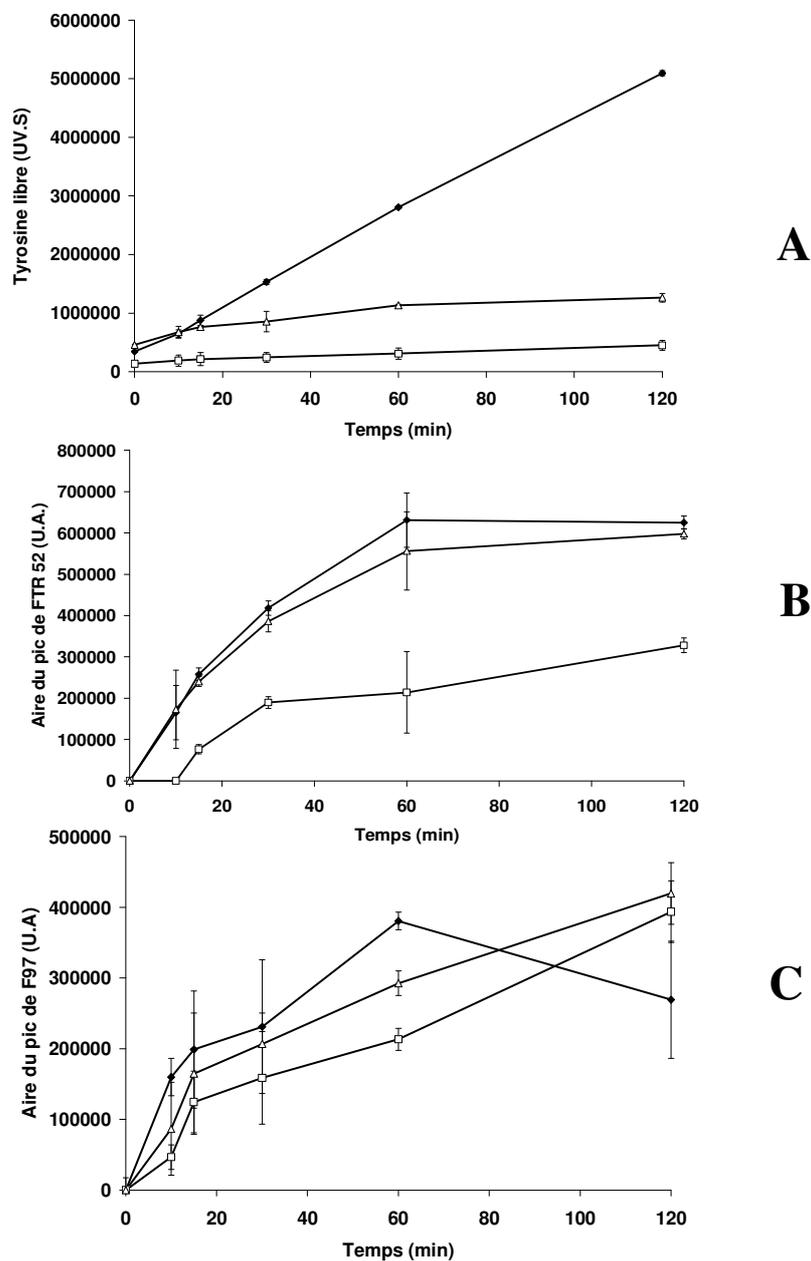


Figure 54: Cinétiques de libération de la tyrosine (A), du fragment FTR₅₂ (C) et du fragment F97 (C) générés par l'hydrolyse de l' α -casozépine par les peptidases présentes dans 3 types différents de milieux apicaux.

Le compartiment apical en contact avec le tapis cellulaire (●) et les milieux de contact après 2h (□) et 24 h (Δ) d'incubation préalable avec l'épithélium sont utilisés à 37°C d'incubation.

Les hydrolyses sont effectuées dans le milieu de transfert (milieu de culture sans SVF) apical avec 200 μ g/mL d' α -casozépine dans un volume final de 1,5 mL. Les cellules Caco-2, passage 50, sont utilisées au 21^e jour de culture du système puits/filtre, (N=2).

Les produits d'hydrolyses sont détectés à 215 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur une colonne analytique Lichrospher C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique.

U.A. (unité arbitraire).

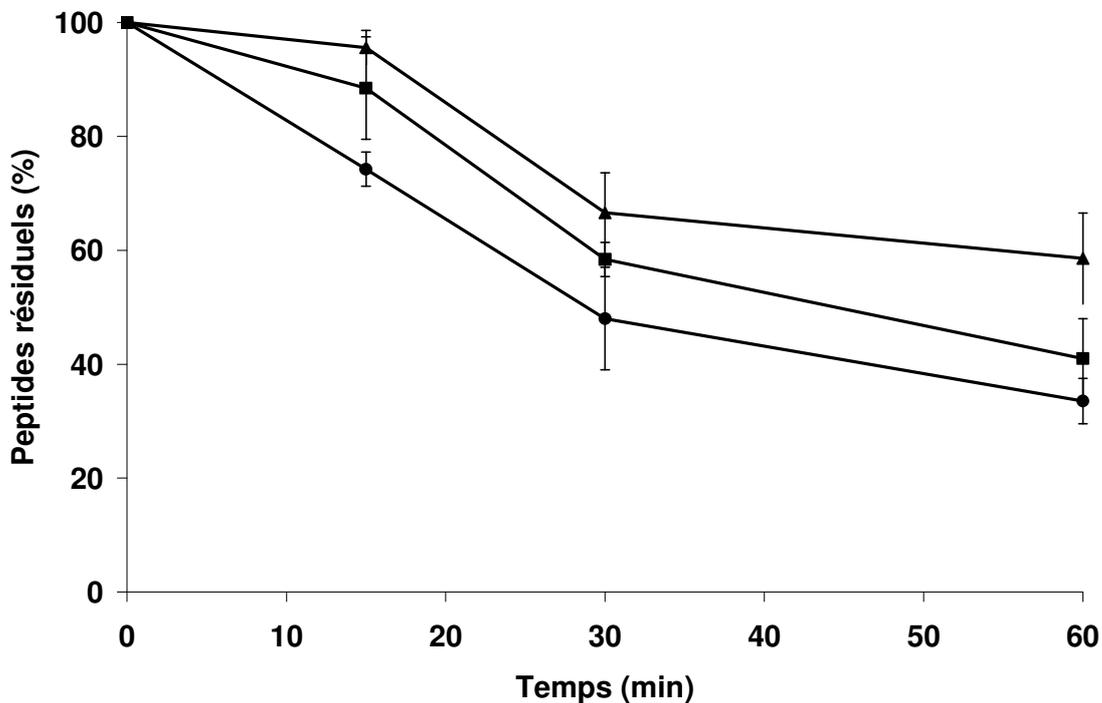


Figure 55 : Cinétiques de dégradation « *in vitro* » de l' α -casozépine et des fragments F97 et F95.

Les hydrolyses ont lieu dans le milieu apical des systèmes puits/filtre incubé à 37°C. Deux cents $\mu\text{g/mL}$ (157 μM) d' α -casozépine, 150 $\mu\text{g/mL}$ (169 μM) de F97 et 100 $\mu\text{g/mL}$ (159 μM) de F95 sont mis en solution dans le milieu de transfert (milieu de culture sans SVF) pour un volume apical final de 1,5 mL, au 20^e jour de culture du système. Les cellules (clone TC7) sont au 28^e passage, ($N=2$, avec un filtre par temps et par répétition).

Les peptides sont détectés à 215 nm par chromatographie liquide haute performance de phase inverse sur une colonne analytique Lichrospher C_{18} avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique. Les taux résiduels sont exprimés en pourcentage par rapport à la quantité de peptide initiale. ● : α -casozépine, ▲ : F97 et ■ : F95.

Les produits FTR₁₆, FTR₂₁, FTR₂₂ et FTR₃₀ issus de la dégradation de F97 sont libérés dès le début de la cinétique et leurs taux croissent jusqu'à 60 min (figure 56 A). Il en est de même pour les produits FTR₁₆, FTR₂₁ FTR₂₆ issus du fragment F95 (figure 56 B).

Les produits FTR₁₆ et FTR₂₁ obtenus lors de la dégradation enzymatique de F97 et de F95 n'ont pas été identifiés. Cependant nous pouvons émettre l'hypothèse que ces pics de CLHP correspondent à des fragments peptidiques identiques.

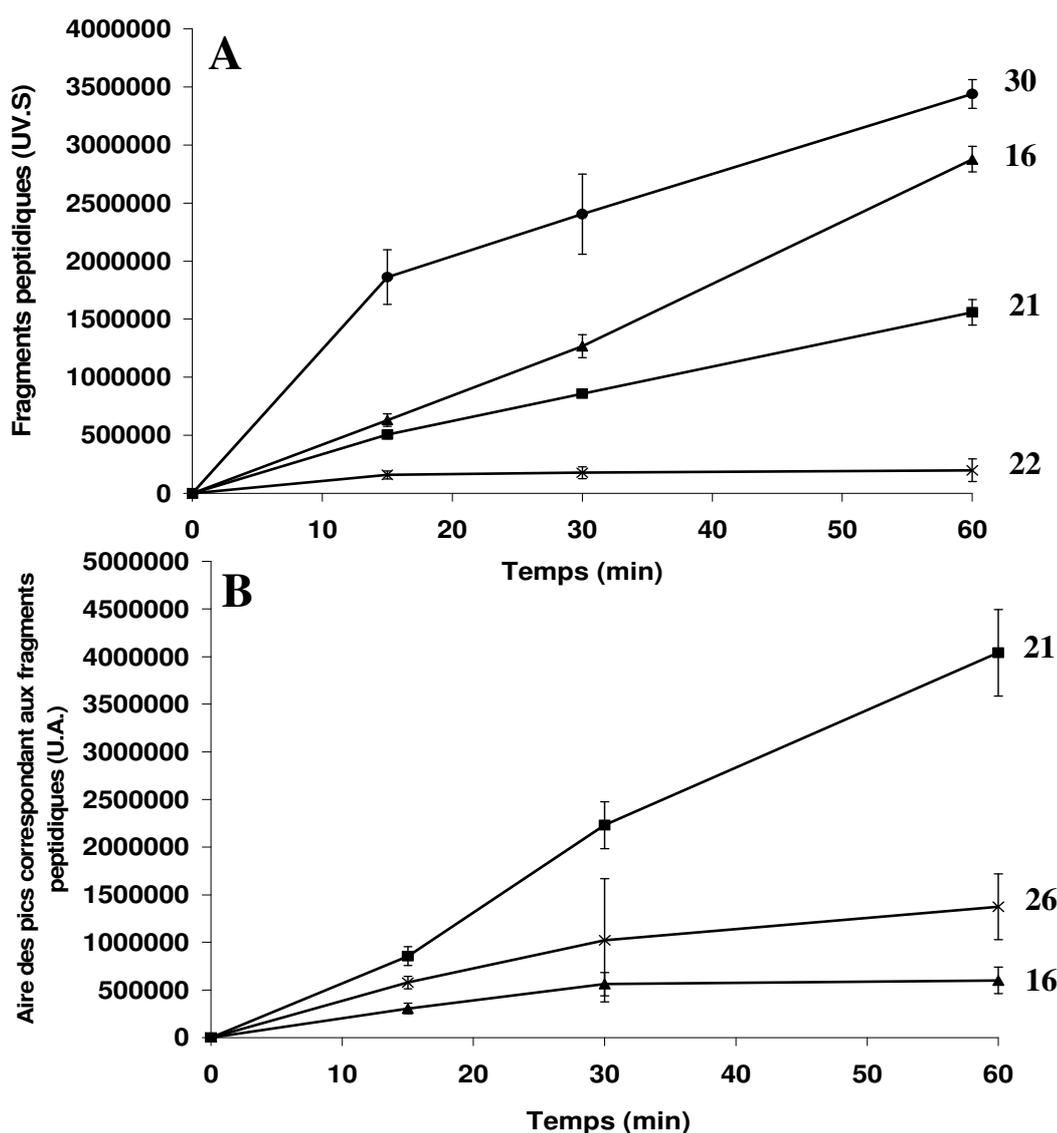


Figure 56: Cinétiques de libérations « *in vitro* » des produits d'hydrolyse des fragments F97 (A) et F95 (B).

Les hydrolyses ont lieu dans le milieu apical des systèmes puits/filtre en présence des cellules Caco-2 incubés à 37°C. 150 µg/mL de F97 (169 µM) et 100 µg/mL de F95 (159 µM) sont mis en solution dans le milieu de transfert (milieu de culture sans SVF) dans un volume apical final de 1,5 mL, au 20^e jour de culture du système. Les cellules (clone TC7) sont au 28^e passage, (N=2, avec un filtre par temps et par répétition). Les produits sont détectés à 215 nm par chromatographie liquide haute performance en phase inverse sur une colonne analytique Lichrospher C₁₈ avec un gradient de 5% à 40% (v/v) d'acétonitrile dans l'eau pendant 70 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique. (A) ● : FTR₃₀, x : FTR₂₂ (A) et (B) ▲ : FTR₁₆ et ■ : FTR₂₁ et (B) x : FTR₂₆.

U.A. (unité arbitraire).

Conclusions

Les résultats obtenus apportent des informations d'une part sur le modèle Caco-2 employé pour étudier le transfert et la dégradation des peptides d'intérêt et d'autre part sur le métabolisme des peptides : α -casozépine, F97 et F95.

Choix d'une méthode de culture du clone TC7 sur filtres

Les études de transfert au niveau de la barrière intestinale se heurtent aux limites d'utilisation des cultures organotypiques, et à différents problèmes d'hétérogénéités cellulaires. D'où l'intérêt qu'a suscité l'utilisation de la lignée de cellules cancéreuses de côlon, Caco-2 (Pinto *et al.*, 1983 ; Zweibaum *et al.*, 1983) et plus particulièrement du clone TC7 (Rousset, 1985 ; Caro *et al.*, 1995). Ce modèle cellulaire Caco-2/TC7 a semblé pertinent pour étudier *in vitro* le comportement de l' α -casozépine et de ces produits d'hydrolyse par les protéases gastriques et pancréatiques, F97 et F95, aux abords d'un épithélium entérocytaire reconstitué. Les cellules différenciées du clone TC7 exhibent des caractéristiques phénotypiques (des microvillosités, des jonctions serrées et des cellules polarisées) similaires au clone parental Caco-2. Cependant le clone TC7 conserve des cellules de taille plus homogène. D'autres caractéristiques telles que le niveau d'expression de la sucrase-isomaltase, de l'UDP-glucuronyltransférase et la vitesse de transport actif de l'acide taurocholique, notamment, font du clone TC7 un modèle plus proche des propriétés fonctionnelles du jéjunum chez l'Homme et donc un bon modèle d'étude intestinale des mécanismes de biotransformation des xénobiotiques (Caro *et al.*, 1995 ; Grès *et al.*, 1998).

Nos résultats préliminaires, montrant un transfert de l' α -casozépine intacte du compartiment apical vers le compartiment basal, se sont avérés, à l'analyse, être obtenus dans des conditions de cultures peu conformes. Ce constat, établi après approfondissement des connaissances sur les propriétés et facteurs influençant la validation du modèle cellulaire Caco-2 (passage des cellules Caco-2 compris entre 200 et 230, milieu de transfert en contact avec le tapis cellulaire depuis 24h lors du dépôt de l' α -casozépine) a conduit à poursuivre les expériences menées sur le modèle Caco-2 en y effectuant des modifications (tableau 14).

En effet, en fonction de l'origine des cellules utilisées, des milieux, des supports, des laboratoires qui emploient ce modèle, une variabilité des résultats peut être observée.

Ces variabilités nous ont conduit à établir une méthode de culture du clone TC7 avec un suivi de la différenciation cellulaire et de la perméabilité de l'épithélium reconstitué par l'utilisation d'indicateurs n'utilisant ni des techniques radioactives, ni des molécules fluorescentes : le dosage des protéines totales et de la PAL (marqueurs de différenciation biochimique ; Boulenc 1997 ; Walter et Kissel, 1995) ainsi que la mesure de la résistance transépithéliale (marqueur de différenciation morphologique ; Artursson et Karlsson, 1991, Cogburn *et al.*, 1991 ; Grasset *et al.*, 1984 ; Hidalgo *et al.*, 1989 ; Rubas *et al.*, 1992 ; Rubas et Grass, 1993). Ces indicateurs garantissent l'intégrité de l'épithélium, pour l'ensemble des résultats effectués au sein du laboratoire en accord avec la bibliographie.

Transfert de l' α -casozépine et des fragment F97 et F95

Le résultat de l'étude préliminaire montre que l' α -casozépine a pu franchir l'épithélium dans les conditions expérimentales décrites dans le tableau 14. Après 15 minutes de contact et jusqu'à la fin de l'expérience, 1,2 % de la quantité d' α -casozépine initialement déposée (150 $\mu\text{g/mL}$, 0,118 $\mu\text{mol/mL}$) dans le compartiment apical sont détectées dans le compartiment basal (avec un puits/temps). L'hypothèse d'une dégradation de l' α -casozépine dans le milieu basal est écartée par les résultats obtenus antérieurement (Balandras, 2002). L'interprétation de ces résultats pose problème néanmoins et a nécessité la mise au point d'une méthode de culture en modifiant certains paramètres de culture. Les résultats obtenus dans des conditions standardisées montrent que l' α -casozépine déposée dans le compartiment apical n'est pas détectée dans le compartiment basal. Ceci peut suggérer : 1) l' α -casozépine ne peut pas traverser sous forme intègre *in vitro* l'épithélium entérocytaire reconstitué par la lignée cellulaire TC7 ; 2) les quantités présentes dans le compartiment basal sont en dessous du seuil de détection des méthodes d'analyse ; 3) les conditions de culture ne sont pas encore optimales.

La dégradation du décapeptide par les peptidases membranaires et solubles présentes au pôle apical pourrait éventuellement empêcher son transport. Cependant dans les conditions de culture utilisées, il persiste 40 % de la quantité initiale d' α -casozépine dans le milieu apical après une heure de cinétique. Par ailleurs, l'étude en présence d'un cocktail d'inhibiteurs garantissant moins de 20 % de dégradation de l' α -casozépine dans le compartiment apical après 120 min de contact, n'a pas permis de mettre en évidence un transfert de l' α -casozépine. La dégradation par des peptidases n'est probablement pas le facteur limitant le transfert de l' α -casozépine.

La présence de glucose (25 mM) ou de cytochalasine D (0,5 µg/mL) - deux molécules augmentant la perméabilité paracellulaire par distension des jonctions serrées - n'engendre pas un flux d' α -casozépine du milieu apical vers le milieu basal. Cependant, l'absence de molécule témoin ne permet pas d'affirmer si le non transfert de l' α -casozépine est dû à un manque d'efficacité du glucose ou de la cytochalasine D ou à l'incapacité de l' α -casozépine (par ces propriétés physicochimiques) à emprunter la voie paracellulaire pour atteindre le compartiment basal. En effet, les transferts par la voie paracellulaire semblent privilégier de petites molécules, plutôt hydrophiles, de diamètre inférieur à 15 Å.

Cependant, des transferts apico-basaux de peptides tels que le 1-déamino-8-D-arginine-vasopressine (CYFQDCPRG ; PM 1087,20 Da ; pI 8,0 ; Lundin et Artursson, 1990), le peptide antihypertensif HLPLP (PM 575,71 Da ; pI 6,74 ; Quiros *et al.*, 2008), le peptide GGYR (PM 451,48 Da ; pI 8,75 ; Shimizu *et al.*, 1997), le tripeptide inhibiteur de l'ECA VPP (PM 322,38 Da ; pI 5,49 ; Satake *et al.*, 2002) ont pu être mis en évidence par la voie paracellulaire avec le modèle Caco-2 *in vitro* (tableau 5). *In vivo*, chez le rat, le passage paracellulaire du D-octapeptide QASASYSA (PM 783,79 Da ; pI 5,52) au travers de l'épithélium intestinal a été mis en évidence en présence de glucose (5% p/v ; Pappenheimer *et al.*, 1994).

Les mécanismes de transport transcellulaire de peptides de plus de 3 résidus d'acide aminé ne sont pas encore très précisément décrits. L'utilisation d'inhibiteurs de la polymérisation des microtubules tels que la colchicine permet de mettre en évidence le passage de peptide par le mécanisme de transcytose (Shimizu *et al.*, 1997). Les résultats obtenus ici, dans nos conditions de culture *in vitro*, indiquent que l' α -casozépine ne semble pas emprunter la voie transcellulaire. Pourtant, il a été montré un flux d'oligopeptides, par voie transcellulaire avec le modèle Caco-2, pour la lactokinine (ALPMHIR ; PM 837,05 Da ; pI 9,80) testée en chambre de Ussing (Vermeirssen *et al.*, 2002) et pour la bradykinine (RPPGFSPFR ; PM 1060,22 Da ; pI 12,00 ; Shimizu *et al.*, 1997) testée avec le système puits/filtre. Le pI basique de la bradykinine pourrait être un élément favorable à la transcytose. Les charges positives portées par les résidus d'arginine au pH physiologique faciliteraient l'interaction avec la membrane plasmique chargée négativement à pH 7,4. Les molécules ayant une valeur de pI située entre 4,5 et 7 (α -casozépine pI 6,00) seraient au contraire dans un état d'ionisation peu favorable pour interagir avec la membrane plasmique (Schusdziarra *et al.*, 1983).

Par ailleurs, aucune trace de fragments peptidiques ou d'acides aminés libres issus de la dégradation de l' α -casozépine n'a été détectée, dans nos conditions d'analyses, dans le compartiment basal. Cependant, Vermeirssen *et al.* (2002) montrent que la lactokinine n'est pas détectée par chromatographie liquide haute performance dans le compartiment séreux (d'une chambre de Ussing) mais y est identifié après analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Les méthodes de détections utilisées lors de ces expériences ne sont peut-être pas assez sensibles pour permettre de mettre en évidence le passage de très faibles quantités de peptide.

Dans la littérature, des résultats d'absence de transfert de peptides ont été répertoriés. Augustijns et Borchard (1995) ont montré que le nonapeptide DISP (pour delta sleep-inducing peptide ; WAGGDASGE ; PM 848,82 Da ; pI 4,09) ne traverse pas l'épithélium reconstitué par les cellules de lignée Caco-2, même en présence d'inhibiteurs protéasiques lui assurant une grande stabilité dans le milieu apical.

Le transfert d'oligopeptide au travers d'un épithélium intestinal reconstitué à l'aide de cellules Caco-2 semble variable et fonction d'un grand nombre de paramètres (Knipp *et al.*, 1997).

Les fragments amino-terminaux F97 et F95 de l' α -casozépine ne sont pas non plus détectés dans le compartiment basal de la lignée TC7 dans nos conditions de cultures *in vitro*, y compris en présence de glucose (25 mM).

Leurs caractéristiques physicochimiques, qui diffèrent de celles de l' α -casozépine, auraient cependant pu être plus favorables au transfert (tableau 16). Leurs séquences sont plus courtes (hepta- et pentapeptide) d'une part et d'autre part F97 est constitué à 29 % (hydrophilie -0,7 échelle de Hopp et Woods, 1981) de résidus hydrophiles et F95 à 0 % (hydrophilie -1,6) tandis que α -casozépine possède un caractère amphiphile avec 30 % de résidus hydrophiles (hydrophilie -0,6). Ces propriétés, inhérentes aux résidus d'acide aminé qui les composent, pourraient rendre possible un transfert par la voie paracellulaire pour F97, pas plus hydrophile que l' α -casozépine mais plus que F95, et par voie transcellulaire pour F95 plus lipophile.

Dégradation de l' α -casozépine, du F97 et du F95 par les peptidases solubles et membranaires

L' α -casozépine, le F97 et le F95 sont hydrolysés par les peptidases membranaires et solubles présentes dans le milieu apical. Les aminopeptidases N, P et W, la dipeptidyl-peptidase IV, la peptidyl-dipeptidase A, l'endopeptidase 24-11, et la γ -glutamyl transpeptidase présentes au

Tableau 16: Les propriétés physicochimiques de l' α -casozépine et des fragments F97 et F95 (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>, *Lecouvey *et al.*, 1997)

Peptide	Séquence	Masse moléculaire	pHi	Charge nette à pH 7	Gravy (Grand average of hydropathicity = Kow)	Configuration spatiale en milieu micellaire SDS
α -casozépine	₉₁ YLGYLEQLLR ₁₀₀	1267,49	6,00	0	0,070	structure en hélice 3_{10} initiée et terminée par un tour α stabilisée par le résidu d'arginine carboxy-terminal*.
F97	₉₁ YLGYLEQ ₉₇	884,98	4,00	- 1	-0,343	ND
F95	₉₁ YLGYL ₉₅	627,74	5,52	0	0,920	ND

ND : non déterminée

niveau de la membrane plasmique des cellules de la lignée Caco-2 peuvent avoir une action sur les peptides étudiés (Howell *et al.*, 1992).

Les résultats montrent également que plus le milieu du compartiment apical reste en contact avec les cellules Caco-2 plus il possède une activité protéolytique importante sur l' α -casozépine. Le milieu apical contient des peptidases solubles ; ces enzymes peuvent correspondre à des peptidases membranaires demeurées fonctionnelles après hydrolyse de leur ancre membranaire, à des peptidases excrétées à partir du cytoplasme par exocytose ou à des peptidases libérées dans le milieu lors des phénomènes d'apoptose des cellules (Kim *et al.*, 1974).

L' α -casozépine, le F97 et le F95 sont dégradés par des peptidases solubles contenues dans les milieux apicaux et par les peptidases membranaires des cellules différenciées de la lignée Caco-2 clone TC7 cultivées dans nos conditions. Toutefois, après une heure de contact à 37°C, il demeure dans le milieu apical 60 %, 50 % et 30 % de la quantité initiale respective du F95, du F97 et de l' α -casozépine.

Suite à sa dégradation par les peptidases membranaires et solubles, l' α -casozépine génère le peptide F97 qui génère lui-même deux produits FTR₁₆ et FTR₂₁, produits également libérés à partir du peptide F95. Ces deux produits communs aux fragments F97 et F95 restent intacts dans le milieu réactionnel.

Les mécanismes de transport de peptides de plus de 3 résidus d'acide aminé ne sont pas toujours clairement explicités et aucune règle ne peut être appliquée pour prédire formellement si tel type de peptide empruntera *a priori* tel mécanisme de transfert.

Les résultats obtenus sont dépendants d'un grand nombre de facteur : (i) la taille, le poids moléculaire, la charge, l'hydrophobicité, le pH isoélectrique, l'existence de structures tridimensionnelles qui sont fonction de la séquence du peptide étudié, (ii) le modèle cellulaire utilisé, l'origine des cellules, les clones employés, le nombre de passage des cellules, les conditions de culture (composition du milieu de culture, support...) qui sont fonction des choix de l'expérimentation (tableaux 17 et 18) et (iii) les limites de détection qui sont fonction des techniques d'analyse utilisées et des propriétés intrinsèques du peptide.

Dans les conditions utilisées, l' α -casozépine n'est pas détectée dans le compartiment basal reconstitué *in vitro*. Cette absence de transfert visible engendre des questions quant au mécanisme d'action *in vivo* de ce peptide bioactif, la cible à atteindre par ce peptide selon toute vraisemblance étant les récepteurs GABA_A centraux. Comment atteindre le système

Tableau 17 : Variation de la valeur de la résistance transépithéliale (RTE) et du coefficient de perméabilité en fonction des monocouches cellulaires Caco-2 obtenues dans différentes conditions (Walter et Kissel, 1995).

	Nombre de passage 89-99 (Marburg)	Nombre de passage 30-37 (ATCC)	Nombre de passage 35-39 (Heidelberg)	
	Filtres Falcon (PET)	Filtres Transwell (PC)	Filtres Transwell (PC)	
RTE ohm.cm²	234± 102	80± 17	250± 54	
Coefficient de perméabilité (x 10⁻⁶ cm/s)				
TRH				
Pyro-L-Glu-L-His-L- Pro-NH₂ 3mM	8.19± 0.33	18.2± 0.5	3.10± 0.25	0.060± 0.0005
Mannitol	7.54± 0.32	22.2± 0.4	5.23± 0.24	0.187± 0.005
PEG 4000	1.23± 0.04	4.79± 0.44	1.43± 0.16	0.024± 0.005
Fluorescéine	4.54± 0.36	14.6± 0.5	5.24± 0.30	0.098± 0.004

TRH: Thyrotropin-releasing hormone , PEG: Polyéthylène glycol, PET: Polyéthylène téréphtalate, PC: Polycarbonate.

Tableau 18: Paramètres pouvant affecter les études effectuées sur système cellulaire Caco-2 cultivé sur filtres (Bailey *et al.*, 1996).

Facteurs	Paramètres touchés
Origine des cellules, nombre de passage	Intégrité de la monocouche, expression des transporteurs endogènes
Composition du milieu de culture	Temps de confluence, expression des transporteurs endogènes
Type de filtres	Coût, quantité de molécule testées, adsorption
Composition et porosité des filtres	Adsorption, diffusion des solutés
Coatage au collagène (matrice extracellulaire)	Caractéristique de la monocouche et matrice sécrétée par les cellules
Jours d'utilisation du système	Maturité de la monocouche, jonctions serrées
Taille des filtres (cm ²)	Nombre de cellulesensemencées, coût, quantité de molécule testée, analyses
Volume du milieu d'étude dans les compartiments apicaux et basaux	Facteur de dilution, impact sur l'analyse
Composition du milieu d'étude	Coût, efficacité, facilité d'utilisation, analyses
pH du milieu d'étude	Flexibilité expérimentale
Temps et température	Flexibilité expérimentale

nerveux central, après administration *per os*, si la barrière intestinale semble ne pas pouvoir être franchie ?

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées :

- le modèle cellulaire utilisé n'est pas adapté à l'étude du transfert des peptides d'intérêt ; il ne permet pas de mettre en évidence le passage intact de l' α -casozépine ou de ses fragments F97 et F95 au travers d'un épithélium intestinal. Le modèle cellulaire Caco-2/TC7 ne reflète pas la diversité cellulaire de l'épithélium intestinal *in vivo* ; il ne tient pas compte du flux du chyme, de l'action des hormones, de l'état physiologique général de la personne (personne détendue ou dans une situation de stress ponctuel ou chronique, les effets du stress pouvant entraîner une augmentation de la perméabilité intestinale)...
- le modèle est adapté, mais les conditions expérimentales (de la culture cellulaire et de l'analyse par CLHP) testées ne sont les plus optimum pour détecter et constater le transfert de l' α -casozépine et/ ou des fragments F97 et F95 dans le compartiment basal.
- le modèle est adapté mais l' α -casozépine ne passe effectivement pas l'épithélium intestinal.
 - o Le décapeptide peut-être un messenger primaire capable de déclencher la production au niveau de la lumière intestinale de messagers secondaires qui eux pourraient atteindre le niveau cérébral. La fixation du décapeptide sur le site BZD des récepteurs GABA_A ne serait alors que le fait d'une coïncidence. D'autres récepteurs et d'autres voies de régulation du stress peuvent alors être impliquées.
 - o l' α -casozépine n'agit pas sous forme intègre, des produits d'hydrolyse conservant l'extrémité amino-terminale (heptapeptide, pentapeptide) avec les deux résidus de tyrosine impliqués dans le mécanisme d'action (Lecouvey *et al.*, 1997) auraient eux la capacité de traverser l'épithélium intestinal et d'atteindre le système nerveux central par la voie sanguine.
 - o Les trois peptides α -casozépine, F97 et F95 (ayant tous un potentiel anxiolytique *in vivo*) contiennent peut-être une séquence minimale qui serait capable d'agir au niveau cérébral et/ou intestinal.

CONCLUSIONS GENERALES ET
PERSPECTIVES

Avant d'atteindre la circulation sanguine pour être distribuée dans l'organisme et accéder en tant qu'agoniste exogène au site benzodiazépique des récepteurs GABA_A centraux, l' α -casozépine doit franchir intacte, après ingestion, les barrières physiques et biochimiques du tractus digestif. Ce travail avait pour objectif d'approfondir les connaissances sur le devenir de ce peptide dans le tractus digestif et d'évaluer sa résistance.

Si l' α -casozépine est administrée *per os* sous forme non encapsulée, alors la pepsine stomacale représente la première barrière enzymatique. Puis, l' α -casozépine résiduelle et ses produits d'hydrolyse sont soumis à l'action des protéases pancréatiques déversées dans le duodénum. Certains fragments peptidiques, F97 et F95, résistant *in vitro* à ces protéases sont porteurs d'une activité anxiolytique *in vivo* chez le rat. Les peptidases intestinales, membranaires et solubles, présentes au niveau de la bordure en brosse des cellules épithéliales sont le facteur qui limite ensuite la biodisponibilité de l' α -casozépine et de ses peptides dérivés, F97 et F95.

In vitro, ces peptides (α -casozépine, F97 et F95) à la concentration d'environ 170 μ M n'ont pas, dans nos conditions expérimentales, franchir une barrière épithéliale constituée de cellules Caco-2. Cette inaptitude pourrait être due aux propriétés physicochimiques (PM, pI, charge, coefficient de partition, lipophilicité) inhérentes à leur composition en acides aminés (Conradi *et al.*, 1992 ; Fricker et Drewe, 1995 ; Gangwar *et al.*, 1997 ; Pauletti *et al.*, 1996 ; Pauletti *et al.*, 1997), au modèle expérimental cellulaire Caco-2 utilisé, ou au manque de sensibilité des méthodes de détection utilisées.

BIODISPONIBILITE DE L' α -CASOZEPINE ET DES FRAGMENTS F97 ET F95

Impact de l'hydrolyse par les protéases digestives sur la biodisponibilité de l' α -casozépine

Les résultats des cinétiques d'hydrolyse par la pepsine, réalisées *in vitro* montrent que 40 % de la quantité initiale d' α -casozépine, sont encore présentes 30 min après le début de l'hydrolyse pepsique et que 15 % sont encore présents après une heure. Les produits commercialisés à base d'hydrolysats trypsiques industriels de caséine α_{s1} (Lactium®) contiennent environ 4 % d' α -casozépine par rapport à la masse d'hydrolysats et sont exclusivement vendus sous forme de gélules. L'encapsulation du principe actif protège l' α -casozépine de l'hydrolyse gastrique et libère la quantité totale d' α -casozépine dans le duodénum au contact des enzymes pancréatiques et intestinales. Les résultats obtenus *in vitro*

montrent que l' α -casozépine seule n'est toutefois pas totalement résistante à la Corolase PP® et aux peptidases intestinales de la bordure en brosse modélisée par les cellules de la lignée Caco-2 et par les vésicules membranaires de la bordure en brosse. Malgré ces résultats *in vitro* montrant une sensibilité à la protéolyse digestive, l'hydrolysate tryptique de caséine α_{s1} encapsulé et administré par voie orale s'avère efficace contre le stress chez l'Homme. L'encapsulation protège l' α -casozépine de la dégradation pepsique et il est probable que le fait que l' α -casozépine soit mélangée avec différents fragments peptidiques au sein d'un hydrolysate puisse la protéger, au moins partiellement, des protéases digestives soit par inhibition des protéases par certains fragments, soit par compétition.

Les résultats d'hydrolyses de l' α -casozépine par la pepsine ou par les enzymes d'origine pancréatique (α -chymotrypsine, corolase PP®) mettent en évidence la libération des fragments F97 et F95 présentant une résistance vis-à-vis des enzymes pancréatiques *in vitro* et une activité anxiolytique *in vivo* (sur le modèle rats Wistar) dans plusieurs tests comportementaux.

Potentialité fonctionnelle des fragments F97 et F95

L'hydrolyse pepsique de l' α -casozépine libère les fragments F97 et F95 ; ils représentent respectivement 80 % et 8 % de l' α -casozépine initiale après deux heures d'hydrolyse. Les fragments peptidiques F97 et F95, résistants aux enzymes gastrique et pancréatiques *in vitro*, sont cependant sensibles à l'action des peptidases membranaires et solubles des modèles de VMBB de rat et des cellules de la lignée Caco-2.

Les travaux de Lecouvey *et al.*, (1997) conduisaient à penser que les parties amino-terminale et carboxy-terminale de l' α -casozépine semblent être nécessaires pour permettre l'affinité avec le site BZD des récepteurs GABA_A.

Bien que les fragments F95 et F97 tronqués de la partie carboxy-terminale 96-100 et 98-100 respectivement ne possèdent pas le pont salin impliquant le résidu d'arginine 100, ils montrent des propriétés anxiolytiques mises en évidence sur différents tests comportementaux chez le rat: le labyrinthe en croix surélevé, l'enfouissement défensif conditionné (uniquement F97) et la boîte claire/obscur. Une injection intrapéritonéale à 0,79 μ mol/kg de F97 ou de F95 donne des résultats significativement identiques à celle de 3,5 μ mol/kg de diazépam ou de 0,79 μ mol/kg d' α -casozépine. Cependant l'affinité de ces peptides pour le site BZD du récepteur GABA_A n'a pas été testée lors de cette étude et reste donc à mettre en oeuvre. Les résultats similaires obtenus avec les tests comportementaux

effectués n'impliquent pas nécessairement que les fragments F97 et F95 exercent strictement la même activité que l' α -casozépine sur l'ensemble des tests auxquels cette dernière a été soumise, ni donc qu'ils aient nécessairement la même cible moléculaire.

En outre, la structure de l' α -casozépine obtenue par RMN en milieu micellaire (Lecouvey *et al.*, 1997) n'est peut-être pas celle qui permet l'interaction avec le récepteur GABA_A, un peptide de cette taille restant une molécule très flexible.

Transfert potentiel de l' α -casozépine du F97 et du F95 à travers l'épithélium intestinal reconstitué par les cellules de la lignée Caco-2

Les études de transfert indiquent que ni l' α -casozépine ni les fragments F97 ou F95 ne sont pas détectés dans nos conditions expérimentales, l'épithélium reconstitué *in vitro* par les cellules de la lignée Caco-2. Même si les contraintes physicochimiques des peptides (nombre de résidus d'acide aminé, PM, pI, charge, coefficient de partition, lipophilicité) et enzymatiques imposées par le tractus digestif (sensibilité des peptides aux peptidases membranaires de la bordure en brosse) sont autant de facteurs limitants à l'absorption des peptides d'intérêt par les entérocytes ; l'augmentation des études depuis une vingtaine d'années sur les peptides bioactifs suggère que le passage de peptides voire de protéines intacts de la lumière intestinale vers le compartiment sanguin est possible.

En effet les limites inhérentes au modèle cellulaire de la lignée Caco-2/TC7 utilisé ne permettent pas de conclure définitivement à l'incapacité des peptides étudiés à franchir l'épithélium intestinal ou à l'imperméabilité de cet épithélium à ces peptides *in vivo*.

Les contraintes liées à l'utilisation du modèle cellulaire s'établissent à différents niveaux du modèle expérimental. L'origine parentale des cellules, les clones sélectionnés, la composition des différents milieux, de culture et d'étude, les conditions physiologiques (pH, osmolarité, solubilité) et le support de culture (filtres, porosité, densité, surface) sont autant de facteurs pouvant entraîner des variations dans l'obtention des résultats. C'est pourquoi, au cours de ces travaux, plusieurs paramètres de cultures ont été testés, modifiés, pour finir par obtenir une méthode « standardisée » de culture de la lignée cellulaire Caco-2/TC7 sur filtres, par la mesure d'indicateurs de différenciation tels que le dosage de la phosphatase alcaline et des protéines totales, et de perméabilité tels que la mesure de la résistance transépithéliale. Le suivi de marqueurs témoins des mécanismes de transport paracellulaire comme la FITC et transcellulaire comme la HRP pour la transcytose semble incontournable. D'autres modifications des conditions de cultures concernant, notamment le support, sont en cours. En

effet la possibilité d'invagination des cellules, voire le passage de cellules à travers les pores de 3 μm de diamètre des filtres utilisés pour constituer une double couche cellulaire pourraient être envisagés comme obstacle au transfert des peptides (Des Rieux *et al.*, 2007). Iwan *et al.* (2008) mettent en évidence un flux bidirectionnel (apical vers basal et basal vers apical) des β -casomorphines 5 (YPFVQ) et 7 (YPFVQPI) et de la lactoferoxine A (YLGSGY) d'origine humaine au travers d'un épithélium reconstitué par des cellules Caco-2 sur des filtres de porosité 0,4 μm sans pouvoir mettre clairement en évidence le mécanismes paracellulaire ou transcellulaire mis en jeu.

L'utilisation de filtres avec des membranes d'une porosité de 0,4 μm de diamètre ou la nécessité d'un coatage au collagène (de type I) lors de l'utilisation de membrane de porosité plus élevée, 1 μm ou 3 μm , seraient à étudier ; même si des passages de peptides et protéines au travers d'épithélium reconstitué par les cellules de la lignée Caco-2 cultivées sur des membranes (non coatées) de porosité 3 ou 1 μm de diamètre ont été et sont encore mis en évidence (Guo *et al.*, 2004 ; Kavimandan et Peppas 2007 ; Pisal *et al.*, 2007).

Concernant les peptides étudiés, leurs propriétés physico-chimiques laissent penser que si un transfert est possible *in vivo* il s'effectuerait peut-être plus par la voie transcellulaire ; la voie paracellulaire étant la voie privilégiée des peptides de petite taille (inférieure à 15 nm de diamètre) et surtout très hydrophiles (Pauletti *et al.*, 1996 ; Nellans, 1991), à l'exception notamment de peptides bioactifs tels que l'octréotide (analogue cyclique de la somatostatine ; PM 1019,29 Da) (Drewe *et al.*, 1993 ; Jaehde *et al.*, 1994), l'hormone thyroïdienne (Thwaites *et al.*, 1993) et la 1-déamino-8-D-arginine-vasopressine (nonapeptide ; Lundin et Artursson, 1990) qui semblent emprunter cette voie.

La voie transcellulaire et plus particulièrement le phénomène de transcytose pourrait être la voie de transfert idéale pour les peptides bioactifs amphiphiles, de plus de 4 résidus d'acide aminé, trop grands pour être pris en charge par les transporteurs de di et tri-peptides (Artursson, 1993 ; Heyman *et al.*, 1990). Les peptides (ou protéines) transiteraient à l'intérieur de vésicules d'endocytose formées à la surface membranaire apicale des entérocytes et, sans fusionner avec les lysosomes, seraient libérés intacts au pôle basal des cellules, mis en évidence chez le porc, le rat et le lapin nouveau nés (Krähenbühl et Campiche, 1969 ; Chabance *et al.*, 1995). La transcytose est d'ailleurs le mécanisme de transfert décrit au niveau des cellules M éléments cellulaires constituant les plaques de Peyer de l'épithélium intestinal ; c'est ainsi que les bactéries, virus et autres protéines ou fragments peptidiques antigéniques sont présentés aux lymphocytes et macrophages. *In vivo*, les plaques de Peyer sont présentes dès le duodénum et leur nombre va en augmentant au fur et à mesure que l'on

s'approche du gros intestin. Toutefois les cellules M ne représentent que 5 % des éléments constitutifs des plaques de Peyer qui ne représentent que 1 % de la surface totale de l'intestin. C'est pourquoi il semble intéressant d'explorer d'autres modèles cellulaires d'étude de biodisponibilité. La réalisation *in vitro* d'épithélia résultant de co-culture Caco-2/Raji permettant d'inclure les cellules M dans le modèle d'étude ou encore Caco2/HT29 pour obtenir des cellules caliciformes qui produisent du mucus ; ce mucus pouvant représenter *in vivo* une barrière physico-chimique influençant de manière positive ou négative la biodisponibilité des peptides.

Un autre support d'étude, différent du système puits/filtre, la chambre de Ussing permettrait de tester le transfert de peptides sur des épithélia extraits d'intestin de porc, animal modèle pour l'Homme. En effet les tractus gastro-intestinaux de ces deux espèces sont similaires du point de vue structural (Heinz *et al.*, 1987).

Le seuil de détection des techniques d'analyse employées peut également être un facteur limitant la détection de traces de peptides présents après transfert du pôle apical vers le compartiment basal. Des techniques d'analyse plus fines et ou le marquage radioactif des peptides étudiés permettraient peut-être d'apporter des éléments de réponse supplémentaires sur le transfert de l' α -casozépine et des fragments F95 et F97.

De ce fait les résultats obtenus permettent uniquement de présenter des hypothèses quant au mécanisme d'action de ces peptides, sachant que dans des conditions particulièrement défavorables, seuls face à un équipement enzymatique, ils ne sont pas résistants aux peptidases intestinales et ignorant si, *in vivo*, ils peuvent franchir l'épithélium intestinal.

L' α -casozépine a une affinité pour le site BZD du récepteur GABA_A central et porte une activité anxiolytique dans des études cliniques et pré-cliniques. Ce postulat implique que l' α -casozépine, le F97 et le F95 doivent passer la barrière intestinale pour se retrouver dans la circulation sanguine, puis qu'ils échappent aux peptidases sanguines pour franchir ensuite la barrière hémato-encéphalique pour enfin atteindre leur cible que sont les récepteurs GABA_A. Bien que ces trois peptides étudiés ne sont pas détectés pas dans nos conditions expérimentale dans le compartiment basal nécessitant le franchissement de la barrière épithéliale constituée par le modèle cellulaire Caco-2, il ne faut pas exclure complètement l'hypothèse d'un transfert intestinal des peptides et d'autant plus qu'*in vivo* certains facteurs physiologiques, environnementaux ou génétiques peuvent augmenter la perméabilité de l'épithélium digestif.

La perméabilité normale de l'épithélium intestinal n'est théoriquement adaptée pour laisser passer des peptides de taille supérieure à 4 résidus d'acide aminé (Adibi, 1971 ; Gardner, 1983). Cependant quelques études ont montré la présence de peptides à activité biologique dans le sang de rats adultes ou d'humains après leur ingestion (Chabance *et al.*, 1998 ; Fosset *et al.*, 2002). La perméabilité de l'épithélium peut être augmentée notamment chez un individu sujet à des troubles émotionnels liés à l'anxiété chronique ou aiguë. (Saunders *et al.*, 1994). En activant le système sympathique les conséquences d'un stress chronique ou aigu altéreraient les fonctions immunes, augmenteraient la perméabilité intestinale et favoriseraient la production de mucus. L'implication des mastocytes dans l'augmentation de perméabilité intestinale sur un organisme soumis au stress a été mise en évidence sur des lignées de souris et de rats déficients dans la production de mastocytes (Castagliuolo *et al.*, 1999 ; Santos *et al.*, 2001). Ces derniers libèrent alors des produits de dégranulation qui activeraient la sécrétion de cytokines responsables de l'augmentation de la perméabilité épithéliale transcellulaire et paracellulaire (Kiliaan *et al.*, 1998 ; Saunders *et al.*, 1994 ; Söderholm et Perdue, 2001 ; Söderholm *et al.*, 2002). Ces altérations de l'imperméabilité des jonctions serrées (réversible après 24h) seraient dues aux modifications et à la redistribution des protéines transmembranaires occludines et ZO-1 (Fries et Mazzon *et al.*, 2003).

La biodisponibilité de l' α -casozépine, du F97 et du F95 pourrait *in vivo* être augmentée par l'état d'anxiété de l'individu qui les ingère. On peut noter que Lactium® est plus efficace chez les individus stressés (Lanoir *et al.*, 2002).

Ainsi, l'hypothèse que des molécules actives puissent passer dans des cas particuliers, la barrière intestinale et se retrouver au contact des récepteurs centraux ne peut être actuellement exclue. Par ailleurs d'autres études ont mis en évidence des augmentations de perméabilité de la barrière hémato-intestinale sous diverses conditions de stress (Groot *et al.*, 2000 ; Söderholm et Perdue, 2001).

L'hypothèse que l' α -casozépine, et/ou les fragments F97 et F95 administrés *per os* ne traversent pas l'épithélium intestinal, mais exercent leur effet anxiolytique par l'activation de récepteurs présents sur des fibres nerveuses sympathiques ou parasympathiques sous-épithéliales pourrait être proposées. Les peptides pourraient également agir directement sur des récepteurs spécifiques de la membrane des cellules endothéliales ou entéroendocrines qui composent la muqueuse intestinale, celles-ci servant ensuite de relais dans la transmission du signal aux fibres nerveuses. Nous ne pouvons affirmer que ses deux produits d'hydrolyse

empruntent les mêmes voies d'action que l' α -casozépine étant donné leur composition différente en résidus d'acide aminé et les changements de conformation que cela peut engendrer.

D'autres voies d'action pourraient être étudiées. La β -lactotensine (HIRL ; PM 537,7 Da) est un tétrapeptide issu de l'hydrolyse chymotrypsique de la β -lactoglobuline bovine (Yamauchi *et al.*, 2003). Après administration orale ou centrale, ce peptide possède des propriétés antinociceptives (contrôle de la douleur) et hypocholestérolémiantes par fixation sur le type 2 du récepteur à la neurotensine, NTR2, (Yamauchi *et al.*, 2003). Il augmente également les capacités de mémorisation chez le rongeur au travers de son affinité pour les récepteurs D2 de la dopamine (Ohinata *et al.*, 2007). La β -lactotensine administrée par voie intrapéritonéale à des souris préalablement stressées entraîne une activité anxiolytique due à la liaison de la β -lactotensine au récepteur NTR2. Toutefois, comme pour l' α -casozépine, les mécanismes d'action de ce peptide, les récepteurs effectivement impliqués, les zones cérébrales activées et le transfert du peptide jusqu'au système nerveux central ne sont pas élucidés (Yamauchi *et al.*, 2006 et 2003).

L' α -casozépine est commercialisée actuellement sous forme de gélules contenant l'hydrolysate (Lactium®) où elle représente de 2 à 4% du poids de celui-ci. Elle revendique une activité anti-stress chez l'Homme et l'animal, après administration *per os*. Cependant l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) n'a pas autorisé l'allégation « contribue à réduire les effets du stress » par manque de preuve des effets directs sur le stress mais a autorisée, pour le Lactium®, l'allégation « contribue à réduire les effets tensionnels du stress particulièrement chez les personnes sensibles ». La difficulté d'obtenir des allégations confirme la nécessité de développer les connaissances sur les mécanismes d'action des peptides bioactifs issus de l'hydrolyse de protéines alimentaires au sein de l'organisme.

Si la cible de l' α -casozépine (et peut-être des fragments F97 et F95) est véritablement centrale, alors après un franchissement de l'épithélium intestinal, le peptide doit être véhiculé par la voie sanguine. Or, actuellement l' α -casozépine n'a pas encore été détectée dans le plasma sanguin les techniques de détection n'étant peut-être pas appropriées. En outre, même si le transport via le circuit sanguin de l' α -casozépine ou de ses fragments peut être envisagé, la barrière hémato-encéphalique reste également à franchir.

L'étude des mécanismes d'action de ces peptides à activité anxiolytique est de plus en plus nécessaire car ceux-ci n'exhibent pas les effets secondaires des benzodiazépines et pourraient constituer une alternative dans des cas de stress non pathologique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Addeo F., Chianes L., Salzano A., Sacchi R., Cappuccio U., Ferranti P., and Malorni A. 1992. Characterization of the 12% trichloroacetic acid-insoluble oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese. *J. Dairy Res.*, 59:401-411.
- Adibi S.A., and Kim Y.S. 1981. Peptide absorption and hydrolysis. In: Johnson, L.R. (Ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Raven, New York, 1073-1095.
- Adson A., Raub T.J., Burton P.S., Barsuhn C.L., Hilgers A.R., Audus K.L., and Ho N.F.H. 1994. Quantitative approaches to delineate paracellular diffusion in cultured epithelial cell monolayers. *J. Pharm. Sci.*, 83:1529-1536.
- Anderson J.M., and Van Itallie C.M. 1995. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am. J. Physiol.*, 269:G467-G475.
- Anderson J.M., Van Itallie C.M., Peterson M.D., Stevenson B.R., Carew E.A., and Moosekers M.S. 1989. Zo-1 mRNA and protein expression during tight junction assembly in Caco-2: electrical properties. *Am. J. Physiol.* 247:C260-C267.
- Ando-Akatsuka Y., Saitou M., Hirase T., Kishi M., Sakakibara A., Itoh M., Yonemuras S., and Tsukita S. 1996. Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog and rat-kangaroo homologues. *J. Cell. Biol.* 133:43-47.
- Aoki Y., Morishita M., and Takayama K. 2005. Role of the mucous/glycocalyx layers in insulin permeation across the rat ileal membrane. *Int. J. Pharm.*, 297:98-109.
- Artursson P., and Borchardt R. 1997. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. *Pharm. Res.*, 14:1655-1658.
- Artursson P., and Karlsson J. 1991. Correlation between oral drug absorption in human and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 175: 880-889.
- Artursson P., Ungell A.L., and Lofroth JE. 1993. Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption : cultured monolayers of human intestinal cells and rat intestinal segments. *Pharm. Res.*, 10:1123-1129.
- Artursson P., Palm K., and Luthman K. 1996. [Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport](#). *Adv. Drug Delivery Rev.*, 22:67-84.
- Atisook K., and Madara J.L. 1991. An oligopeptide permeates intestinal tight junctions at glucose-elicited dilatations. Implications for oligopeptide absorption. *Gastroenterology*, 100:719-24.
- Augustijns P.F. and Borchardt R.T. 1995. Transport and metabolism of delta sleep-inducing peptide in cultured human intestinal epithelial cell monolayers. *Drug Metabolism and Disposition*, 23:1372-1378.

- Bai J.P.F., and G.L. Amidon. 1992. Structural specificity of mucosal-cell transport and metabolism of peptide drugs: Implication for oral peptide drug delivery. *Pharm. Res.*, 9:969-978.
- Bailey C.A., Bryla P., and Waseem M.A. 1996. The use of the intestinal epithelial cell culture model, Caco-2, in Pharmaceutical development. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 22: 85-103.
- Balimane P.V., and Chong S. 2005. cell cultured-based models for intestinal permeability: a critique. *Drug Discov. Today Rev.*, 10:335-343.
- Barnes K., Turner A.J., and Kenny A.J. 1988. Electron microscopic immunocytochemistry of pig brain shows that endopeptidase-24.11 is localized in neuronal membranes. *Neurosci. Let.*, 94:64-69.
- Barthe L, Woodley J, and Houin G. 1999. Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. *Fundam Clin. Pharmacol.*, 13:154-168.
- Barthe L., Bessouet M., Woodley J. F., Houin G. 1998. The improved everted gut sac: a simple method to study intestinal P-glycoprotein. *International. J. Pharm.*, 173:255-258.
- Beata C., Beaumont E., Coll V., Cordel J., Marion M., Massal N., Marlois N., and Tauzin J. 2007a. Effect of alpha-casozepine (Zylkene) on anxiety in cats. *J. Veterinary Behav: Clinical Applications and Res.*, 2:40-46.
- Beata C., Beaumont E., Diaz C., Marion M., Marlois N., Massal N., Muller G., Tauzin J., Lefranc C. 2007b. Comparison of the effect of alpha-casozepine (tryptic hydrolysate of alpha_{s1}-casein) and selegiline chlorhydrate in the treatment of anxiety disorders in dogs. *J. Veterinary Behav. Clinical applications and Res.*, 2:86-87.
- Benajiba A., and Maroux S. 1980. Purification and characterization of an aminopeptidase A from hog intestinal brush-border membrane. *Eur J Biochem.*, 107:381-388.
- Bergmeyer H.U., Bernt E., and Hess B. 1981. in *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. H. U. Bergmeyer) 737-743 (Academic, New York, 1965).
- Bernkop-Schnürch A. 1998. The use of inhibitory agents to overcome the enzymatic barrier to perorally administered therapeutic peptides and proteins. *J. Control. Release*, 52:1-16.
- Berrocal R., Chanton S., Juillerat M.A., Pavillard B., Scherz J.C., and Jost, R. 1989. Tryptic phosphopeptides from whole casein. II. Physicochemical properties related to the solubilization of calcium. *J. Dairy Res.*, 56:335-341.
- Berzinova V., Oswald I. 1972. Sleep after a bed time beverage. *Br. Med. J.*, 2:431-433.
- Beucher S., Levenez F., Yvon M., and Corring T. 1994. Effects of gastric digestive products from casein on CCK release by intestinal cells in rat. *J. Nutr. and Biochem.*, 5:578-589.
- Beynon, R.J., and Salvesen, G. 1989. Appendix III. Commercially available protease inhibitors. In *Proteolytic enzymes, a practical approach*. Edited by R.J. Beynon and J.S. Bond. IRL Press, Oxford, pp. 241-249.

- Biganzoli E., Cavenaghi L.A., Rossi R., Brunati M.C., and Nolly N.L. 1999. Use of a Caco-2 cell culture model for the characterization of intestinal absorption of antibiotics. *II Farmaco*, 54: 594-599.
- Biggio G., Concas A., Corda M.G., Giorgio O., Sanna E., and Serra M. 1990. GABAergic and dopaminergic transmission in the rat cerebral cortex: effect of stress, anxiolytic and anxiogenic drugs. *Pharmacol. Ther.* 48:121-142.
- Boulenc X., Breul T., Gautier J.C., Saudemon P., Joyeux H., Roques C., Berger Y., and Fabre G. 1995. Sodium lauryl sulphate increase tiludronate paracellular transport using human epithelial Caco-2 monolayers. *Int. J. Pharm.*, 123 :71-83.
- Bourin M., and Hascoet M. 2003. The mouse light/dark box test. *Eur. J. Pharmacol*, 463:55-65.
- Brandsch M., Knütter I., and Leibach F.H. 2004. The intestinal H⁺ /peptide symporter PEPT1: structure-affinity relationships. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 21:53-60.
- Branka J.E., Vallette G., Jarry G., Bou-Hanna C., Lemarre P., Van P.N., and Laboisie C.L. 1997. Early functional effects of Clostridium difficile toxin A on human colonocytes. *Gastroenterology*, 112:1887-1894.
- Brantl V., Teschemacher H., Blaesig J., Henschen A., and Lottspeich F. 1981. Opioid activities of β -casomorphins. *Life Sci.*, 28:1903-1909.
- Brantl V., Teschemacher H., Henschen A., and Lottspeich F. 1979. Novel opioid peptides derived from casein (β -casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone. *Hoppe-Seyler's Z Physiol. Chem*, 30:1211-16.
- Burton P.S., Hill R.B., and Conradi R.A. 1987. Metabolism and transport of peptides across the intestinal mucosa. *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 14:6-7.
- Burton-Freeman B., Davis P., and Schneeman B. 2002. Plasma Cholecystokinin is associated with subjective measures of satiety in women. *Am. J. Clin. Nutr.* ,76:659-667.
- Caillard I., and Tomé D. 1995. Transport of β -lactoglobuline and α -lactalbumin in enterocyte-like Caco-2 cells. *Reprod., nutr., dev.*, 35:179-188.
- Carlson S., and Madara J. 1990. Effects of phlorizin and sodium on glucose-elicited alterations of cell junctions in intestinal epithelia, *Am. Physiol. Soc*, 258:C77-C85.
- Caro I., Boulenc X., Rousset M., Meunier V., Bourrié M., Julian B., Joyeux H., Roques C., Berger Y., Zweibaum A., and Fabre G. 1995. Characterisation of a newly isolated Caco-2 clone (TC-7), as a model of transport processes and biotransformation of drugs. *Int J Pharm*, 116: 47-58.
- Castagliuolo I., Wang C.C., Valenick L., Pasha A., Nikulasson S., Carraway R.E., and Pothoulakis C. 1999. Neurotensin is a proinflammatory neuropeptide in colonic inflammation. *The J. of Clinical Investigation*, 103:843-849.

- Chabance B., Jollès P., Izquierdo C., Mazoyer E., Francoual C., Drouet L., and Fiat A.M. 1995. Characterization of an antithrombic peptide from κ -casein in newborn plasma after milk ingestion. *British J. Nutr.*, 73:583-590.
- Chabance B., Mareatu P., Rambaud J.C., Migliore-Samour D., Boynard M., Perrotin P., Guillet R., and Fiat A.M. 1998. Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk and yogurt. *Biochimie*, 80:155-165.
- Chang K.L., Killian A., Hazum E., and Cuatrecasas P. 1981. Morphoceptin: a potent and specific agonist for morphine(μ) receptors. *Science*, 212:75-77.
- Chantret I., and Barbat A. 1994. Différenciation des cellules cancéreuses coliques humaines en culture in vitro. Ateliers de formation de l'INSERM No. 67, Edition de l'INSERM, Paris.
- Chantret I., Rodolose A., Barbat A., Dussaulx E., Brot-Laroche E., Zweibaum A., and Rousset M. 1994. Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for a glucose-dependent negative regulation. *J. Cell Sci.*, 107:213-25.
- Checler F. 1993. Neuropeptide-degrading peptidase. In Parvez SH, Naoi M, Nagatsu T, Parvez S. (eds), *Methods in Neurotransmitter and Neuropeptide Res.*, Part 2. Amsterdam, Elsevier, pp. 375-418.
- Chiba H., Tani F., and Yoshikawa M. 1989. Opioid antagonist peptides derived from κ -casein. *J. Dairy Res.*, 56:363-366.
- Chong S., Dando S.A., Soucek K.M., and Morrison R.A. 1996. In vitro permeability through caco-2 cells is not quantitatively predictive of in vivo absorption for peptide-like drugs absorbed via dipeptide transporter system. *Pharm. Res.*, 13:120-123.
- Chowhan, Z.T., and Amoro A.A. 1977. Everted rat intestinal sacs as an in vitro model for assessing absorptivity of new drugs. *J. Pharm Sci.*, 66:1249-1253.
- Christensen J.E., Dudley E.G., Pederson J.A., and Steele J.L. 1999. Peptidases and amino-acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76:217-246.
- Clare D.A., and Swaisgood H.E. 2000. Bioactive milk peptides: A prospectus. *J. Dairy Sci.*, 83:1187-1195.
- Clauser R.K., Baker P.R., and Burlingame A.L. 1999. Role of accurate mass measurement (± 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Anal. Chem.*, 71:2871-2882.
- Cogburn N.J., Donovan M.G., and Schasteen C.S. 1991. Correlation of Caco-2 transport with human oral bioavailability. *J. Contr. Release*, 13: 314-315.
- Conradi R.A., Hilgers A.R., Ho N.F.H., and Burton P.S. 1992. The influence of peptide structure on transport across caco-2 cells. II: Peptide bond modification which results in improved permeability. *Pharm. Res.*, 9:435-439.

- Crampton R.F., Lis M.T., and Matthews G.M. 1973. Sites of maximal absorption and hydrolysis of two dipeptides by rat small intestine in vivo. *Clin. Sci.* 44:583-594.
- D'Souza V.M., Shertzer H.G., Menon A.G., and Pauletti G.M. 2003. High glucose concentration in isotonic media alters caco-2 cell permeability. *AAPS PharmSci.*, 5:1208-1213.
- Dalvi A., and Rodgers R.J. 1999. Behavioral effects of diazepam in the murine plus-maze: flumazenil antagonism of enhanced head dipping but not disinhibition of open-arm avoidance. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 62:727-734.
- Dantzig A.H., and Bergin L. 1988. Carrier-mediated uptake of cephalixin in human intestinal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155:1082-1087.
- Dantzig A.H., Duckworth D.C., and Tabas L.B. 1994. Transport mechanisms responsible for the absorption of loracarbef, cefixime, and cefuroxime axetil into human intestinal Caco-2 cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 20:7-13.
- Daugherty A.L., and Mrsny R.J. 1999. Transcellular uptake mechanisms of the intestinal epithelial barrier Part one. *PSTT*, 2:144-151.
- Dawson G.R., and Tricklebank M.D. 1995. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol Sci.*, 16:33-36.
- Des Rieux A., Ragnarsson E., Gullberg E., Pr at V., Schneider Y-J., and Artursson P. 2005. Transport of nanoparticles across an in vitro model of the human intestinal follicle associated epithelium. *European J. of Pharm. Sci.*, 25:455-465.
- Diamond J.M. 1977. The epithelial junction : bridge, gate, and fence. *Physiologist*, 20:10-18.
- Drewe J., Fricker G., Vonderscher J., and Beglinger C. 1993. Enteral absorption of octreotide. Absorption enhancement by polyoxyethylene-24-cholesterol ether. *Brit. J. Pharmacol.*, 108:298-303.
- Erickson R.H., Suzuki Y., Sedlmayer A., and Kim YS. 1992. Biosynthesis and degradation of altered immature forms of intestinal dipeptidyl peptidase IV in a rat strain lacking the enzyme. *J. Biol. Chem.*, 267:21623-21629.
- Ermisch A., R hle H.J., Neubert K., Hartrodt B., and Landgraf R. 1983. On the blood-brain barrier to peptides: [³H]β-casomorphin-5 uptake by eighteen brain regions in vivo. *J. Neurochem.*, 41:1229-1233.
- Fanning A.S., Jameson B.J., Jesaitis L.A., and Anderson J.M. 1998. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 273:1617-1626.
- Fiat A.M., and Joll s P. 1989. Caseins of various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides: Structural and physiological aspects. *Mol. Cel.Biochem.*, 87:5-30.

- Fiat A.M., Migliore D., and Jollès P., 1993. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunostimulating activities. *J.Dairy Sci.*, 76:301-310.
- FitzGerald R.J. 1998. Potential uses of caseinophosphopeptides. *Int. Dairy J.*, 8:451-457.
- FitzGerald R.J., Murray B.A., and Walsh D.J. 2004. Hypotensive peptides from milk proteins. *J. Nutr.*, 134:980S-988S.
- Fogh J.M., and Orfeo T. 1977. Cultured human colon cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Acad. Sci.*, 59:221-226.
- Folk J.E., and Gladner J. 1960. Cobalt activation of carboxypeptidase A. *J. Biol. Chem.*, 235:60-66.
- Fosset S., Fromentin G., Gietzen D.W., Dubarry M., Huneau J.F., Antoine J.M., Lang V., Mathieu-Casseron F., and Tomé D. 2002. Peptide fragments released from Phe-caseinomacropptide in vivo in the rat. *Peptides*, 23:1773-1781.
- Freeman T.C., Bentsen B.S., Twaites D.T., and Simmons N.L. 1995. H⁺/di-tripeptide transporter (PepT1) expression in the rabbit intestine. *Pflugers Arch.*, 430:394-400.
- Fricker G., and Drewe J. 1995. Enteral absorption of octreotide: modulation of intestinal permeability by distinct carbohydrates. *J Pharmacol Exp Ther.*, 274:826-832.
- Fries W, and Mazzon E. 2003. A time course of inflammation-associated effects on small intestine tight junction (TJ) proteins. *Gastroenterology*, 124: A317.
- Frochot, C. 1998, Étude d'un décapeptide à activité de type benzodiazépine issu d'une protéine du lait bovin. Thèse de l'Institut Polytechnique de Lorraine (INPL).
- Fruton J. S. 2002. A history of pepsin and related enzymes. *The Quarterly Review of Biology*, 77:127-147.
- Fruton J.S. 1976. The mechanism of the catalytic action of pepsin and related acid proteinases. *Adv. Enzymol. Relat Areas Mol. Biol.*, 44:1-36.
- Fujita K., Nakanishi K., Sobue K., Ueki T., Asai K., and Kato T. 1998. Astrocytic gap junction blockage and neuronal Ca²⁺ oscillation in neuron-astrocyte cocultures in vitro. *Neurochem. Int.*, 33:41-49.
- Furuse M., Fujita K., Hiiragi F., Fujimoto K., and Tsukita S. 1998. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludins. *J. Cell. Biol.* 141: 1539-1550.
- Gagnaire V., Pierre A., Mollé D. and Léonil J. (1996). Phosphopeptide interacting with colloidal calcium phosphate isolated by tryptic hydrolysis of bovine casein micelles. *J. Dairy Res.*, 63:405-422.

- Ganapathy V., and Leibach F.H. 1983. Role of gradient and membrane potential peptide transport in intestinal and renal brush-border membrane vesicles from the rabbit. *J. Biol. Pharmacol.*, 151:117-121.
- Ganapathy V., and Leibach F.H. 1985. Is intestinal peptide transport energized by electron gradient? *Am. J. Physiol.*, 249:14189-14192
- Gangwar S., Pauletti G.M., Wang B., Siahaan T.J., Stella V.J., and Borchardt R.T. 1997. Prodrug strategies to enhance the intestinal absorption of peptides. *Drug Discov. Today*, 2:148-155.
- Ganjam L.S., Thornton W. H., Marshall R.T., and MacDonald R.S. 1997. Antiproliferative Effects of Yogurt Fractions Obtained by Membrane Dialysis on Cultured Mammalian Intestinal Cells. *J. Dairy Sci.*, 80:2325-2329.
- Gardner M.L.G. 1982. Absorption of intact peptides: studies on transport of protein digests and dipeptides across rat small intestine in vitro. *Quarterly J. Exp. Physiol.*, 67: 629-637.
- Gebert A., Rothkttter H.J., and Pabst R. 1996. M cells in Peyer's patches of the intestine. *Int. Rev. Cyto*, 167:91-159.
- Gerber H.W., and Jost R. 1986. Casein phosphopeptides: their effect on calcification of in vitro cultured embryonic rat bone. *Calcif. Tissue Int.*, 38: 350-357.
- Gobbetti M., Mivervini F., and Rizzello C.G. 2004. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *Int. J.Dairy Tech.*, 57:172-188.
- Grasset E., Pinto M., Dussaulx E., Zweibaum A., and Desjeux J.F. 1984. Epithelial properties of the human colonic carcinoma cell line Caco-2: electrical parameters. *Am. J. Physiol*, 247:C260-C267.
- Gray A.C., Coupar I.M., and White P.J. 2006. Comparison of opioid receptor distributions in the rat ileum. *Life Sci.*, 78:1610-1616.
- Griebel G., Belzung C., Misslin R., and Vogel E. 1993. The free-exploratory paradigm: an effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potential neophobia-reducing drugs, *Behav Pharmacol.*, 4: 637-644.
- Gres M. C., Julian B., Bourrie M., Meunier V., Roques C., Berger M., Boulenc X., Berger Y., and Fabre G. 1998. Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line. *Pharm.Res.*, 15:726-733.
- Guesdon B., Messaoudi M., Lefranc-Millot C., Fromentin G., Tomé D., and Even P.C. 2006. A tryptic hydrolysate from bovine milk α S1-casein improves sleep in rats subjected to chronic mild stress. *Peptides*, 27:1476-1482.
- Gullberg E., Leonard M., Karlsson J., Hopkins A.M., Braydn D., Baird A.W., and Artursson P. 2000. Expression of specific markers and particle transport in a new human intestinal M-cell model. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 279:808-813.

- Guo J., Ping Q., Jiang G., Dong J., Qi S., Feng L., Li Z., and Li C. 2004. Transport of leuprolide across rat intestine, rabbit intestine and Caco-2 cell monolayer. *Int. J. Pharm.*, 278:415-422.
- Hagenbuch B., and Meier P.J. 2003. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *BBA*, 1609:1-18.
- Hall, C. 1936. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. *J. Comp. Psychol.* 22:345-352.
- Hata Y., Yamamoto M., Ohni M., Nakajima M., Nakamura Y., and Takano T. 1996. Placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood-pressure in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, 64:767-771.
- Heizmann J., Langguth P., Biber A., Oschmann R., Merkle H. P., Wolfram S. 1996. Enzymatic Cleavage of Thymopoietin Oligopeptides by Pancreatic and Intestinal Brush-Border Enzymes. *Peptides*, 17:1083-1089.
- Heyman M., Crain-Denoyelle AM., Nath S.K., and Desjeux F.K. 1990. Quantification of protein transcytosis in the human colon carcinoma cell line Caco-2. *J. Cell. Physiol.*, 143:391-395.
- Henschen A., Lottspeich F., Brantl V., and Teschemacher H. 1979. Novel opioid peptides derived from casein (β -casomorphins). II. Structure of active components from bovine casein peptone. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 360:1217-24.
- Hidalgo I.J., Raub T.J., and Borchardt R.T. 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 96: 736-749.
- Hidalgo L.J., and Brochardt R.T. 1990. Transport of bile acid in a human intestinal epithelial cell line, Caco-2. *Biochem. Biophys. Acta*, 1035: 67-103.
- Hilgers AR, Conradi RA and Burton PS. 1990. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharm. Res.*, 7:902-910.
- Hirayama M., Toyota K., Yamaguchi G., Hidaka H., and Naito H. 1992. HPLC analysis of commercial casein phosphopeptides (CPP). *Biosc., Biotech. Biochem.*, 56:1126-1127.
- Hochman J.H. 1994. In vitro and in vivo analysis of the mechanism of absorption enhancement by palmitoylcarnitine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 269:813-822.
- Hopp T.P. et Woods K.R. 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78 : 3824-3828.
- Howell S., Kenny A.J, and Turner A. J. 1992. A survey of membrane peptidases in two human colonic cell lines, Caco-2 and HT-29. *Biochem. J.*, 284:595-601.
- Hua X., Hayes C., Hofer A., Fitzsimmons B., Kilk K., Langel U., Bartfai T., and Yaksh T. 2004. Galanin acts at GalR1 receptors in spinal antinociception: synergy with morphine and AP-5. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 208:574-582.

- Huet C., Sahuquillo-Merino C., Coudrier E., and Louvard D. 1987. Absorptive and mucus-secreting subclones isolated from a multipotent intestinal cell line (HT-29) provide new models for cell polarity and terminal differentiation. *J Cell Biol.*, 105: 345-57.
- Huneau J.F., Erlanson-Albertsson C., Beauvallet C., and Tomé D. 1994. The in vitro intestinal absorption of enterostatin is limited by brush-border membrane peptidases. *Regulatory Peptides*, 54:495-503.
- Ijäs H., Collin M., Finckenberg P., Pihlanto-Leppälä A., Korhonen H., and Kopela R. 2004. Antihypertensive opioid-like milk peptide α -lactorphin/ Lack of effect on behavioural tests in mice. *Int. Dairy J.*, 14:201-205.
- Ingels F., Deferme S., Destexhe E., Oth M., Van den Mooter G., and Augustijns P. 2002. Simulated intestinal fluid as transport medium in the Caco-2 cell culture model. *Int. J. Pharm.*, 232:83-192.
- Isoda T., Watanabe E., Haga M., Haseto S, Awazu S., and Hayashi M. 1997. Increase of polypeptide transport by lectin conjugation across rabbit Peyer's patches. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 44:133-136.
- Ito S. 1965. The enteric surface coat on cat intestinal microvilli. *J. Cell. Biol.* 27:475.
- Ito S. 1969. Structure and function of the glycolalyx. *Fed. Proc.*, 28:12.
- Iwan M., Jarmolowska B., Bielikowics K., Kostyra E., Kostyra H., and Kaczmarek M. 2008. Transport of μ -opioid receptor agonists and antagonist peptides across Caco-2 monolayer. *Peptides*, 29:1042-1047.
- Jacob T.C., Moss S.J., and Jurd R. 2008. GABA_A receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nature Reviews Neurosci.*, 9:331-343.
- Jaehde U., Masereeuw R., De Boer A.G., Fricker G., Nagelkerke J.F., Vonderscher J., and Breimer D.D. 1994. Quantification and visualization of the transport of octreotide, a somatostatin analogue, across monolayers of cerebrovascular endothelial cells. *Pharm. Res.*, 11:442-448.
- Jinsmaa Y., and Yoshikawa M. 1999. Enzymatic release of neocasomorphin and beta-casomorphin from bovine beta-casein. *Peptides*, 20:957-962.
- Jollès P., Levy-Toledano S., Fiat A.M., Soria C., Gillesen D., Thomaidis A., Dunn F.W., and Caen J. 1986. Analogy between fibrinogen and casein: Effect of an undecapeptide isolated from κ -casein on platelet function. *Eur. J. Biochem.*, 158:379-382.
- Jollès P., Loucheux-Lefèbvre M.H., and Henschen A. 1978. Structural relatedness of κ -casein and fibrinogen γ -chain. *J. Mol. Evol.*, 11:271-277.
- Jollès P., Parker F., Floc'h F., Migliore D., Alliel P., Zerial A., and Werner G.H. 1981. Immunostimulating substances from human casein. *J. Immunopharm.*, 3:363-369.

- Jollès P. 1975. Structural aspects of the milk clotting process. Comparative features with the blood clotting process. *Mol. Cel. Biochem.*, 7:73-85.
- Kania R.J., Santiago N.A., and Gray G.M. 1972. Intestinal cell surface peptidase: potential role in protein digestion. *Gastroenterology*, 62:768A.
- Kararli T.T. 1995. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm. Drug Dispos.*, 16: 351-380.
- Karle J., Woldbye D.P., Elster L., Diemer N.H., Bolwig T.G., Olsen R.W., and Nielsen M. 1998. Antisense oligonucleotide to GABA_(A) gamma-2 subunit induces limbic status epilepticus. *J. Neurosci. Res.* 54:863-869.
- Keil B. 1992. Specificity of proteolysis. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-NewYork, 335.
- Kenny A.J., Stephenson S.L., and Turner A.J. 1987. Cell surface peptidases. In: Kenny A.J., eds. *Mammalian ectoenzymes*. Amsterdam: Elsevier; 169-210.
- Kerchner G.A., and Geary L.E. 1983. Studies on the transport of enkephalin-like oligopeptides in rat intestinal mucosa. *JPET*, 226:33-38.
- Kernéis S., Caliot E., Stubbe H., Bogdanova A., Kraehenbuhl J.P. and Pringault E. 2000. Molecular studies of the intestinal mucosal barrier physiopathology using cocultures of epithelial and immune cells : a technical update. *Microb. Infect.*, 2:1119-1124.
- Kibangou I.B., Bouhallad S., Henry G., Bureau F., Allouche S., Blais A., Guérin P., Arhan P., and Bouglé D.L. 2005. Milk proteins and iron absorption : contrasting effects of different caseinophosphopeptides. *Pediatr Res*, 58: 731-733.
- Kilara A. 1994. Whey protein functionality. In: *Protein functionality in food systems*. Hettarachy, N. & Ziegler, G. R. (Eds.); Marcel Dekker Inc.: New York; 325-355.
- Kiliaan A.J., Saunders P.R., Bijlsma P.B., Berin M.C., Taminau T.A., Groot J.A., and Perdue M.H. 1998. Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 275: G1037-G1044.
- Kim J.H., Desor D., Kim Y.T., Yoon W.J., Kim K.S., Jun J.S., Pyun K.H., and Shim I. 2007. Efficacy of α_{s1} -casein hydrolysate on stress-related symptoms in women. *Eur. J. Clin. Nutr.*
- Kim Y.S., Kim Y.W., and Sleisenger M.H. 1974. Studies on the properties of peptide hydrolases in the brush-border and soluble fractions of small intestinal mucosa of rat and man. *BBA*, 370:283-296.
- Kitts D.D., and Yuan Y.V. 1994. Caseinophosphopeptides and calcium bioavailability. *Trends in Food Sci. & Tech.*, 3:31-35.
- Knipp G.T., Vander Velde D.G., Siahaan T.J., and Borchard R.T. 1997. The effect of β -trun structure on the passive diffusion of peptides across caco-2 cell monolayers. *Pharmacol. Res.*, 14:1332-1339.

- Kobayashi D., Nozawa T., Imai K., Nezu J., Tsuji A., Tamai I. 2003. Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B in pH-dependent transport across intestinal apical membrane. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 308:438-445.
- Korhonen H., and Pihlanto A. 2003. Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Curr. Pharm. Des.*, 9:1297-1308.
- Korhonen H., and Pihlanto A. 2006. Bioactive peptides : Production and functionality. *Int. Dairy J.*, 16:945-960.
- Kovacs-Nolan J., Zhang J.W., Hayakawa S., and Mine, Y. 2000. Immunochemical and structural analysis of the pepsin-digested egg white ovomucoid. *J. Agric. Food Chem.*, 48:6261-6266.
- Kraehenbuhl J.P., and Campiche M.A.1969. Early stages of intestinal absorption of specific antibodies in the newborn. An ultrastructural, cytochemical, and immunological study in the pig, rat, and rabbit. *J. Cell Biol.*, 42:345-65.
- Kraehenbuhl J.P., and Neutra M. R. 1992. Transepithelial transport and mucosal defense: the role of M cells. *Trends in Cell Biol.*, 2:134-138.
- Kullak-Ublick G.A., Ismail M.G., Stieger B., Landmann L., Huber R., Pizzagalli F., Fattinger K., Meier P.J., and Hagenbuch B. 2001. Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology*, 120:525-533.
- Lahov E., and Regelson W. 1996. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: Caseicidin, isracidin peptides. *Food Chem. Toxicol.*, 34:131-145.
- Laird D.A., Drexel H. 1934. Experimentating with foods and sleep : I. Effects of varying types of foods in offsetting sleep disturbances caused by hunger pangs and gastric distress-children and adults. *J. Am. Diet. Asso.*, 10:89-94.
- Langguth P., Bohner V., Biber J., and Merkle H.P. 1994. Metabolism and transport of the pentapeptide metkephamid by brush-border membrane vesicles of rat intestine. *J. Pharm.Pharmacol*, 46:34-40.
- Langguth P., Bohner V., Heizmann J., Merkle H.P., Wolfram S., Amidon G.L., and Yamashita S. 1997. The challenge of proteolytic enzymes in intestinal peptide delivery. *J. Control. Release*, 46:39-57.
- Lanoir D., Canini F., Messaoudi M., Lefranc C., Demagny B., Martin S., and Boudron L. 2002. Long-term effects of milk α s1-casein hydrolysate(prodiet F200) on healthy low and high stress responders. *Stress*, 5 (suppl.),124.
- Larhed A.W., Artursson P., and Bjork E. 1998. The influence of intestinal mucus components on the diffusion of drugs. *Pharmacol. Res.*, 15:66-71.
- Lecouvey M., Frochot C., Orlewski P., Driou A., Linden G., Gaillard J.L., Marraud M., Cung M.T., and Vanderesse R. 1997. Two-dimensional H-NMR and CD structural analysis in a

- micellar medium of a bovine α_{s1} fragments having benzodiazepine-like properties. *Eur. J. Biochem.*, 248:872-878.
- Lee V.H.L., Traver R.D., and Taub M.E. 1991. Enzymatic barriers to peptide and protein drug delivery, in: V.H.L. Lee (Ed.), *Peptide and Protein Drug Delivery*, Marcel Dekker, New York, 303-357.
- Leppert P.S., and Fix J.A. 1994. Use of everted intestinal rings for in vitro examination of oral absorption potential. *J. Pharm. Sci.*, 83:976-981.
- Liang E., Kabcenell A., Coleman J., Robson J., Ruffles R., and Yazdanian M. 2002. Permeability measurement of macromolecules and assessment of mucosal antigen sampling using in vitro converted M cells. *J. Pharm. Toxicol. Met.*, 46: 1-9.
- Lister R.G. 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92:180-185.
- Loukas S., Varoucha D., Zioudrou C., Streaty R.A., and Klee W.A. 1983. Opioid activities and structures of α -casein-derived exorphins. *Biochem.*, 22:4567-4573.
- Luddens H., and Korpi E. R. 1995. Biological function of GABA_A/benzodiazepine receptor heterogeneity. *J. Psychiatr. Res.*, 29:77-94.
- Lundin S., and Artursson P. 1990. Absorption of a vasopressin analogue, 1-deamino-8-D-arginine-vasopressin (dDAVP), in a human intestinal epithelial cell line, Caco-2. *Int. J. Pharm.*, 64:181-186
- Lundin S., and Vilhardt H. 1986. Absorption of 1-deamino-8-D-arginine vasopressin from different regions of the gastrointestinal tract in rabbits. *Acta. Endocrinolgy*, 112:457-460.
- Lundin S., Møss J., Bundgaard H., and Artursson P. 1990. Absorption of thyrotropin-releasing hormone (TRH) and a TRH prodrug in a human intestinal cell line (Caco-2). *Int. J. Pharm.*, 76:R1-R4
- Mac Donald R.L. 1997. Inhibitory synaptic transmission Epilepsy: A Comprehensive Textbook. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers 265–275. In: Engel Jr. J. & Pedley, T.A. (eds).
- Madara J.L., and Trier J.S. 1982. Structure and permeability of goblet cell tight junctions in rat small intestine. *Journal. Membrane Biology*, 66:145-157.
- Madara, J.L. 1989. Loosening tight junctions. Lessons from the intestine. *J. Clin. Invest*, 83:1089-1094.
- Maeno M., Yamamoto N. and Takano T., 1996. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* Cp790. *J. Dairy Sci.*, 79:1316-1321.

- Maenz D.D., Chenu C., Bellemare F., and Berteloot A. 1991. Improved stability of rabbit and rat intestinal brush border membrane vesicles using phospholipase inhibitors. *BBA*, 1069:250-258.
- Maruyama S., and Suzuki H. 1982. A peptide inhibitor of angiotensin I-converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agr. Biol. Chem.*, 46:1393-1394.
- Maruyama S.H., Mitachi H., Awaja J., Kurono M., Tomizaka N., and Suzuki H. 1987a. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor activity of the C-terminal hexapeptide of α_{s1} -casein. *Agr. Biol. Chem.*, 51:2557-2561.
- Maruyama S.H., Mitachi H., Tanaka H., Tomizuka N., and Suzuki, H. 1987b. Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from casein. *Agr. Biol. Chem.*, 51:1581-1586.
- Masuda O., Nakamura Y., and Takano T. 1996. Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr.*, 126:3036-3068.
- Matthews D.M. 1975. Intestinal absorption of peptides. *Physiological Reviews*, 55:537-608.
- Matthews D.M., and Adibi S.A. 1976. Intestinal absorption of peptides. *Physiol. Rev.*, 55:537-608.
- Matthews D.M., and Payne J.W. 1980. Transmembrane transport of small peptides. *Curr. Top. Membr. Transp.*, 14:331-425.
- Maubois J.L., and Léonil J. 1989. Peptides du lait à activité biologique. *Lait*, 69:245-269.
- Medina J.H., Pena C., Piva M., Paladini A.C., and De Robertis E. 1988. Presence of benzodiazepine-like molecules in mammalian brain and milk. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 152:534-539.
- Medina J.H., Pena C., Piva M., Wolfman C., De Stein M.L., Wasowski C, Da Cunha C, Izquierdo I., and Paladini A.C. 1992. Benzodiazepine in the brain. Their origin and possible biological roles. *Molecular Neurobiol.*, 6:377-386.
- Meisel M., and Frister H. 1989. Chemical characterization of bioactive peptides from in vivo digests of casein. *J. Dairy Res.*, 56:343-349.
- Meisel H., Andersson H.B., Buhl K., Erbersdobler H.F., and Schlimme E. 1991. Heat-induced changes in casein-derived phosphopeptides. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 30:227-232.
- Meisel H. 1997a. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers*, 43:119.
- Meisel H. 1997b. Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: Potential nutraceuticals for food and Pharmacology. applications. *Livestock Prod. Sci.*, 50:125-138.

- Meisel H., and FitzGerald R.J. 2003. Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr. Pharm. Des.*, 9:1289-1295.
- Mellander O. 1950. The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. 11. Peroral calcium dosage of infants. *Acta of the Society of Medicine of Uppsala*, 55:247-255.
- Mendy F. 1984. Fragmentation des protéines laitières. Interview recueillie par J. Rajnchapel-Messai. *Biofutur*, 24:60-61.
- Mercier J.C., Addeo F., and Pelissier J.P. 1971. Structure de la caséine α_{s1} bovine. Séquence complète. *Eur.J. Biochem*, 23:41-51.
- Messaoudi M., Lefranc-Millot C., Desor D., Demagny B., and Bourdon L. 2005. Effects of a tryptic hydrolysate from bovine milk α_{s1} -casein on hemodynamic responses in healthy human volunteers facing successive mental and physical stress situations. *Eur. J. Nutr.* 44:128-132.
- Miclo L., Perrin E., Driou A., Papadoupoulos V., Boujrad N., Vanderesse R., Boudier J.F., Desor D., Linden G., and Gaillard J.L. 2001. Characterization of alpha-casozepine, a tryptic peptide from bovine alpha α_{s1} -casein with benzodiazepine-like activity. *The FASEB J.*, 15:1780-1782.
- Migliore-Samour D., Floc'h F., and Jollès P. 1989. Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation. *J. Dairy Res.*, 56:357-362.
- Miura S., Song I.S., Morita A., Erickson R.H., and Kim Y.S. 1983. Distribution and biosynthesis of aminopeptidase N and dipeptidyl aminopeptidase IV in rat small intestine. *BBA*, 761:66-75.
- Mostov K., Apodaca G., Aroeti B., Okamoto C. 1992. Plasma membrane protein sorting in polarized epithelial cells. *J. cell biol.*, 116:577-583.
- Nellans H.N. 1991. Mechanism of peptide and protein absorption. (1) Paracellular intestinal transport: modulation of absorption. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 7:339-364.
- Neutra M. R., Frey A., and Kraehenbuhl J. P. 1996. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell*, 86:345-348.
- Nishimura E., Buchan A.M, and McIntosh C.H. 1986. Autoradiographic localization of mu- and delta-type opioid receptors in the gastrointestinal tract of the rat and guinea pig, *Gastroenterology*, 91:1084-1094.
- Niv Y., Byrd J.C., HO S.B., Dahiya R., and Kim Y.S. 1992. Mucin synthesis and secretion in relation to spontaneous differentiation of colon cancer cells in vitro. *Int. J. Cancer*, 50:147-152.
- Nurminen M.L., Sipola M., Kaarto H., Pilhanto-Leppälä A., Piilola K., and Korpela R. 2000. α -lactorphin lowers blood pressure via radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.*, 66:1535-1543.

- Ohinata K., Sonada S., Inoue N., Yamauchi R., Wada K., and Yoshikawa M. 2007. β -Lactotensin, a neurotensin agonist peptide derived from bovine β -lactoglobulin, enhances memory consolidation in mice, *Peptides*, 28:1470-1474.
- Ohl F. 2003. Testing for anxiety. *Clinical Neuroscience Res.*, 3:233-238.
- Ostuni M.A., Marazova K., Peranzi G., Vidic B., Papadopoulos V., Ducroc R., and Lacapere J.J. 2004. Functional characterization and expression of PBR in rat gastric mucosa: stimulation of chloride secretion by PBR ligands. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol.*, 286:G1069-G1080.
- Pantzar N., Weström B.R., Luts A., and Lundin S. 1993. Regional small-intestinal permeability in vitro to different-sized dextrans and proteins in the rat. *Scand. J. Gastroenterol.*, 28:205-211.
- Papadopoulos V. 1993. Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. *Endocr.Rev.*14:222-240.
- Pappenheimer J.R., Dahl C.E., Karnovsky M.L., and Maggio J.E. 1994. Intestinal absorption and excretion of octapeptides composed of D amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:1942-1945.
- Parker F., Migliore-Samour D., Floch F., Zerial A., Werner G.H., Jollès J., Casaretto M., Zahn H., and Jollès P. 1984. Immunostimulating hexapeptide from human casein : amino acid sequence, synthesis and biological properties. *Eur. J.Biochem.*, 145:677-682.
- Pauletti G.M., Gangwar S., Knipp G.T., Nerurkar M.M., Okumu F.W., Tamura K., Siahaan T.J., and Borchardt R.T. 1996. Structural requirements for intestinal absorption of peptide drugs. *J.Contr. Release*, 41:3-17.
- Pauletti G.M., Gangwar S., Siahaan T.J., Aubé J., and Borchardt R.T. 1997. Improvement of oral peptide bioavailability: Peptidomimetics and prodrug strategies. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 27: 235-256.
- Pauletti G.M., Okumu F.W., and Borchardt R.T. 1997. Effect of size and charge on the passive diffusion of peptides across Caco-2 cell monolayers via the paracellular pathway. *Pharm. Res.*, 14:164-168.
- Pedersen N.L., Nagain-Domaine C., Mahe S., Chariot J., Roze C., and Tome D. 2000. Caseinomacropptide specifically stimulates exocrine pancreatic secretion in the anesthetized rat. *Peptides*, 21:1527-1535.
- Pellegrino L., Batteli G., Resmini P., Ferranti P., Barone F., and Adeo F. 1997. Alkaline phosphate inactivation during Grana Padano cheese-making and related effects on cheese characterization and ripening. *Le Lait*, 77:217-220.
- Pellow S., Chopin P., File SE., and Briley M. 1985. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 14:149-167.

Pèrès J.M., Bouhallab S., Bureau F., Maubois J.L., Arhan P., and Bouglé D. 1999. Mechanisms of absorption of caseinophosphopeptide bound iron. *J. Nutr. Biochem.*, 10:2156-222.

Perrin *et al.* (1995)

Peterson M.D., and Mooseker M.S. 1993. An in vitro model for the analysis of intestinal brush border assembly. I. Ultrastructural analysis of cell contact-induced brush border assembly in Caco-2BBE cells. *J Cell Sci.*, 105:445-460.

Pinel J.P.J., and Treit D. 1978. The conditioned defensive burying paradigm and behavioral neuroscience. In: T. Robinson (Ed.). *Behavioral approaches to brain research*, New York, Oxford University Press, 212-234.

Pinto M., Rabine-Leon S., Appay M.D., Kedinger M., Tradou N., Dussaulx E., Louroix B., Simon-Assmann P., Haffen K., Fogh J., and Zweibaum A. 1983. Enterocyte-like differentiation and polarisation of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biololy. Cell.*, 47:323-330.

Pringault E. 1996. Towards an in vitro model for microorganism transport and antigen sampling through the epithelial digestive barrier. in "Essentials of Immunology", Eds M. Kagnoff and H. Kiyono, Academic Press.

Quan Y.S., Fujita T., Tohara D., Tsuji M., Kohyama M., Yamamoto A. 1999. Transport kinetics of leucine enkephalin across Caco-2 monolayers: Quantitative analysis for contribution of enzymatic and transport barrier. *Life Sci.*, 64:1243-1252.

Quirós A., Dávalos A., Lasunción M.A., Ramos M., Recio I. 2008. Bioavailability of the antihypertensive peptide LHLPLP: Transepithelial flux of HLPLP. *Int. Dairy J.*, 18:279-286.

Richens A. 1992. New drugs for epilepsy: a rapidly changing scene. *Acta Neurological Scandinavi.*, 40:65-70.

Roberfroid M. B. 1999. What is beneficial for health ? The concept of functional food. *Food Chem. Toxicol.*, 37:1039-1041.

Rodgers R. J., and Dalvi A. 1997. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 21: 801-810.

Rodgers R.J., Cao B.J., Dalvi A., and Holmes A. 1997. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J med Res*, 30:289-304.

Rodgers R.J., Cole J.C., and Cobain M.R. 1992. Anxiogenic-like effects of fluprazine and eltoprazine in the mouse elevated plus maze: profile comparison with 8-OH-DPAT, TFMPP and mCPP. *Behav. Pharmacol*, 3:621-624.

Roufik S., Gauthier S.F., and Turgeon S.L. 2005. In vitro digestibility of bioactive peptides derived from bovine β -lactoglobulin. *Int. Dairy J.*, 16:294-302.

- Rousset M. 1985. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: Two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie*, 68:1035-1040.
- Rowan A.M., Moughan P.J., Wilson M.N., Maher K., and Tasman-Jones C. 1994. Comparison of the ileal and faecal digestibility of dietary amino acids in adult humans and evaluation of the pig as a model for digestion studies in man. *Br. J. Nutr.*, 71: 29-42.
- Rubas W., and Grass G.M. 1993. Comparison of the permeability characteristics of a human colonic epithelial Caco-2 cell line to colon of rabbit, monkey and dog intestine and human drug absorption. *Pharm. Res.*, 10:113-8.
- Rubas W., Jezyk N., and Grass G.M. 1992. Gastrointestinal lymphatic absorption of peptides and proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 7:15-69.
- Sachdev G.P., Fruton J.S. 1975. Kinetics of action of pepsin on fluorescent peptide substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 72:3424-3427.
- Sai Y., Kajita M., Tamai I., Kamata M., Wkama J., Wakamiya T., and Tsuji A. 1998. Intestinal absorption of fluorescence-derived cationic peptide 001-C8-NBD via adsorptive-mediated transcytosis. *Biorganic and Medicinal Chem.*, 6:841-848.
- Saitou M., Ando-Akatsuka Y., Itoh M., Furuse M., Inazawa J., Fujimoto K., and Tsukita S. 1997. Mammalian occludin in epithelial cell: its expression and subcellular distribution. *Eur. J. Cell. Biol.*, 73:222-231.
- Samloff M., and Liebman W.M. 1973. Cellular localization of the group II pepsinogens in human stomach and duodenum by immunofluorescence. *Gastroenterology*, 65:36-42.
- Santos J., Yang P.C., Soderholm J.D., Benjamin M and. Perdue M.H 2000. Role of mast cells in chronic stress induced colonic epithelial barrier dysfunction in the rat. *Gut*, 48:630-636.
- Santos J., Saunders P.R, Hanssen N.P, Yang P.C, Yates D., Groot J.A, and Perdue M.H. 1999. Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat, *American J. of Physiology*, 277:G391-G399.
- Satake M., Enjoh M., Nakamura Y., Takano T., Kawamura Y., Arai S. 2002. Transepithelial transport of a bioactive tripeptide, Val-Pro-Pro, in human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biosci., Biotech. Biochem.*, 66:378-384.
- Saudou F., Amara D.A., Dierich A., LeMeur M., Ramboz S., Segu L., Buhot M.C. and R. Hen, 1994. Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT_{1B} receptor. *Sciences*, 265:1875-1878.
- Saunders P.R., Kosecka U., McKay D.M., and Perdue M.H. 1994. Acute stressors stimulate ion secretion and increase epithelial permeability in rat intestine. *Am. J. Physiol.*, 267:G794-G799.
- Schusdziarra V., Schick R., de la Fuente A., Holland A., Brantl V., and Pfeiffer E.F. 1983. Effect of beta-casomorphins on somatostatin release in dogs, *Endocrinology*, 112:1948-1951.

- Shen W.C., Wan J., and Ekrami H. 1992. Enhancement of polypeptide and protein absorption by macromolecular carriers via endocytose and transcytose. *Adv. Drug. Delivery Rev.*, 8:93-113.
- Shimizu M., Tsunogai M., and Arai S. 1997. Transepithelial Transport of Oligopeptides in the Human Intestinal Cell, Caco-2. *Peptides*, 18:681-687.
- Silva S.V., and Malacata X. 2005. Caseins as source of bioactive peptides. *Int. Dairy J.*, 15:1-15.
- Smacchi E., and Gobetti M. 2000. Bioactive peptides in dairy products: Synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiol.*, 17:129-141.
- Söderholm J.D., and Perdue M.H. 2001. Stress and the gastrointestinal tract II. Stress and intestinal barrier function. *Am. J. Physiol. Gastroint. Liver Physiol.*, 280:G7-G13.
- Söderholm J.D., Yang P.C., Ceponis P., Vohra A., Riddell R., Sherman P.M., and Perdue M.H. 2002. Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. *Gastroenterology*, 123:1099-1108.
- Stevenson B.R., Siliciano J.D., Mooseher M.S., and Goodenough D.A. 1986. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (Zonula occludens) in a variety of epithelial. *J. Cell. Biol.* 103:755-766.
- Svedberg J., de Haas J., Leimenstoll G., Paul F., and Teschemacher H. 1985. Demonstration of β -casomorphin immunoreactive materials in vitro digests of bovine milk and in small intestine contents after bovine milk ingestion in adult humans. *Peptides*, 6:825-830.
- Tauzin J., Miclo L., and Gaillard J.L. 2002. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine α_{s2} -casein. *FEBS Letters*, 531:369-374.
- Terada T., and Inui K. 2004. Peptide transporters: structure, function, regulation and application for drug delivery. *Curr. Drug Metab.*, 5:85-94.
- Teschemacher H. 2003. Opioid receptor ligands derived from food proteins. *Curr. Pharm. Des.*, 9:1331-1344.
- Teschemacher H., Koch G., and Brantl V. 1994. Milk protein derived atypical opioid peptides and related compounds with opioid antagonist activity. In β -Casomorphins and Related Peptides: Recent Developments. 3-17 [V Brantl and H Teschemacher, editors]. Weinheim: VCH.
- Thwaites D.T., Hirst B.H., and Simmons N.L. 1993. Passive transepithelial absorption of thyrotropin-releasing-hormone (THR) via a paracellular route in cultured epithelial cell monolayers. *Pharm. Res.*, 10:674-681.
- Tieku S., and Hooper N. M. 1992. Inhibition of aminopeptidases N, A and W : a re-evaluation of the actions of bestatin and inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Biochemical pharmacology*, 44:1725-1730.

- Tobey N., Heizer W., Yeh W., Tai-in Huang, and Hoffner C. 1985. Human intestinal brush border peptidases. *Gastroenterology*, 88:913-926.
- Treit D., Pinel J.P., and Fibiger H.C. 1981. Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 15:619-626.
- Tyrer P., Foxwell A.R., Kyd J., Harvey M., Sizer P., and Cripps A. 2002. Validation and quantitation of an *in vitro* M-cell model. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 299:377-383.
- Ugolev A.M., Smirnova L.F., Iezuitova N.N., Timofeeva N.M., Mityushova N.M., Egorova V.V., and Parshkov E.M. 1979. Distribution of some absorbed and intrinsic enzymes between the mucosal cells of the rat small intestine and the apical glycocalyx separated from them. *FEBS Letters*, 104:35-38.
- Ussing H. H. and Zerhan K. 1951. Active transport of sodium as the source of electric current in the short circuited isolated frog skin. *Acta physiol. scand.*, 23:110-127.
- Vaysse N. 2005. Physiologie du pancréas exocrine. *EMC - Hépatogastro-entérologie*, 2:59-74.
- Vermeirssen V., Deplancke B., Tappenden K.A., van Camp J., Gaskins H.R., and Westraete W. 2002a. Intestinal transport of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg- through a Caco-2 Bbe monolayer. *J. Pept. Sci.*, 8:95-100.
- Vermeirssen V., Van Camp J., Verstraete W. 2002b. Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *J. Biochem. Biophys. Met.*, 51:75-87.
- Vermeirssen V., van der Bent A., Van Camp J., Van Amerongen A., and Verstraete W. 2004. A quantitative *in silico* analysis calculates the angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in pea and whey protein digests. *Biochimie*, 86:231-239.
- Vilhardt H., and Lundin S. 1986. *In vitro* intestinal transport of vasopressin and its analogues. *Acta Physiol. Scand.*, 125:601-607.
- Violle N., Messaoudi M., Lefranc-Millot C., Desor D., Nejd A., Demagny B., Schroeder H. 2006. Ethological comparison of the effects of a bovine α 1-casein tryptic hydrolysate and diazepam on the behaviour of rats in two models of anxiety. *Pharm. Biochem. Behav.*, 84:517-523.
- Wal J.M. 1999. Assessment of allergic potential of (novel) foods. *Nahrung*, 43:S168-S174.
- Walsh D.J., Bernard H., Murray B.A., MacDonald J., Pentzien A.K., Wright G.A. 2004. *In vitro* generation and stability of the lactokinin β -lactoglobulin fragment (142-148). *J. Dairy Sci.*, 87:3845-3857.
- Walter E., and Kissel T. 1995. Heterogeneity in the human intestinal cell line Caco-2 leads to differences in transepithelial transport. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 3:215-230.

- Weltzin R., Lucia-Landris P., Michetti P., Fields B.N., Kraehenbühl J.P., and Neutra M.R. 1998. Binding and transepithelial transport of immunoglobulins by intestinal M-cells: demonstration using monoclonal IgA antibodies against enteric viral proteins. *J. Cell. Biol.*, 108:1673-1685.
- Wikman A., Karlsson J., Carlstedt I., and Artursson P. 1993. A drug absorption model based on the mucus layer producing human intestinal goblet cell line HT29-H. *Pharm. Res.*, 10:843-852.
- Wikman-Larhed A., and Artursson P. 1995. Co-cultures of human intestinal goblet (HT29-H) and absorptive (Caco-2) cells for studies of drug and peptide absorption. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 3:171-183.
- Wittchens E.S., Haskins J., and Stevenson B.R. 1999. Protein interactions at the tight junction : actin has multiple binding partners and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J. Biol. Chem.*, 274:35179-35185.
- Woodley J.F. 1994. Enzymatic barriers for GI peptide and protein delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.*, 11:61-95.
- Yamamoto N., Ejiri M., and Mizuno S. 2003. Biogenic peptides and their potential use. *Curr. Pharm. Des.*, 9:1345-1355.
- Yamauchi R., Ohinata K., Yoshikawa M. 2003. β -Lactotensin and neurotensin rapidly reduce serum cholesterol via NT2 receptor. *Peptides*, 24:1955-1961
- Yamauchi R., Wada E., Yamada D., Yoshikawa M., and Wada K. 2006. Effect of β -lactotensin on acute stress and fear memory. *Peptides*, 27:3176-3182.
- Yoshioka M., Erickson R. H., Matsumoto H., Gum E., and, Kim Y.S. 1987. Expression of dipeptidyl aminopeptidase IV during enterocytic differentiation of human colon cancer (Caco-2) cells. *Exp. Cancer*, 47:916-921.
- Zaïr Z.M., Elorant J.J., Stieger B., and Kullar-Ublick G.A. 2008. Pharmacogenetics of OATP, OAT and OCT and PEPT transporters in the intestine, liver and kidney. *Future Medicine*, 9:597-624.
- Zhou X.H. 1994. Overcomming enzymatic and absorption barriers to non-parenterally administred protein and peptide drugs. *J. Contr. Release*, 29:239-252.
- Zucht H.D., Raida M., Adermann K., Magert H.J., and Forssman W.G. 1995. Casocidin-I: A casein α_{s2} -derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Letters*, 372:185-188.
- Zweibaum A. 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell*, 47:323-30.

Productions Scientifiques

Brevets :

Balandras F., Gaillard J.L., Laurent F., Le Roux Y., Miclo L. 2006. Utilisation d'un heptapeptide à activité anxiolytique pour la préparation de médicaments et de compléments alimentaires. *Demande de brevet d'invention n°06 10855 déposée le 13/12/2006.* .

Balandras F., Gaillard J.L., Laurent F., Le Roux Y., Miclo L. 2006. Utilisation d'un pentapeptide à activité anxiolytique pour la préparation de médicaments et de compléments alimentaires. *Demande de brevet.* .

Publication :

Balandras F., Gaillard J.L., Laurent F., Mollé D., Le Roux Y., Miclo L. *In vitro* gastro-pancreatic digestibility of α -casozepine, a bioactive peptide. *Characterization of the peptide fragments.* **Soumission en cours.**

Communication orale et Poster :

Balandras F., Le Roux Y., Gaillard J.L., Laurent F., Miclo L. Janvier 2004. *Etude du transfert et de l'hydrolyse au niveau de l'épithélium intestinal de l' α -casozépine.* Présentation lors de séminaires organisés au sein de l'école doctorale RP2E.

Violle N., Balandras F., Le Roux Y., Desor D., Schroeder H., 2008. *Combined effects of illumination, closed wall type and extramaze space size on the anxiety-related behavioural baseline of rats submitted to the elevated plus-maze.* *Measuring Behavior* 2008, 26-29 août, Maastricht, Pays-Bas.

Résumé

L' α -casozépine, décapeptide issu de l'hydrolysats trypsique de la caséine α_{s1} , possède *in vitro* une affinité pour le site benzodiazépine des récepteurs GABA_A centraux (Lecouvey *et al.*, 1997 ; Miclo *et al.*, 2001). Des résultats attestent du potentiel anxiolytique de ce décapeptide seul ou au sein de son hydrolysats, *in vivo*, en administration intrapéritonéale et per os chez le rat Wistar (Guesdon *et al.*, 2006 ; Miclo *et al.*, 2001 ; Violle *et al.*, 2007) et chez l'Homme en administration orale (Kim *et al.*, 2007 ; Messaoudi *et al.*, 2005). Pour déterminer la sensibilité de l' α -casozépine à différentes attaques protéolytiques, des cinétiques d'hydrolyses gastriques, pancréatiques et intestinales, ont été réalisées *in vitro* avec les enzymes et systèmes enzymatiques suivants ; pepsine, trypsine, α -chymotrypsine, CorolasePP®, vésicules membranaires de bordure en brosse d'entérocytes de rats et épithélium entérocytaire reconstitué par les cellules de la lignée Caco-2. Pour chacune des conditions d'hydrolyses étudiées, l'ensemble des fragments peptidiques libérés ont été séparés par chromatographie liquide haute performance en phase inversée et caractérisés par spectrométrie de masse. Ces analyses mettent en évidence la résistance partielle de l' α -casozépine à certaines enzymes et systèmes enzymatiques. L'hydrolyse pepsique de l' α -casozépine libère notamment deux fragments : ${}_{91}$ YLGYLEQ $_{97}$ et ${}_{91}$ YLGYL $_{95}$, nommés F97 et F95 qui s'avèrent être plus résistants que α -casozépine à certaines enzymes employées. Ainsi pour permettre une meilleure compréhension de la relation entre la structure de l' α -casozépine et la fonction benzodiazépine mimétique obtenu *in vivo*, ces peptides tronqués dans leur partie carboxy-terminale ont été testés *in vivo* chez le rat Wistar en injection intrapéritonéale. Ils s'avèrent être également détenteurs d'activité anxiolytique. Cependant aucun transfert de l' α -casozépine et des fragments F97 et F95 n'a pu être observé au travers de l'épithélium entérocytaire reconstitué par le modèle cellulaire de la lignée Caco-2 et ce malgré les différentes conditions de cultures et d'analyses testées.

Mots clés : α -casozépine / modèle cellulaire Caco-2 / hydrolyses gastriques, pancréatiques et intestinales *in vitro* / VMBB / étude du comportement chez le rat Wistar.

Abstract:

α -Casozepeine, a tryptic decapeptide from bovine α_{s1} -casein, have *in vitro* an affinity for the benzodiazepine site of the central receptor GABA_A (Lecouvey *et al.*, 1997; Miclo *et al.*, 2001). Some results display the anxiolytic potential of this peptide alone or within its hydrolysats, *in vivo*, in intra peritoneal administration and *per os* in Wistar rats (Guesdon *et al.*, 2006; Miclo *et al.*, 2001; Violle *et al.*, 2007) and in human in oral administration (Kim *et al.*, 2007; Messaoudi *et al.*, 2005). To determine the sensitivity of α -casozepeine in various proteolytic attacks, kinetics of gastric, pancreatic and intestinal hydrolyses, were realized *in vitro* with enzymes and following enzymatic systems; pepsin, trypsin, α -chymotrypsin, CorolasePPTM, brush border membranar vesicles rats enterocytes and enterocytes epithelium reconstituted by the Caco-2 cell line. For each of the conditions of studied hydrolysis, all the peptides fragments released were separated by liquid chromatography high-performance in inverted phase and characterized by mass spectrometry. These analyses underline the partial resistance of α -casozepeine in some enzymes and enzymatic systems. α -Casozepeine pepsic hydrolysis release in particular two peptide fragments: ${}_{91}$ YLGYLEQ $_{97}$ and ${}_{91}$ YLGYL $_{95}$, named F97 and F95 who turn out to be more resistant than α -casozepeine in some used enzymes. So to allow a better understanding of the relation between structure of α -casozepeine and the benzodiazepine mimetic function obtained *in vivo*, these peptides truncated in their carboxy-terminal party were tested *in vivo* with Wistar rat in intra peritoneal injection. They turn out to be also holders of anxiolytic activity. However no transfer of α -casozepeine and fragments F97 and F95 was observed through the enterocyte epithelium reconstituted by the cellular model Caco-2 and this in spite of the various conditions of cultures and tested analyses.

Keywords: α -casozépine / cellular model Caco-2 / hydrolyses gastric, pancreatic and intestinal *in vitro* / VMBB / study of the behavior to the rat Wistar.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Madame Monique ROUSSET, Directeur de Recherche, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris

Madame Joëlle LEONIL, Directeur de Recherche, INRA AgroCampus, Rennes

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame BALANDRAS Frédérique

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

"Etude in vitro de la sensibilité de l' α -casozépine, décapeptide à activité benzodiazépine mimétique, à diverses protéases et peptidases du tractus gastro-intestinal. Etude comportementale chez le rat Wistar de l'activité anxiolytique des fragments F97 et F95 libérés par la pepsine".

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Sciences agronomiques** »

Fait à Vandoeuvre, le 30 septembre 2008

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT.

