



**HAL**  
open science

## Contribution à l'étude d'oligopeptides (

Caroline Bauchart

► **To cite this version:**

| Caroline Bauchart. Contribution à l'étude d'oligopeptides (

**HAL Id: tel-00688406**

**<https://theses.hal.science/tel-00688406>**

Submitted on 17 Apr 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## *Thèse*

Présentée à l'Université d'Auvergne  
pour l'obtention du grade de Docteur d'Université

*Spécialité : NUTRITION*

Soutenue le 18 décembre 2006

**Caroline BAUCHART**

---

**Contribution à l'étude d'oligopeptides (< 5 kDa)  
générés par la préparation et la digestion de deux aliments carnés,  
la viande bovine et la chair de la truite**

---

**Directeur de thèse :** Philippe PATUREAU MIRAND  
**Encadrants :** Martine MORZEL et Didier RÉMOND

### **Jury**

<b>Président :</b>	Pr. Yves BOIRIE	Professeur, Université d'Auvergne
<b>Rapporteurs :</b>	Pr. Daniel TOMÉ Dr. Véronique VERREZ-BAGNIS	Professeur, INA-PG Cadre de Recherches, IFREMER
<b>Membres :</b>	Dr. Joëlle LÉONIL Dr. Martine MORZEL Dr. Didier RÉMOND	Directeur de Recherches, INRA Chargée de Recherches, INRA Chargé de Recherches, INRA

*à mes parents*

*à Arnaud*

---

---

## **REMERCIEMENTS**

---

---

## **REMERCIEMENTS**

Ce travail de thèse a débuté en octobre 2003 au Centre de Recherches INRA de Clermont-Ferrand/Theix au sein de deux équipes d'unités différentes : l'équipe Biochimie et Protéines du Muscle (BPM) de la Station de Recherche sur la Viande (SRV) dirigée par Monsieur Joseph Culioli, et l'équipe Vieillessement de l'Unité Nutrition et Métabolisme Protéique (UNMP) dirigée par Monsieur Jean Grizard. Je souhaite ainsi remercier Messieurs Joseph Culioli et Jean Grizard pour m'avoir accueillie dans leurs unités, ainsi que les nouveaux responsables d'unités, Monsieur Jean-Pierre Renou, Directeur de l'Unité Qualité des Produits Animaux (QuaPA, ex-SRV) et Monsieur Yves Boirie, Directeur de l'UMR 1019 de Nutrition Humaine (nouvelle unité née de la fusion de 3 anciennes unités dont l'UNMP).

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements à Monsieur Philippe Patureau Mirand, Directeur de Recherches à l'Unité de Nutrition Humaine (UNH), Madame Martine Morzel, Chargé de Recherches à l'Unité QuaPA et Monsieur Didier Rémond, Chargé de Recherches à l'UNH, pour m'avoir confié ce travail et en avoir assuré la direction scientifique et technique de manière complémentaire et efficace. Je vous remercie pour vos participations actives à l'ensemble de mes travaux, vos connaissances, vos précieux et pertinents conseils dispensés tout au long de ces années, notamment dans la réalisation des expérimentations ainsi que dans la valorisation des résultats sous forme d'articles et de communications, et pour m'avoir donné les moyens de mener à bien ce travail dans les meilleures conditions possibles. Vos disponibilités, vos soutiens et la confiance que vous m'avez portée, m'ont été très utiles dans la conduite et l'aboutissement de ce projet. J'ai beaucoup appris et progressé auprès de vous durant ces 3 années de thèse et je tiens à vous exprimer ma plus profonde considération pour la qualité de vos encadrements.

Je souhaite remercier de nouveau Monsieur Yves Boirie, Professeur à l'Université d'Auvergne et Directeur de l'UMR 1019 Nutrition Humaine, d'avoir accepté de présider ce jury, ainsi que Monsieur Daniel Tomé, Titulaire de la Chaire de Nutrition Humaine à l'Institut National Agronomique Paris-Grignon et Directeur de l'UMR INRA/INA-PG 914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, et Madame Véronique Verrez-Bagnis, Cadre de Recherches à l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation

de la Mer (IFREMER de Nantes), pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail, et Madame Joëlle Léonil, Directrice adjointe de l'UMR 1253 INRA/Agrocampus Science et Technologie du Lait et de l'Œuf à Rennes, pour avoir accepté d'être examinatrice de ce travail.

La majeure partie de ce travail de thèse repose sur les analyses faites par spectrométrie de masse, en particulier par les techniques de MALDI-ToF et de nano-HPLC-ESI-IT MS/MS, pour la caractérisation et l'identification de peptides présents dans des aliments tels que la chair de truite et de la viande bovine. Je tiens à remercier chaleureusement Monsieur Christophe Chambon, Ingénieur Responsable du Plateau Protéome à l'INRA de Clermont-Ferrand/Theix, pour tout le temps consacré à la réalisation de l'ensemble de ces analyses. Ta patience, ta rigueur et ta pertinence dans l'analyse des résultats nous ont permis d'obtenir des résultats intéressants et tout à fait prometteurs dans le domaine de la peptidomique. L'exploitation des résultats de MALDI-ToF repose essentiellement sur la collaboration avec Christelle Reynès, jeune chercheuse au Laboratoire de Physique Moléculaire et Structurale de la Faculté de Pharmacie à Montpellier, qui a traité les données brutes de spectrométrie de masse et réalisé des algorithmes permettant d'établir des listes des masses présentes dans nos échantillons. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour sa disponibilité dans le traitement de nos résultats. La dernière partie de ce travail repose sur l'identification des peptides de faibles poids moléculaire (< 1500 Da) par spectrométrie de masse HPLC-ESI-Q-ToF dans les contenus digestifs et les échantillons plasmatiques de la veine porte. Je remercie sincèrement Cindy Faveyrial, stagiaire en Master 2 Professionnel Analyse et Contrôle, pour avoir préparé et réalisé les analyses par HPLC-ESI-Q-ToF en collaboration avec Madame Estelle Pujos, Ingénieur Responsable de la Plateforme Métabolomique à l'INRA de Clermont-Ferrand/Theix, et Monsieur Jean-François Martin, Ingénieur à l'UNH, pour l'analyse des résultats réalisée avec le logiciel Markerlynx.

Je tiens également à remercier Madame Isabelle Savary-Auzeloux, Chargée de Recherches à l'Unité de Recherche sur les Herbivores (URH) à l'INRA de Clermont-Ferrand/Theix, et Céline Cossoul, Technicienne à l'URH, pour le temps qu'elles ont consacré au dosage de la carnosine et l'ansérine dans nos différents échantillons par RP-HPLC.

J'adresse tous mes remerciements à l'ensemble des personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation expérimentale de ce travail, et plus particulièrement :

- Le moulin de Pagnat à Saint-Saturnin pour nous avoir fourni les truites arc-en-ciel ;
- Monsieur Roland Jailler et toute l'équipe de l'Abattoir Expérimental de l'URH, pour nous avoir fourni les échantillons de muscle pectoral profond de bovin charolais ;
- Mesdames Emilie Thomas et Valérie Scislowski et Monsieur Alain Peyron de l'Association pour le Développement de l'Institut de la Viande (ADIV) pour nous avoir fourni des viandes et pour avoir financé une partie de ce travail en collaboration avec le Conseil Scientifique de l'Interprofession bovine (Interbev) et l'Office National Interprofessionnel des Viandes, de l'Élevage et de l'Aviculture (OFIVAL) ;
- Monsieur Denys Durand, Ingénieur de Recherche à l'URH, pour avoir réalisé avec Monsieur Didier Rémond les opérations chirurgicales sur les animaux (pose de canules digestives et de cathéters sanguins), ainsi que Monsieur Philippe Gaydier pour s'être occupé de l'anesthésie des animaux, Monsieur Christian Lafarge et toutes les personnes de l'Unité Expérimentale de Nutrition Comparée (UENC) à l'INRA de Clermont-Ferrand/Theix pour le soin apporté aux animaux ;
- Alban Berne, stagiaire de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE) à l'Unité QuaPA pour sa gentillesse, sa disponibilité et ses précieux conseils en HPLC ;
- Madame Caroline Buffière, Assistante Ingénieur à l'UNH pour sa disponibilité et son aide précieuse pour les prélèvements de sang et la préparation des échantillons lors des expérimentations sur les animaux, ainsi que pour la réalisation de nombreux dosages ;
- Madame Madeleine Dudilieu de l'URH pour m'avoir permis d'effectuer des dosages d'azote par la méthode de Kjeldahl dans son laboratoire ;
- Mesdames Aline LeMorvan et Eveline Arousseau de l'URH à l'INRA de Clermont-Ferrand/Theix pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire pour la préparation et la réalisation des dosages d'ytterbium dans les contenus digestifs par spectrométrie d'absorption atomique, ainsi que Monsieur Claude Poncet de l'URH pour sa disponibilité et son aide précieuse dans la lyophilisation des contenus digestifs pour le dosage d'ytterbium ;
- Madame Paulette Rousset et Monsieur Christophe Giraudet de l'UNH au Laboratoire de Nutrition Humaine (LNH) pour nous avoir dépanné et avoir effectué des hydrolyses acides pour des dosages d'acides aminés totaux.

J'adresse toute ma reconnaissance et ma sympathie à Madame Hélène Lafarge de l'UNH pour sa disponibilité et son aide précieuse dans la recherche et l'enregistrement de

toutes mes données bibliographiques dans Procite et la base de données de l'UNH, ainsi que Mesdames Madeleine Paccard, Michèle Borel, Marie-Christine Bayle et Vanessa Boisserie de l'UNH à et Mesdames Eliane Bachelard et Françoise Lassalas de l'Unité QuaPA pour leur aide dans toutes les démarches administratives.

Un grand merci à Monsieur Gérard Donadille, Technicien Informatique de l'UNH, pour m'avoir très souvent dépannée et secourue pour de petits et grands soucis informatiques.

Je souhaite remercier également Madame Christine Chopin de l'IFREMER de Nantes pour avoir fait partie de mon comité de thèse.

Je remercie très sincèrement toutes les personnes des Unités QuaPA et UNH pour leur accueil chaleureux, leur gentillesse, leur bonne humeur et leur soutien contribuant ainsi à l'accomplissement de ce travail dans une ambiance très agréable et sympathique. Je tiens à remercier plus particulièrement Muriel, Alban, Carlos, Véronique, Claire, Anthony, Cindy, Barbara, Solange, mais aussi Monsieur Laurent Mosoni et Madame Caroline Buffière, avec qui j'ai partagé le même bureau à l'UNH, pour leur sympathie, leur disponibilité et leur soutien amical.

Enfin, je ne peux terminer ces remerciements sans adresser mes plus profondes pensées à mes parents auxquels je dois tout, qui m'ont toujours encouragée et soutenue dans mes choix et dans les moments difficiles et à Arnaud, pour ton amour, ton soutien, la confiance que tu as su me porter et pour tous les sacrifices que tu as dû faire.



---

---

**LISTE DES PUBLICATIONS ET  
DES COMMUNICATIONS**

---

---

## **PUBLICATIONS**

Bauchart C., Chambon C., Patureau Mirand P., Savary-Auzeloux I., Rémond D., Morzel M. (2007). Peptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle subjected to ice storage and cooking. *Food Chem.* 100 (4), 1566-1572.

Bauchart C., Rémond D., Chambon C., Patureau Mirand P., Savary-Auzeloux I., Reynès C., Morzel M. (2006). Small peptides (<5 kDa) found in ready-to-eat beef meat. *Meat Sci.* 74 (4), 658-666.

Bauchart C., Savary-Auzeloux I., Patureau Mirand P., Thomas E., Morzel M., Rémond D. Carnosine concentration of ingested meat affects carnosine net release into the portal vein of minipigs. *J. Nutr.* (sous presse).

Bauchart C., Rémond D., Chambon C., Patureau Mirand P., Reynès C., Buffière C., Morzel M. Peptides containing bioactive sequences released during digestion of cooked trout flesh in pigs. *J. Agric. Food Chem.* (soumis).

Bauchart C., Morzel M., Chambon C., Patureau Mirand P., Reynès C., Buffière C., Rémond D. Specific peptides are reproducibly released in digestive contents during digestion of cooked beef meat in pigs. *Br. J. Nutr.* (soumis).

## **COMMUNICATIONS**

Bauchart C., Rémond D., Chambon C., Morzel M. (2004). Occurrence of peptides in trout muscle during post mortem storage and cooking. *Proceedings of the 34<sup>th</sup> congress of The West European Fish Technologists Association, 12-15 September 2004, Lübeck (Germany), pp. 25-29 (Text and Oral Communication).*

Bauchart C., Chambon C., Patureau Mirand P., Savary-Auzeloux I., Rémond D., Morzel M. (2005). Caractérisation de peptides dans le muscle Pectoral profond de bovin après maturation et cuisson. *2<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Nutrition, 17-19 Novembre 2005, Marseille (France), p. 114 (Résumé et Affiche).*

Bauchart C., Rémond D., Chambon C., Patureau Mirand P., Savary-Auzeloux I., Reynès C., Morzel M. (2006). Caractérisation de peptides présents dans les produits carnés. *Journées de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, 30-31 Mars 2006, Clermont-Ferrand (France) (Résumé et Communication Orale)*.

Bauchart C., Savary-Auzeloux I., Cossoul C., Buffière C., Patureau Mirand P., Thomas E., Morzel M., D. Rémond (2006). Bioavailability of carnosine from beef meat in mini-pigs. *Proceedings of the 52<sup>nd</sup> International Congress of Meat Science and Technology, 13-18 August 2006, Dublin (Ireland), pp. 711-712 (Text and Poster)*.

---

---

## **ABBREVIATIONS**

---

---

**ABREVIATIONS**

AAL	Acides aminés libres
AAP	Acides aminés peptidiques
AAT	Acides aminés totaux
ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ACN	Acétonitrile
ADP	Adénosine diphosphate
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
$\alpha$ -CHCA	$\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique
CPP	Caséinophosphopeptide
CMP	Caséinomacropeptide
Cr	Créatine
CTAB	Cétrimonium bromide
Da	Dalton
ESI	Electrospray Ionisation
GA3PDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
GRF	Growth regulating factor
IC <sub>50</sub>	Inhibition concentration 50%
IT	Ion trap
kDa	Kilo dalton
KOH	Hydroxyde de potassium
LDL	Low-density lipoprotein
m/v	Masse/volume
m/z	Masse/charge
MALDI	Matrix-assisted laser desorption-ionisation
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
OATP	Organic anion transporting polypeptide
PCA	Acide perchlorique
PCr	Phosphocréatine
PEPT1	Peptide transporter 1

POT	Proton-coupled oligopeptide transporter
PRP	Protéine riche en proline
PTR	Peptide transporter
RP-HPLC	Chromatographie liquide haute pression en phase inverse
SEM	Erreur standard de la moyenne
SHR	Spontaneously hypertensive rat
SSA	Acide sulfosalicylique
TAC	Capacité antioxydante totale
TCA	Acide trichloroacétique
TD	Tube digestif
TFA	Acide trifluoroacétique
TGI	Tractus gastro-intestinal
ToF	Time of flight
Tr	Temps de rétention
UFC	Unités formant colonies
v/v	Volume/volume

---

---

## **SOMMAIRE**

---

---

## SOMMAIRE

<b><u>INTRODUCTION GENERALE</u></b> .....	16
<b><u>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</u></b> .....	18
<b><u>I. LES PEPTIDES BIOACTIFS</u></b> .....	18
1. <u>Les effets physiologiques</u> .....	18
1.1. Effet sur le système digestif.....	18
1.1.1. Régulation de la digestion .....	19
1.1.2. Modulation de l'absorption des nutriments.....	20
1.2. Effet immunomodulateur.....	21
1.3. Effet antimicrobien .....	22
1.4. Effet sur le système cardiovasculaire .....	23
1.4.1. Effet antithrombotique.....	23
1.4.2. Effet antihypertenseur .....	24
1.5. Effet sur le système nerveux.....	25
1.6. Autres effets.....	26
1.7. Quelques éléments sur les aspects quantitatifs .....	26
2. <u>Peptides endogènes non protéiniques dans le muscle</u> .....	28
2.1. Les dipeptides de l'histidine.....	28
2.1.1. Les activités biologiques des dipeptides de l'histidine .....	28
2.1.2. Le métabolisme des dipeptides de l'histidine .....	29
2.2. Le glutathion.....	29
2.2.1. Les activités biologiques du glutathion .....	30
2.2.2. Le métabolisme du glutathion .....	31
3. <u>Multifonctionnalité des peptides</u> .....	31
4. <u>Modes de production et sources</u> .....	31
4.1. Action des protéases fermentaires .....	32
4.2. Action des protéases ajoutées .....	32
4.3. Hydrolyse digestive .....	33



---

<b>II. <u>PRODUCTION DE PEPTIDES AU COURS DE L'HYDROLYSE DIGESTIVE</u></b>	<b>33</b>
1. <u>La digestion buccale</u> .....	34
2. <u>La digestion gastrique</u> .....	34
3. <u>La digestion intestinale</u> .....	35
3.1. Hydrolyse par les enzymes pancréatiques .....	35
3.2. Hydrolyse par les peptidases intestinales .....	36
3.3. Rôle de la microflore intestinale.....	37
3.4. Résistance à l'hydrolyse digestive .....	37
3.5. Peptides endogènes.....	38
<b>III. <u>L'ABSORPTION DES PEPTIDES DANS L'INTESTIN GRELE</u></b> .....	<b>38</b>
1. <u>L'intestin grêle</u> .....	39
2. <u>L'absorption intestinale des peptides</u> .....	40
2.1. Absorption par voie transcellulaire.....	41
2.1.1. Transporteurs membranaires de peptides .....	41
2.1.1.1. Transporteurs associés à la membrane apicale .....	41
- PEPT1 .....	41
- OATP-B .....	43
2.1.1.2. Transporteur associé à la membrane basolatérale .....	43
2.1.2. Absorption par transcytose .....	44
2.1.3. Devenir des peptides entrés dans l'entérocyte .....	44
2.2. Absorption par voie paracellulaire .....	45
2.3. Absorption des peptides chez l'homme.....	46
<b>IV. <u>DEVENIR DES PEPTIDES APRES ABSORPTION INTESTINALE</u></b> .....	<b>47</b>
1. <u>Hydrolyse plasmatique des peptides</u> .....	47
2. <u>Prélèvement tissulaire</u> .....	48
3. <u>Les peptides dans le sang</u> .....	48
<b>V. <u>LE MUSCLE ET LA VIANDE, SOURCES DE PEPTIDES</u></b> .....	<b>49</b>
1. <u>Le muscle squelettique</u> .....	49
1.1. Anatomie et fonction .....	49
1.2. Les protéines constitutives .....	51
1.2.1. Les protéines du tissu conjonctif .....	51

1.2.2. Les protéines myofilamentaires et associées .....	52
1.2.3. Les protéines du cytosquelette.....	53
1.2.4. Les enzymes du métabolisme énergétique et de détoxification .....	53
1.2.5. Autres protéines .....	54
2. <u>La transformation du muscle en viande prête à consommer</u> .....	54
2.1. Les phases précoces <i>post mortem</i> d'évolution du tissu musculaire.....	55
2.2. La maturation (bovin) ou perte de fraîcheur (poisson).....	55
2.3. Les modifications protéiques après la sortie de <i>rigor mortis</i> .....	55
2.4. Les mécanismes de la protéolyse <i>post mortem</i> .....	56
2.4.1. Les calpaïnes.....	57
2.4.2. Les cathepsines .....	57
2.4.3. Le protéasome.....	57
2.4.4. Les caspases.....	57
2.4.5. Contribution respective des différents systèmes protéolytiques.....	58
2.4.6. Les mécanismes non-enzymatiques de la protéolyse <i>post mortem</i> .....	58
2.5. La cuisson.....	59
3. <u>Génération de peptides au cours des procédés technologiques</u> .....	60
3.1. La maturation ou l'entreposage dans la glace .....	60
3.2. La cuisson.....	61

## **ETUDE EXPERIMENTALE..... 62**

### **INTRODUCTION ..... 62**

#### **I. MISES AU POINT METHODOLOGIQUES..... 64**

1. <u>Extraction des peptides</u> .....	64
1.1. Principe.....	64
1.2. Choix de l'agent précipitant .....	65
2. <u>Séparation des peptides par RP-HPLC</u> .....	66
2.1. Principe.....	66
2.2. Choix de la colonne .....	66
3. <u>Caractérisation et identification des peptides par spectrométrie de masse</u> .....	67
3.1. Principe général .....	67

3.2. MALDI-ToF .....	67
3.2.1. Principe.....	67
3.2.2. Optimisation des conditions d'analyse.....	68
3.3. Nano-ESI-IT MS/MS et nano-HPLC-ESI-IT MS/MS .....	69
3.3.1. Principe.....	69
3.3.2. Optimisation des conditions d'analyse .....	70
3.4. HPLC-ESI-Q-ToF .....	70
3.4.1. Principe.....	70
3.4.2. Optimisation des conditions d'analyse .....	71
<b>II. <u>ETUDE DES PEPTIDES DANS L'ALIMENT</u> .....</b>	<b>73</b>
<u>Introduction</u> .....	73
<u>Principaux résultats</u> .....	74
<u>Résultats complémentaires</u> .....	74
<u>Publication n°1</u> .....	77
<u>Publication n°2</u> .....	85
<u>Discussion générale</u> .....	95
<b>III. <u>ETUDE DES PEPTIDES D'ORIGINE ALIMENTAIRE GENERES PAR LA DIGESTION DES PROTEINES DE LA TRUITE ET DE LA VIANDE BOVINE ...</u> 97</b>	
<u>Introduction</u> .....	97
<u>Principaux résultats</u> .....	98
<u>Résultats complémentaires</u> .....	99
<u>Publication n°3</u> .....	101
<u>Publication n°4</u> .....	111
<u>Discussion générale</u> .....	123
<b>IV. <u>ETUDE DE L'ABSORPTION DES PEPTIDES</u>.....</b>	<b>126</b>
<u>Introduction</u> .....	126
<u>Principaux résultats</u> .....	127
<u>Publication n°5</u> .....	129
<u>Discussion générale</u> .....	142

---

<b>DISCUSSION FINALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>144</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>149</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>174</b>
<b><u>Annexe 1</u> : Nomenclature et formule chimique des acides aminés. ....</b>	<b>174</b>
<b><u>Annexe 2</u> : Liste des peptides alimentaires (&lt; 5 kDa) identifiés par nano-HPLC-ESI-IT MS/MS dans les digesta de porc (n = 4) collectés pendant les 3 premières heures après l'ingestion de chair de truite cuite ou de viande bovine cuite (faux-filet, paleron ou pectoral profond). ....</b>	<b>176</b>
<b><u>Annexe 3</u> : Liste des peptides endogènes (&lt; 5 kDa) identifiés par nano-HPLC-ESI-IT MS/MS dans les contenus intestinaux d'un porc équipé de deux canules, duodénale et jéjunale, collectés pendant les 3 premières heures après l'ingestion de l'aliment sans protéines. ....</b>	<b>179</b>

---

---

# **INTRODUCTION GENERALE**

---

---

La viande et le poisson représentent une source privilégiée de protéines dans l'alimentation humaine. En effet, par leur abondance dans les aliments sources, leur équilibre en acides aminés indispensables et leur forte digestibilité, ces protéines ont une haute valeur nutritionnelle. Toutefois, l'intérêt nutritionnel des protéines alimentaires ne se limite probablement pas à un simple apport d'acides aminés. En effet, il a été montré, avec le lait par exemple, que certains peptides issus de l'hydrolyse des protéines possèdent des activités biologiques intéressantes pour la santé humaine pouvant se manifester à différents niveaux de l'organisme : le tube digestif (régulateur du transit), le système immunitaire (immuno-stimulants), le système nerveux central (avec impact comportemental) ou encore le système cardiovasculaire (antihypertenseurs, antithrombotiques). Depuis une vingtaine d'années, la recherche de peptides à activité biologique ou peptides bioactifs d'origine alimentaire suscite un intérêt croissant en raison de leurs effets éventuels sur la santé et le bien-être. Cependant, pour l'instant, elle s'est encore peu intéressée à la viande et au poisson, peut-être parce que les filières industrielles concernées n'ont pas développé l'extraction et le fractionnement de leurs protéines comme cela l'a été pour les produits laitiers, favorisant ainsi leur pénétration dans l'industrie des aliments fonctionnels et des compléments ou suppléments alimentaires. Pourtant, la viande et le poisson pourraient aussi constituer des sources alimentaires non négligeables en peptides bioactifs du fait de leur contribution à l'apport protéique quotidien dans le cadre de l'alimentation actuelle. Cette fonction potentielle dépend de l'existence de ces composés dans le muscle ou de leur production par les processus de transformation du muscle en aliments et/ou de la digestion des protéines. L'évaluation de cette potentialité repose donc sur la recherche de ces peptides et l'étude de leur devenir à ces différents stades de l'utilisation des aliments carnés. Pour pouvoir exprimer leur éventuelle activité, ces composés doivent être présents en quantités suffisantes et persistantes sur les sites de leur action, c'est-à-dire dans le tractus digestif ou dans le sang pour être transportés sur des cibles plus éloignées. C'est sur ce raisonnement qu'est bâti le travail de recherche de cette thèse qui vise à évaluer le potentiel d'aliments tels que la viande et le poisson à être des sources de peptides bioactifs.

Cette notion de peptide bioactif sera développée dans la première partie de ce travail qui en décrira les multiples aspects. Après un point sur les connaissances actuelles concernant leurs nombreux effets physiologiques caractéristiques, la diversité des composés impliqués et les sources alimentaires éventuelles seront présentées. Ensuite, l'importance centrale des phénomènes digestifs, que ce soient l'hydrolyse enzymatique des

protéines alimentaires, l'absorption intestinale des peptides et leur devenir après absorption, sera détaillée pour expliquer l'organisation du travail expérimental.

Ce travail expérimental sera développé en 3 parties. La première étudiera les oligopeptides du muscle de truite et de bovin puis leur évolution lors de sa transformation en aliment prêt à être consommé. La seconde sera centrée sur l'étude de la production de peptides dans la lumière intestinale lors de la digestion gastrique, pancréatique et intestinale des protéines alimentaires. La troisième examinera les possibilités d'absorption de ces peptides d'origine alimentaire.

---

---

# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

---



## **I. LES PEPTIDES BIOACTIFS**

Le terme de "peptide bioactif" fut mentionné pour la première fois en 1950 par Mellander qui observa que des peptides phosphorylés, issus de caséine, favorisaient la fixation de calcium par l'os chez des enfants rachitiques. Puis, en 1979, Zioudrou et al. ont mis en évidence une activité opioïde dans un hydrolysate de gluten. Depuis une vingtaine d'années, l'étude des peptides bioactifs, appelés aussi peptides fonctionnels, suscite un intérêt croissant dans le domaine de la recherche en nutrition humaine en raison de leurs effets potentiellement bénéfiques pour la santé humaine. En effet, de nombreux peptides bioactifs ont été découverts dans des hydrolysats de protéines de lait, d'œuf, de poisson ou de céréales ayant des effets sur le système digestif, le système immunitaire, le système cardiovasculaire ou le système nerveux central. Ces peptides qui sont inclus au sein des protéines alimentaires, correspondent à des séquences de 2 à 20 acides aminés (à quelques exceptions près, par exemple le caséinomacropéptide). Dans le cadre de cette thèse, à ces peptides obtenus par l'hydrolyse des protéines alimentaires, seront adjoints aussi, sous le même vocable de peptides bioactifs, des peptides pré-formés et abondants dans le substrat alimentaire originel dont la synthèse n'emprunte pas les voies habituelles de la synthèse et de la dégradation des protéines (transcription, traduction, protéolyse) mais susceptibles d'agir aussi sur diverses fonctions physiologiques ; ce sont par exemple pour les viandes et produits carnés, le glutathion ou les dipeptides de l'histidine. Ces peptides, d'origine protéinique ou non présentent un fort potentiel d'application dans le secteur des aliments fonctionnels et des nutraceutiques en raison de leurs effets physiologiques variés pouvant contribuer à améliorer la santé des individus.

Après une description des principaux effets physiologiques attribués à ces peptides bioactifs, les mécanismes à l'origine de leur production seront présentés.

### **1. Les effets physiologiques**

#### **1.1. Effet sur le système digestif**

Avant d'être hydrolysés en acides aminés, les peptides alimentaires peuvent agir sur des fonctions importantes dans le tractus gastro-intestinal, notamment sur la régulation de la digestion (transit et sécrétions) et la modulation de l'absorption des nutriments dans le

tractus gastro-intestinal (Shimizu, 2004). Cela a été particulièrement mis en évidence avec des peptides issus de protéines du lait ou du soja.

#### 1.1.1. Régulation de la digestion

L'implication possible de peptides alimentaires dans la régulation de la digestion a surtout été suggérée par leur effet sur la stimulation de la sécrétion de cholécystokinine (CCK), hormone gastro-intestinale qui a de multiples fonctions, et notamment dans cette régulation (stimulation de la sécrétion pancréatique et biliaire, inhibition de la sécrétion gastrique). En effet, des hydrolysats enzymatiques (pepsiques le plus souvent) de caséine, d'ovalbumine, de soja, de viande, de gluten peuvent stimuler la sécrétion de CCK par un intestin de rat en perfusion (Cuber et al., 1990 ; Beucher et al., 1994), par des cellules intestinales isolées (Nishi et al., 2001) ou par des cellules intestinales tumorales (Némoz-Gaillard et al., 1998), ce qui démontre un effet direct de certains composés de ces hydrolysats. Plusieurs d'entre eux ont été identifiés. Dans la caséine, il s'agit du caséinomacropéptide (CMP) de la caséine  $\kappa$  ou de peptides qui en dérivent (Beucher et al., 1994). L'implication du CMP dans la sécrétion de CCK a été confirmée par le fait que comme la CCK, il stimule la sécrétion pancréatique (Ledoux-Rolf Pedersen et al., 2000) et que des antagonistes de la CCK annulent l'effet satiétogène de la CCK induit par un pré-repas de caséine (Froetschel et al., 2001). Dans l'hydrolysat de protéines de soja, il pourrait s'agir du fragment 51-63 de la  $\beta$ -conglycinine VRIRLLQRFNKRS qui présente une forte affinité pour la bordure en brosse des cellules intestinales, stimule la sécrétion de CCK dont la concentration portale augmente, et provoque les mêmes effets que cette hormone sur la consommation alimentaire, effets annulés par l'administration d'un antagoniste de la CCK chez le rat (Nishi et al., 2003). Un effet similaire a été rapporté pour le peptide RIY issu la napine, une protéine de réserve majeure de la graine de colza (Marczak et al., 2006). D'autres effets du CMP sur la physiologie digestive, notamment le blocage de la stimulation de la sécrétion acide dans l'estomac, ont été rapportés (pour revue, voir Yvon et al., 1994).

D'autres peptides peuvent aussi être impliqués dans la régulation des phénomènes digestifs. L'intervention possible de peptides alimentaires ayant une activité opioïde sur la vidange stomacale et le transit digestif a été démontrée chez le rat. Il s'agit notamment de peptides provenant des caséines  $\alpha_{S1}$  et  $\beta$ , les casomorphines. En effet, une part du retard de l'évacuation gastrique de la caséine par rapport aux protéines de lactosérum était abolie par un traitement à la naloxone qui bloque les récepteurs opioïdes. De plus, dans ce cas, le

**Tableau 1** : Séquence primaire de caséinophosphopeptides (CPPs) issus de caséine bovine (d'après Silva et Malcata, 2005).

<b>Caséine</b>	<b>Fragment</b>	<b>Séquence</b>
Caséine $\alpha_{S1}$	43-58	DIGSESTEDQAMEDIK
	45-55	GSESTEDQAME
	59-79	QMEAESISSSEEIVPNSVEQK
	66-74	SSSEEIVPN
	106-119	VPQLEIVPNSAEER
Caséine $\alpha_{S2}$	2-21	NTMEHVSSEESIISQETYK
	46-70	NANEEEEYSIGSSSEESAEVATEEVK
	55-75	GSSSEESAEVATEEVKITVDD
	126-136	EQLSTSEENSK
	138-149	TVDMESTEVFTK
Caséine $\beta$	1-25	RELEELNVPGEIVESLSSSEESITR
	1-28	RELEELNVPGEIVESLSSSEESITRINK
	2-28	ELEELNVPGEIVESLSSSEESITRINK

ralentissement du transit à travers le tractus gastro-intestinal observé avec la caséine était complètement supprimé (Daniel et al., 1990). En outre, la sécrétion de mucus peut être stimulée par un hydrolysate de caséine. Dans ce dernier cas, cela pourrait s'expliquer par la présence de  $\beta$ -casomorphine 7, issue de la caséine  $\beta$  qui a un effet encore plus marqué. Cet effet n'est cependant pas spécifique car il est observé aussi avec un hydrolysate de lactalbumine. En revanche, des hydrolysats de protéines d'œuf ou de viande étaient sans effet (Claustre et al., 2002).

### 1.1.2. Modulation de l'absorption des nutriments

C'est cette propriété qui est en partie à l'origine du concept de peptide bioactif à la suite de la mise en évidence par Mellander en 1950 de l'effet bénéfique de phosphopeptides de la caséine sur la fixation de calcium par l'os chez des enfants rachitiques. Ces caséinophosphopeptides (CPPs) ont la propriété de fixer le calcium du lait (Sato et al., 1986). En évitant la précipitation des ions calcium sous forme de phosphates de calcium insolubles et en les maintenant sous forme soluble, ces phosphopeptides facilitent l'absorption intestinale de calcium (Li et al., 1989 ; Erba et al., 2001). Toutefois, leur efficacité a été récemment remise en question, le taux d'absorption d'un supplément calcique sous forme de lactate n'étant pas amélioré par l'ingestion simultanée de 380 mg de CPPs (Teucher et al., 2006). Les CPPs agissent également sur la fixation d'autres ions tels que le fer, le zinc, le magnésium (FitzGerald, 1998). Ainsi, le fragment 1-25 de la caséine  $\beta$ , en fixant le fer, favorise son absorption digestive (Pérès et al., 1997) probablement par endocytose (Pérès et al., 1999).

Ces peptides ont été mis en évidence à la fois *in vitro* à partir de l'hydrolyse trypsique ou chymotrypsique de caséine bovine (Sato et al., 1991) ou de l'hydrolyse de caséinate de sodium par différentes enzymes commerciales d'origine bactérienne, fongique, végétale et animale (McDonagh et FitzGerald, 1998) et *in vivo* à partir de l'hydrolyse des caséines  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$  et  $\beta$  par les enzymes du tractus gastro-intestinal (Smacchi et Gobetti, 2000). Des CPPs ont été détectés dans l'estomac et le duodénum après ingestion de lait chez l'homme (Chabance et al., 1998) ainsi que dans l'iléon chez des personnes iléostomisées après l'ingestion de lait et de CPPs (Meisel et al., 2003). Ce dernier résultat montre que les CPPs sont relativement résistants à la dégradation par les enzymes gastro-intestinales et qu'ils peuvent atteindre la partie distale de l'iléon.

Malgré leur différence de taille et de composition en acides aminés, la plupart des CPPs (**Tableau 1**) partagent un motif commun constitué de 3 résidus phosphosérine suivis

de 2 résidus d'acide glutamique, S<sup>(P)</sup>S<sup>(P)</sup>S<sup>(P)</sup>EE. Environ 30% des ions phosphate du lait sont fixés au niveau des résidus sérine des caséines. Les chaînes latérales des CPPs chargées négativement, en particulier au niveau des groupements phosphate, représentent des sites de fixation pour les minéraux (Meisel, 1998). En effet, les CPPs déphosphorylés ne fixent plus de minéraux tandis que la phosphorylation de CPPs déphosphorylés restaure leur capacité à fixer des minéraux (Ferraretto et al., 2003). De plus, la capacité des CPPs à fixer des minéraux, en particulier le calcium, est différente et dépend notamment des acides aminés présents de part et d'autres des sites de fixation phosphorylés (FitzGerald, 1998).

Une autre source de tels phosphopeptides est la phosvitine du jaune d'œuf (Jiang et Mine, 2001). Ces peptides fixent le calcium et favorisent son absorption (Choi et al., 2005). De façon comparable, un peptide de 1561 Da provenant d'un hydrolysat pepsique de résidus de filetage de hoki solubilise des quantités de calcium aussi importantes que les CPPs et en améliore la biodisponibilité. Sa séquence VLSGGTTMYASLYAE est similaire à celle d'un fragment d'actine (Jung et Kim, 2006).

## 1.2. Effet immunomodulateur

L'activité immunomodulatrice de peptides d'origine alimentaire, appréciée *in vitro* le plus souvent par leur effet sur les capacités de phagocytose et/ou de prolifération des cellules immunitaires, a été observée surtout avec des protéines de lait (Gill et al., 2000) mais aussi avec des protéines de soja (Yoshikawa et al., 2000). Ainsi, Migliore-Samour et al. (1989) ont observé que le fragment TTMPLW (194-199) de caséine  $\alpha_{S1}$  et les fragments YQQPVLGPVR (193-202), PGPIP (63-68) et LLY (191-193) de caséine  $\beta$  pouvaient stimuler la phagocytose des hématies de mouton par des macrophages murins. Le fragment 193-209 de la caséine  $\beta$  (qui contient le peptide anti-hypertensif 193-202), est capable de stimuler la prolifération de lymphocytes de rat *in vitro* (Coste et al., 1992). En revanche, le fragment YPFPGPI (60-66) de la caséine  $\beta$ , appelé  $\beta$ -casomorphine 7, inhibe *in vitro* la prolifération de lymphocytes humains dérivés de la *lamina propria*, cet effet antiprolifératif étant supprimé par la naloxone, un antagoniste des récepteurs des opioïdes (Elitsur et Luk, 1991). Le dipeptide YG, issu de l' $\alpha$ -lactalbumine (18-19/50-51) et de la caséine  $\kappa$  (38-39), et le tripeptide YGG, provenant de l' $\alpha$ -lactalbumine (18-20), augmentent significativement la prolifération des lymphocytes du sang périphérique humain *in vitro* (Kayser et Meisel, 1996). Le CMP, issu de la caséine  $\kappa$  (106-169), peut également agir sur la réponse immunitaire puisqu'il inhibe *in vitro* la réponse cellulaire suite à l'activation du

système immunitaire par les lipopolysaccharides (LPS) ou la phytohémagglutinine (PHA) (Otani et al., 1995). Les séquences TTMLPW 194-199 de la caséine  $\alpha_{S1}$ , PGPIP 63-68 et LLY 191-193 de la caséine  $\beta$ , et GLF 51-53 de l' $\alpha$ -lactalbumine sont capables d'accroître la résistance des souris à une infection par *Klebsiella pneumoniae* (Migliore-Samour et al., 1989 ; Fiat et al., 1993). Il a été montré récemment que l'administration orale de peptides issus de protéines de poisson fermenté à des souris stimulait l'immunité non spécifique associée à l'intestin sans état inflammatoire (Duarte et al., 2006).

Le mécanisme moléculaire par lequel les peptides dérivés du lait exercent des effets immunomodulateurs reste à ce jour encore inconnu. Cependant, les résultats obtenus avec les lymphocytes humains (Elitsur et Luk, 1991 ; Kayser et Meisel, 1996) suggèrent que les peptides opioïdes, tels que le  $\beta$ -casomorphine 7, puissent affecter l'immunoréactivité des lymphocytes par l'intermédiaire de leur récepteur aux opioïdes. En effet, il semble exister une relation étroite entre le système immunitaire et les peptides opioïdes puisque des récepteurs opioïdes de type  $\mu$  pour les endorphines sont présents sur les lymphocytes (Elitsur et Luk, 1991). La réponse de macrophages médullaires murins au peptide 193-209 de la caséine  $\beta$  se manifeste par une augmentation de leur sécrétion de TNF- $\alpha$ , et d'interleukines 6 et 12 (Sandré et al., 2001).

### 1.3. Effet antimicrobien

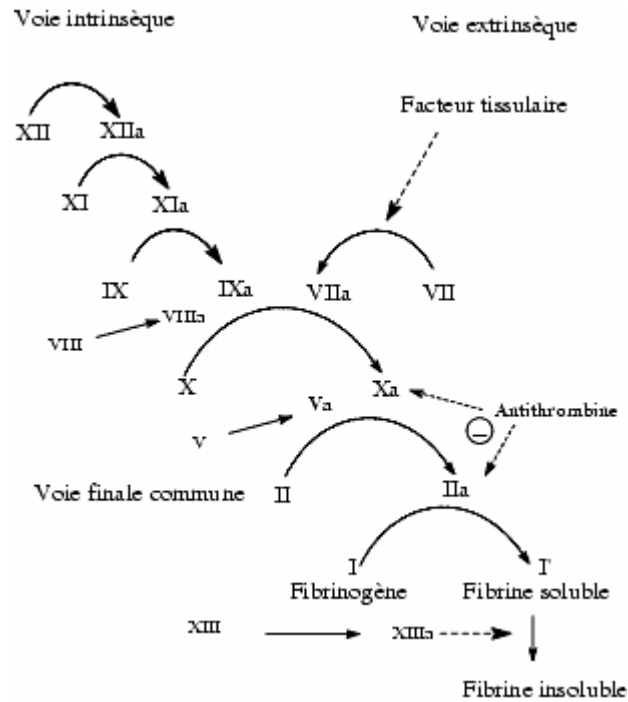
Des peptides antimicrobiens ont été identifiés dans de nombreux hydrolysats de protéines laitières (Clare et al., 2003 ; Pellegrini, 2003 ; Gobbetti et al., 2004). Les plus étudiés sont les lactoferricines dérivées de lactoferrines bovine et humaine (Wakabayashi et al., 2003). Certains fragments de la caséine  $\kappa$  ou encore des fragments issus de la caséine  $\alpha$  possèdent également ce type d'activité.

Les lactoferricines possèdent une activité bactéricide résultant d'une interaction directe des peptides (notamment les séquences 17-41 ou 20-30 de la lactoferrine bovine) avec la membrane bactérienne. Elles possèdent une activité d'inhibition de la croissance de nombreuses souches bactériennes telles que les bactéries à gram + et gram - mais aussi certaines levures et champignons (Tomita et al., 1994). Ces propriétés semblent être corrélées à la charge nette positive de ces peptides qui pourrait éliminer les microorganismes sensibles par augmentation de la perméabilité membranaire.

Le CMP est également capable *in vitro* d'inhiber l'adhésion d'agents pathogènes (actinomycètes, streptocoques) aux entérocytes (Neeser et al., 1988). Il inhibe la fixation de la toxine du choléra à son récepteur (Kawasaki et al., 1992).

**Figure 1 :** Les principales voies de la coagulation sanguine.

La coagulation comporte une cascade de réactions enzymatiques impliquant les facteurs de la coagulation. L'étape finale est la transformation du fibrinogène soluble en filaments de fibrine par la thrombine. La coagulation met en jeu deux voies, l'une intrinsèque, l'autre extrinsèque, aboutissant à une voie finale commune. La voie intrinsèque comporte les facteurs présents dans la circulation et la voie extrinsèque, les facteurs tissulaires non présents normalement dans la circulation mais qui sont libérés lors d'une lésion vasculaire.



La casocidine I, fragment 165-203 de la caséine  $\alpha_{S2}$  libéré sous l'action de la chymosine, inhibe la croissance de *Escherichia coli* et de *Staphylococcus carnosus* (Zucht et al., 1995). L'isracidine, segment N-terminal 1-23 de la caséine  $\alpha_{S1}$ , protège les souris contre *Staphylococcus aureus* (Lahov et Regelson, 1996).

Des peptides antimicrobiens ont aussi été trouvés dans des hydrolysats d'autres protéines alimentaires. Ainsi récemment, il a été montré la présence de 5 peptides présentant des activités antimicrobiennes dans un hydrolysat pepsique d'hémoglobine bovine, trois d'entre eux correspondant aux séquences 107-141, 137-141 et 133-141 de la chaîne  $\alpha$  et le quatrième à la séquence 126-145 de la chaîne  $\beta$  (Nedjar-Arroume et al., 2006).

#### 1.4. Effet sur le système cardiovasculaire

##### 1.4.1. Effet antithrombotique

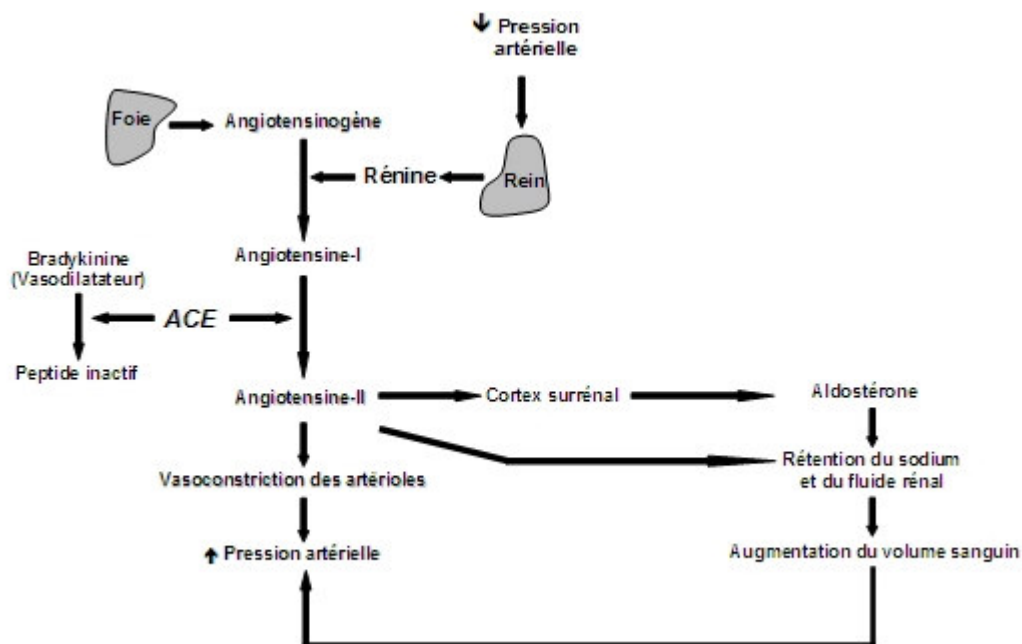
Au cours de la coagulation sanguine, le fibrinogène joue un rôle particulièrement important (**Figure 1**). En effet, cette molécule, après s'être fixée sur son récepteur plaquettaire, induit l'agrégation des plaquettes. Des homologies structurales entre certaines séquences peptidiques de la caséine  $\kappa$  et le dodécapeptide C-terminal HHLGGAKQAGDV (400-411) de la chaîne  $\gamma$  du fibrinogène ont été observées. Ces ressemblances sont à l'origine d'une compétition vis-à-vis des récepteurs glycoprotéiques entre ces peptides et le fibrinogène, ce qui confère à ces peptides une activité de type antithrombotique (Jollès et al., 1986).

Les principaux peptides antithrombotiques connus sont les fragments MAIPPKNQDK (106-116), MAIPPKK (106-112), NQDK (113-116) (Jollès et al., 1986) et KNQDK (112-116) (Léonil et Mollé, 1990) de la caséine  $\kappa$  et le fragment KRDS (39-42) de la lactotransferrine humaine (Raha et al., 1988 ; Drouet et al., 1990). Ce type d'effet a été évalué *in vitro*, en étudiant l'agrégation plaquettaire humaine (Jollès et al., 1986 ; Léonil et Mollé, 1990) mais également *in vivo* chez le rat et le cobaye où l'inhibition de la formation du thrombus provoqué par lésion endothéliale des vaisseaux sanguins a été observée après administration du peptide KRDS (Drouet et al., 1990). Une étude chez l'homme a révélé qu'à la suite de l'ingestion de lait ou de yaourt, les peptides de la caséine  $\kappa$  qui inhibent l'agrégation plaquettaire et la formation du thrombus (le CMP et les séquences 106-116 et 113-116), étaient retrouvées dans l'estomac, l'intestin et même dans le sang pour le CMP (Chabance et al., 1998).



**Figure 2** : Rôle de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) dans le contrôle de la pression artérielle.

La vasoconstriction des artères est sous la dépendance d'un système impliquant les reins, le sang et les glandes surrénales par l'intermédiaire de la rénine, l'angiotensine et l'aldostérone. Lors d'une chute de la pression artérielle, la rénine est sécrétée par les reins. Elle active alors la transformation de l'angiotensinogène, d'origine hépatique, en angiotensine-I. Sous l'action de l'ACE (angiotensin converting enzyme), une métalloprotéase endothéliale, l'angiotensine-I (décapeptide) est hydrolysée en angiotensine-II. Cet octapeptide est un puissant vasoconstricteur des artérioles qui induit alors une augmentation de la pression artérielle. Cet effet est amplifié par la synthèse d'aldostérone qui provoque une rétention des fluides et du sodium par les reins. D'autre part, l'ACE hydrolyse la bradykinine, un nonapeptide vasodilatateur, et libère un heptapeptide inactif. Cette double action de l'ACE sur l'angiotensine-I et la bradykinine lui confère donc un rôle très important dans le contrôle de la pression artérielle.



#### 1.4.2. Effet antihypertenseur

Les peptides à effet antihypertenseur agissent en inhibant l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). L'hydrolyse de l'angiotensine par l'enzyme de conversion dans le plasma représente une étape clé dans le système rénine-angiotensine et dans la cascade d'événements biochimiques aboutissant à la vasoconstriction responsable de la montée rapide de la tension artérielle (**Figure 2**). Les premiers peptides possédant une action inhibitrice vis-à-vis de l'ACE ont été identifiés pour la première fois dans le venin d'un serpent brésilien (Ondetti et al., 1971). Depuis, de nombreux peptides inhibiteurs de l'ACE ont été découverts dans des hydrolysats de diverses protéines alimentaires (Yamamoto, 1997 ; FitzGerald et Meisel, 2000 ; Rutherford-Markwick et Moughan, 2005 ; Vercruyse et al, 2005).

Les principaux peptides sont issus de l'hydrolyse enzymatique de la caséine  $\alpha_{S1}$  bovine (Maruyama et Suzuki, 1982 ; Maruyama et al., 1987), de la caséine  $\beta$  bovine (Maruyama et al., 1985; Yamamoto et al., 1994), de caséine  $\beta$  humaine (Kohmura et al., 1989) et de protéines musculaires (Vercruyse et al., 2005). L'activité antihypertensive de ces peptides a été mise en évidence *in vivo* chez un modèle de rats rendus hypertendus ou rats SHR (*Spontaneously hypertensive rats*) (Karakaki et al., 1990 ; Maeno et al., 1996). L'ingestion de lait fermenté riche en deux peptides ayant une activité anti-hypertensive (VVP séquence 84-86 de la caséine  $\beta$ , et IPP séquence 74-76 ou 108-110 des caséines  $\beta$  et  $\kappa$ , respectivement) par des rats SHR, s'accompagne d'une baisse de la pression artérielle systolique et de l'activité de l'ACE. De plus, ces peptides ont été retrouvés dans l'aorte (Masuda et al., 1996) des rats hypertendus mais pas chez les témoins. Une étude menée chez l'homme a montré une baisse significative de la pression artérielle par rapport à un groupe témoin, suite à l'ingestion répétée de lait fermenté qui contenait les peptides anti-hypertenseur VPP et IPP (Hata et al., 1996 ; Seppo et al., 2003).

Des peptides à activité antihypertensive ont également été isolés à partir d'autres protéines alimentaires d'origine animale telles que celles de muscle de porc (Arihara et al., 2001 ; Katayama et al., 2003) et de poulet (Fujita et al., 2000), de thon (Yokoyama et al., 1992 ; Matsumura et al., 1993), de sardine (Matsufuji et al., 1994), de saumon (Ono et al., 2003), à partir de gélatine de bœuf (Oshima et al., 1979 ; Kim et al., 2001), d'ovalbumine (Fujita et al., 1995), de gelée royale (Matsui et al., 2002), et aussi d'origine végétale, la zéine du maïs (Maruyama et al., 1989 ; Miyoshi et al., 1991), la rubisco de l'épinard (Yang et al., 2003) et de protéines de germe de blé (Matsui et al., 1999), de colza (Marczak et al., 2003), de sarrasin (Ma et al., 2006), de soja (Wu et Ding, 2001 ; Chen et al., 2004), de pois

chiche (Pedroche et al., 2002 ; Yust et al., 2003), de champignons (Choi et al., 2001 ; Lee et al., 2004), d'algue wakamé (*Undaria pinnatifida*) (Sato et al., 2002).

L'étude comparée des différents peptides inhibiteurs de l'ACE suggère que leur capacité à se lier à l'enzyme et à l'inhiber soit très dépendante de la séquence du tripeptide C terminal qui est riche en proline et en acides aminés à chaîne ramifiée, aromatique ou basique (FitzGerald et Meisel, 2000).

### 1.5. Effet sur le système nerveux

La mise en évidence d'effets semblables à ceux de peptides à activité opioïde, tels que les enképhalines et les endorphines sécrétés par le cerveau et l'hypophyse, a conduit à qualifier d'exorphines certains peptides d'origine alimentaire (Klee et al., 1978). Ces exorphines ont été mises en évidence dans des hydrolysats pepsiques de gluten de blé, de caséine  $\alpha$  (Zioudrou et al., 1979) et de caséine  $\beta$  (Brantl et al., 1979). Deux peptides présents dans l'hydrolysat de caséine  $\beta$  ont été séquencés par Henschen et al. (1979). Il s'agit de la  $\beta$ -casomorphine 7 TPFPGPI et de la  $\beta$ -casomorphine 5 TPFPG correspondant, respectivement, aux séquences 60-66 et 60-64 de cette protéine.

D'autres peptides opioïdes ont été trouvés au niveau de la séquence 90-96 de la caséine  $\alpha_{S1}$  bovine (Loukas et al., 1983) et de la séquence 41-44 de la caséine  $\beta$  humaine ( $\beta$ -casomorphines) (Yoshikawa et al., 1986). D'autres ont aussi été isolés à partir des protéines sériques. Il s'agit de la séquence 50-53 YLGF de l' $\alpha$ -lactalbumine humaine et bovine ou  $\alpha$ -lactorphine, de la séquence 102-105 YLLF de la  $\beta$ -lactoglobuline bovine ou  $\beta$ -lactorphine (Yoshikawa et al., 1986) et de la sérorphine, séquence 399-404 YGFNA de l'albumine sérique (Tani et al., 1994).

De façon générale, les peptides opioïdes dérivés des protéines alimentaires présentent une séquence N-terminale du type YXF ou YX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>F. Le résidu tyrosine en position N-terminale et la présence d'un autre acide aminé aromatique à la troisième ou quatrième position forment un motif structural particulier qui favorise leur interaction avec les récepteurs  $\mu$  du cerveau (Maubois et Léonil, 1989 ; Pihlanto-Leppälä, 2001). L'absence de ce groupement tyrosine conduit à une absence d'activité biologique (Chang et al., 1981).

Des activités antagonistes des opioïdes existent au sein de la caséine  $\kappa$  appelés les casoxines (casoxine A, résidus 35-41 YPSYGLNY, dérivés de la caséine  $\kappa$  bovine ; casoxine B, résidus 58-61 YPYY, chez le bovin et 31-34 chez l'homme ; casoxine C,

résidus 25-34 YIQYVLSR, de la caséine  $\kappa$  bovine ; Chiba et al., 1989) et de la lactoferrine humaine (lactoferroxines) (Tani et al., 1990).

#### 1.6. Autres effets

D'autres effets ont aussi été attribués à des peptides d'origine alimentaire. Ainsi, le décapeptide 91-100 de la caséine  $\alpha_{S1}$  (YLGYLEQLLR) qui se fixe sur un récepteur aux benzodiazépines et qui présente des effets anxiolytiques chez le rat (Miclo et al., 2001) et améliore la qualité du sommeil chez cet animal soumis à un stress modéré chronique (Guesdon et al., 2006), pourrait aussi atténuer les effets d'un stress sur la pression artérielle et la cortisolémie chez l'homme (Messaoudi et al., 2005).

En outre, il a été suggéré que l'effet hypocholestérolémiant des protéines de soja résulte en partie de l'action d'un peptide de 24 acides aminés de la  $\beta$ -conglycinine sur les récepteurs des LDL (Lovati et al., 2000). De plus, une partie des effets anti-athéromateux des protéines de soja observés chez la souris pourrait être due à un peptide de la fraction  $\beta$ -conglycinine des protéines de soja (Adams et al., 2004) et n'impliquerait pas les récepteurs des LDL.

Récemment, une activité antiproliférative de peptides issus d'hydrolysats de protéines de poisson a été observée *in vitro* sur des cellules humaines cancéreuses du sein (Picot et al., 2006).

L'ensemble des séquences des peptides bioactifs d'origine protéinique est répertorié dans la base de données BioPep (Dziuba et al., 1999) accessible sur le site <http://www.uwm.edu.pl/biochemia>.

#### 1.7. Quelques éléments sur les aspects quantitatifs

La mise en évidence des activités biologiques des peptides bioactifs repose sur des approches très différentes selon l'activité, la cible et la nature de la substance testée, si bien qu'il est souvent difficile de savoir quelle est la dose de peptide, et encore plus la quantité d'aliment source à consommer pour observer l'effet *in vivo*.

Cependant, cela paraît possible dans le cas de l'effet inhibiteur de l'ACE. Ainsi, une première estimation du potentiel d'inhibition du peptide peut être fournie par l'IC<sub>50</sub> (concentration nécessaire pour obtenir 50% de l'inhibition). Ce paramètre est très variable selon les peptides des protéines laitières, de 3 à 2349  $\mu$ moles/L (FitzGerald et Meisel, 2000). Il permet donc de comparer leur activité potentielle. Comme il est de 3 et

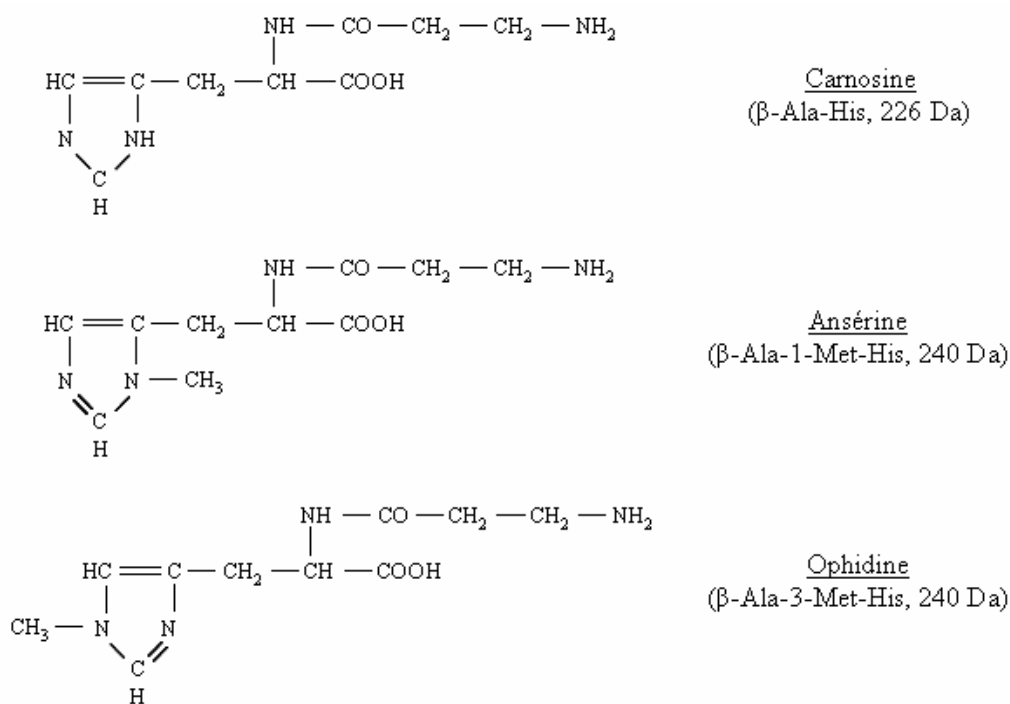
5  $\mu$ moles/L pour les séquences IPP et VPP respectivement, c'est elles qui seraient principalement responsables de l'effet anti-hypertensif observé après ingestion quotidienne de 150 mL de lait fermenté apportant, entre autres, 2,25 et 3 mg de ces 2 peptides respectivement (Seppo et al., 2003).

L'amélioration de l'assimilation de certains cations par les phosphopeptides fournit un autre exemple. L'ingestion quotidienne de caséinophosphopeptides sous la forme de 30 mg d'un hydrolysate de caséine  $\beta$  ou du peptide 1-25 de la caséine  $\beta$  enrichis en fer a été plus efficace pour améliorer le statut en fer de rats anémiés qu'un supplément de sulfate ferreux apportant la même quantité de fer (Aït-oukhatar et al., 1997). De plus, une étude isotopique chez la femme a montré que si le taux d'absorption d'une dose de 3 mg de fer n'était pas différent selon qu'elle était sous forme d'ascorbate de fer ou de fer complexé à 42 mg du peptide 1-25 de la caséine  $\beta$ , ce fer était présent en quantité plus importante dans le foie, la rate et la moelle osseuse 7 jours plus tard lorsqu'il était apporté avec le peptide (Aït-oukhatar et al., 1999).

Enfin, le troisième exemple concerne l'effet anxiolytique d'un hydrolysate de caséine  $\alpha_{S1}$ . La dose du peptide 91-101 de la caséine  $\alpha_{S1}$  ( $\alpha$ -casozépine) qui présente des effets anxiolytiques était de 0,4 mg/kg par voie intrapéritonéale chez le rat (Miclo et al., 2001). L'ingestion quotidienne de 15 mg/kg d'un hydrolysate tryptique de caséine  $\alpha_{S1}$  qui apportait au maximum (sur la base du rapport molaire) 0,7 mg/kg d' $\alpha$ -casozépine mais aussi d'autres peptides opioïdes, améliorait la qualité du sommeil chez le rat soumis à un stress chronique (Guesdon et al., 2006). Chez l'homme, l'ingestion de 1200 mg de hydrolysate tryptique de caséine  $\alpha_{S1}$  en 3 prises sur 1,5 jours atténuait les effets d'un stress sur la pression artérielle et le cortisol plasmatique (Messaoudi et al., 2005). Cette dose d'hydrolysate correspondait d'une part à 60 mg (au maximum) d' $\alpha$ -casozépine auxquels étaient associés d'autres peptides éventuellement actifs et d'autre part, à la consommation d'environ 120 g de lait.

Ces 3 exemples montrent qu'il est possible de trouver dans les protéines d'une alimentation équilibrée des sources de peptides bioactifs. Toutefois, il peut être difficile de déterminer quels sont les composés actifs lorsqu'ils sont apportés par une protéine ou un hydrolysate.

**Figure 3** : Formules chimiques de la carnosine, l'ansérine et l'ophidine.



**Tableau 2** : Concentration (mg /100 g de muscle) en carnosine, ansérine et ophidine dans le muscle de diverses espèces animales.

Animal	Muscle	Carnosine	Ansérine	Ophidine
Boeuf <sup>b</sup>	Jarret	396	77,6	-
	Coeur	22,6	-	-
Mouton <sup>b</sup>	Gigot	190	252	3
Porc <sup>a</sup>	Jambon	449,5	22,9	36,3
	Collier	186,4	10,7	16,6
Poulet <sup>b</sup>	Blanc	400	1037	-
	Cuisse	124	334	-
Truite <sup>b</sup>	-	-	51,6	-
Saumon <sup>b</sup>	-	-	1020	-
Chat <sup>b</sup>	-	228	293	-
Chien <sup>b</sup>	-	746	1474	-
Baleine <sup>b</sup>	-	-	-	1080
Homme <sup>c</sup>	<i>Vastus lateralis</i>	153,6	n.d.	n.d.

<sup>a</sup> Aristoy et Toldrá (2004) ; <sup>b</sup> Chan et Decker (1994) ; <sup>c</sup> Harris et al. (2006).  
n.d. : donnée non disponible

## 2. Peptides endogènes non protéiniques dans le muscle

Dans les aliments, il existe des peptides d'origine non protéinique qui sont synthétisés par des mécanismes spécifiques à chacun d'entre eux et qui présentent d'autres caractéristiques susceptibles d'interagir avec la physiologie lorsqu'ils sont ingérés en quantités suffisantes. C'est le cas de la viande qui reçoit du muscle originel des dipeptides dérivés de l'histidine tels que la carnosine et l'ansérine, et un tripeptide, le glutathion.

### 2.1. Les dipeptides de l'histidine

La carnosine ( $\beta$ -Ala-His), l'ansérine ( $\beta$ -Ala-1-méthyl-His) sont des dipeptides de l'histidine présents en abondance dans le muscle squelettique de différentes espèces animales. Avec l'ophidine ou la balénine ( $\beta$ -Ala-3-méthyl-His) (**Figure 3**), ils peuvent être présents aussi dans d'autres tissus tels que le cerveau, le cœur, la peau, le foie (Crush, 1970 ; Boldyrev et Severin, 1990 ; Chan et al., 1994). Les concentrations en carnosine et ansérine sont les plus élevées dans le muscle squelettique, en particulier dans les muscles à métabolisme glycolytique (Aristoy et Toldrá, 1998 ; Cornet et Bousset, 1999) ; elles peuvent également varier selon l'espèce animale (Crush, 1970), l'âge (Carnegie et al., 1982 ; Chan et Decker, 1994) et/ou l'alimentation (Chan et Decker, 1994 ; Chan et al., 1994). En effet, une carence alimentaire en histidine réduit la concentration en carnosine dans le muscle et l'ajout de 5% d'histidine au repas augmente la concentration en carnosine dans le muscle de 2,8 fois chez le rat (Chan et Decker, 1994). De même, la concentration en carnosine du muscle squelettique soleus chez le rat est augmentée de 5 fois après 8 semaines d'un régime supplémenté par 1,8% de carnosine (Maynard et al., 2001). Chez l'homme, une augmentation de 66% de la concentration en carnosine dans le muscle a également été observée après 4 semaines d'une supplémentation journalière de 13 g (Harris et al., 2006).

Le contenu en dipeptides de l'histidine dans le muscle de diverses espèces animales est répertorié dans le **Tableau 2**. Les concentrations en carnosine de différents muscles de bovin sont présentées dans le **Tableau 3**.

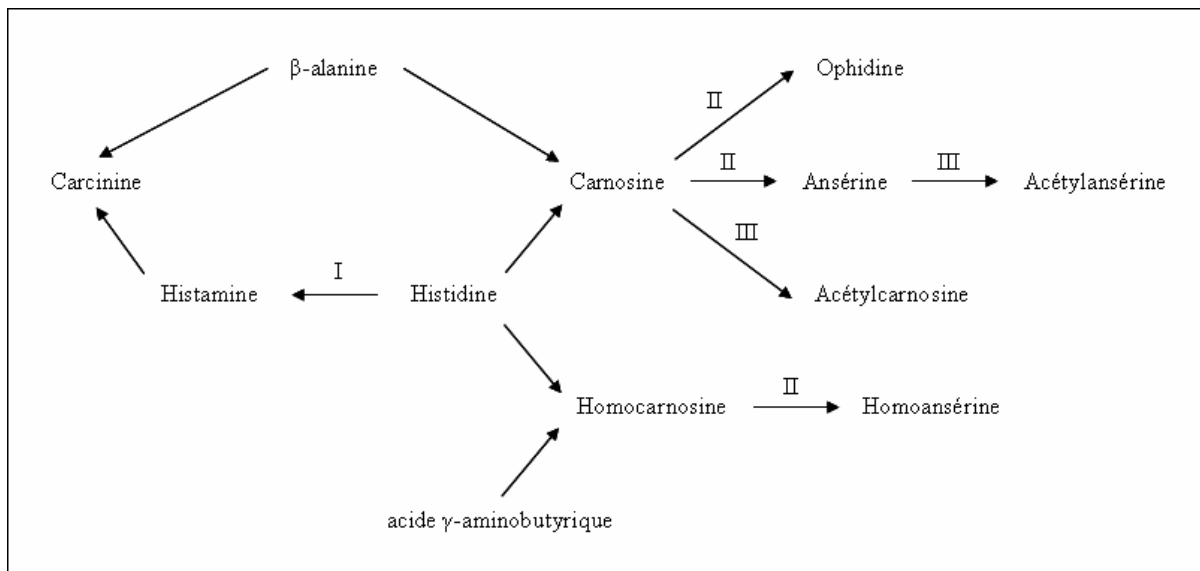
#### 2.1.1. Les activités biologiques des dipeptides de l'histidine

Ces peptides ont diverses activités biologiques. La principale paraît être le maintien du pH intracellulaire grâce à leur pouvoir tampon afin de neutraliser, par exemple, la production d'acide lactique dans les muscles où la glycolyse anaérobie est particulièrement

**Tableau 3** : Concentration (mg/100 g de muscle) en carnosine dans différents muscles de bovin.

Muscle	Carnosine	Référence
Faux-filet	520	Rao et al. (1989)
	373	Aristoy et Toldrá (2004)
	449	Watanabe et al. (2004)
	433	Purchas et Busboom (2005)
Rond de gîte	490	Purchas et al. (2004)
Paleron	250	Rao et al. (1989)
	299	Purchas et Busboom (2005)
Collier	253	Aristoy et Toldrá (2004)
Steak haché (25% de matières grasses)	124	Park et al. (2005)

**Figure 4** : Métabolisme des dipeptides de l'histidine (d'après Boldyrev et Severin, 1990).



I : Décarboxylation ; II : Méthylation ; III : Acétylation



active (Davey, 1960 ; Harris et al., 1990 ; Abe, 2000 ; Decker, 2001 ; Suzuki et al., 2006). Ils présentent des propriétés antioxydantes par leur capacité à fixer des ions métalliques éventuellement pro-oxydants (Kohen et al., 1988 ; Guitto et al., 2006) tels que le cuivre, le zinc, le cobalt, le vanadium et le fer (Baran, 2000), en inhibant la peroxydation des lipides membranaires (Boldyrev et al., 1987 ; Chan et Decker, 1994 ; Gopalakrishnan et al., 1999 ; Nagasawa et al., 2001). Ils auraient aussi un rôle prépondérant dans la protection contre la glycation des protéines par les aldéhydes et les produits terminaux des glycations (Hipkiss, 1998). Ils peuvent exercer une action de neurotransmetteur, décrite notamment pour la carnosine dans le bulbe olfactif (Snyder, 1980 ; Bonfanti et al., 1999), ainsi qu'une action vasodilatatrice (Ririe et al., 2000). Ils peuvent également réguler l'activité de certaines d'enzymes telles que des aminopeptidases, des phosphorylases et des calpaïnes (Johnson et al., 1982 ; Johnson et Hammer, 1989 ; Gianelli et al., 2000).

#### 2.1.2. Le métabolisme des dipeptides de l'histidine

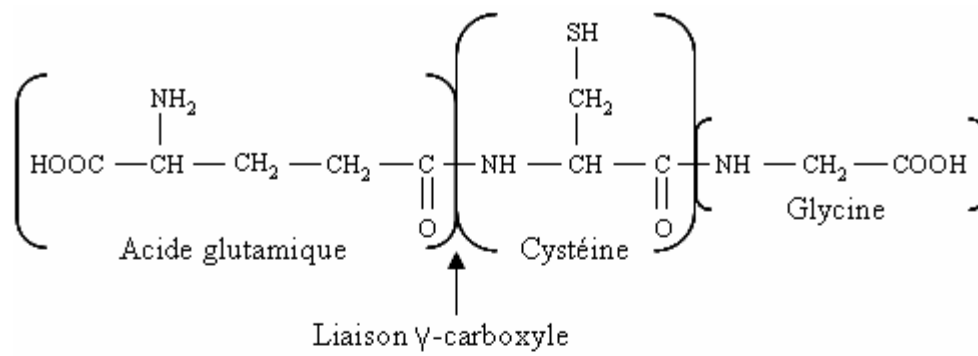
Le métabolisme des dipeptides de l'histidine est illustré dans la **Figure 4**. Dans le muscle squelettique, la carnosine est synthétisée à partir de la  $\beta$ -alanine (acide aminé non usuel absent des protéines et provenant essentiellement du catabolisme des bases pyrimidiques) et de l'histidine (acide aminé indispensable) par une enzyme spécifique, la carnosine synthétase (EC 6.3.2.11). La méthylation de la carnosine en position 1 ou 3 de l'histidine produit l'ansérine et l'ophidine, respectivement ; l'homocarnosine est synthétisée à partir de l'histidine et de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique dans le tissu nerveux.

En raison de la position spécifique du groupement aminé de la  $\beta$ -alanine, la carnosine et l'ansérine ne sont pas dégradées par des dipeptides hydrolases (EC 3.4.13). Leur hydrolyse est catalysée par deux enzymes spécifiques appelées aminoacyl-histidine dipeptidases ou carnosinases. Une est présente en grande quantité dans de nombreux tissus tels que le rein, le foie et les poumons et en plus faible quantité dans le muscle squelettique et l'intestin grêle (EC 3.4.13.3) (Lenney, 1976), et une autre est présente spécifiquement dans le sérum (EC 3.4.13.20) (Jackson et al., 1991).

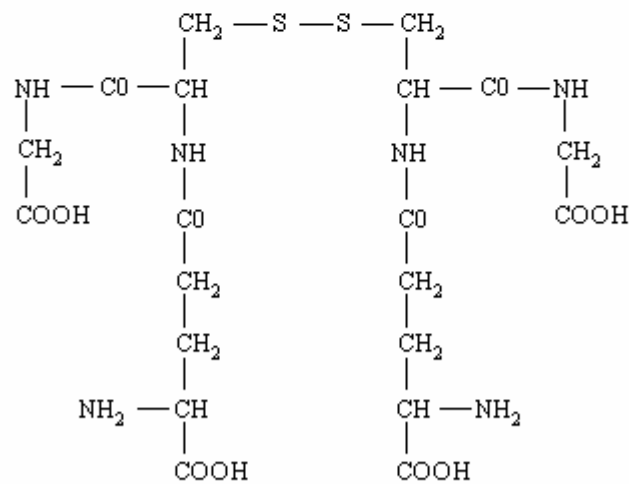
#### 2.2. Le glutathion

Le glutathion (GSH :  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) (**Figure 5**) est un tripeptide ubiquitaire dont la majeure partie est présente dans le muscle squelettique (Mårtensson et Meister, 1989), et c'est le thiol intracellulaire de faible poids moléculaire le plus abondant, compris entre 0,2 et 10 mM (Anderson, 1998). Il possède une liaison peptidique particulière  $\gamma$ -carboxyle

**Figure 5** : Formule chimique du glutathion réduit (GSH) et oxydé (GSSG).



Glutathion réduit (GSH)  
 (γ-Glu-Cys-Gly, 307 Da)



Glutathion oxydé (GSSG)  
 (613 Da)

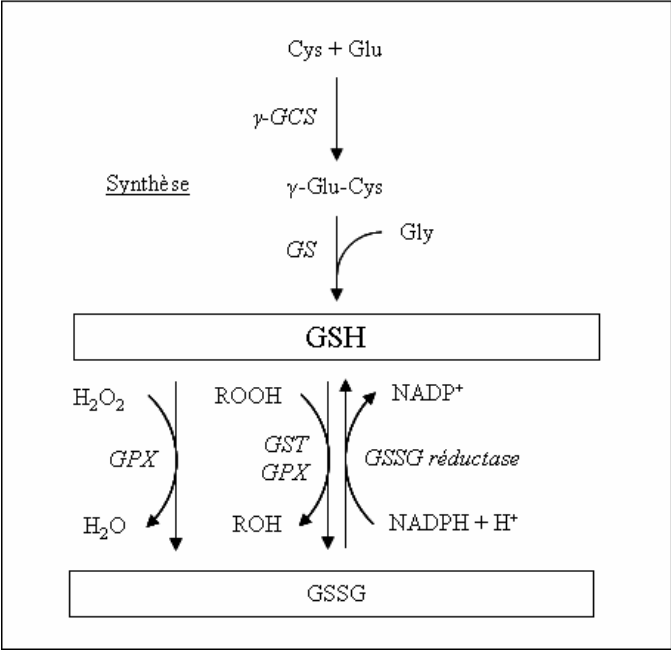
entre le glutamate et la cystéine, ce qui lui confère une grande stabilité. Par la fonction thiol du radical de la cystéine, le glutathion peut exister sous une forme réduite (GSH) ou sous une forme oxydée (GSSG) dans laquelle deux molécules de glutathion sont liées par un pont disulfure (**Figure 5**), ces deux formes étant en équilibre l'une avec l'autre dans un état physiologique normal. Ces deux molécules constituent ainsi un couple d'oxydo-réduction où le glutathion sert de coenzyme transporteur d'hydrogène destiné principalement à maintenir les protéines à l'état réduit. La forme biologiquement active du glutathion est sa forme réduite qui contient le résidu cystéine porteur d'un groupement thiol hautement réactif et résistant à l'oxydation spontanée. De nombreuses activités biologiques importantes du glutathion pour la cellule ont été mises en évidence (Deneke et al., 1985 ; Beutler, 1989).

### 2.2.1. Les activités biologiques du glutathion

Le glutathion est impliqué dans la synthèse de l'ADN et des protéines (Kan et al., 1988 ; Suthanthiran et al., 1990), ainsi que dans la synthèse des leucotriènes qui sont des médiateurs importants de l'inflammation (Rouzer et al., 1982). Le glutathion maintient également la réduction du groupement sulfhydryl de nombreuses protéines, groupement nécessaire à leur fonction (Gérard-Monnier et Chaudière, 1996). Il est utilisé comme réserve de cystéine lors d'une sous-nutrition (Cho et al., 1981) et représente la source majeure de cystéine pour les lymphocytes. En effet, l'activité normale des lymphocytes est dépendante de l'apport cellulaire de cet acide aminé (Dröge et al., 1986). Le glutathion joue également un rôle important dans la protection cellulaire contre les attaques toxiques (Deneke et al., 1985 ; Beutler, 1989). Il participe à la détoxification des métabolites électrophiles des xénobiotiques.

Enfin, le glutathion est le principal antioxydant hydrosoluble des cellules. Il piège efficacement les radicaux libres, protégeant ainsi les cellules des dommages liés aux espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Beutler, 1989). Les changements de concentrations en GSH et GSSG reflètent directement les altérations de leur potentiel redox. Il maintient l'équilibre redox intracellulaire et les antioxydants non-enzymatiques (thiols et vitamines) sous leur forme biologiquement active réduite, il régule l'expression et/ou l'activation de facteurs de transcription sensibles à l'oxydation et nécessaires au fonctionnement de la réponse antioxydante, il exerce un effet cytoprotecteur en neutralisant les métabolites du stress oxydant à l'aide de ses propriétés réductrices et en servant de coenzyme à la glutathion S-transférase (GST) et la glutathion peroxydase (GPX).

**Figure 6** : Métabolisme du glutathion (d'après Anderson, 1998).



### 2.2.2. Le métabolisme du glutathion

Le GSH est synthétisé par l'action séquentielle de deux enzymes cytosoliques (**Figure 6**) : la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase ( $\gamma$ -GCS) catalyse la formation de la  $\gamma$ -glutamylcystéine à partir de la cystéine et de l'acide glutamique puis la glutathion synthétase (GS) synthétise le GSH par liaison de la glycine à la  $\gamma$ -glutamylcystéine (Anderson, 1998 ; Meister, 1988). Le GSH peut être converti en GSSG par la glutathion peroxydase (GPX) qui catalyse la réduction du  $H_2O_2$  ou d'autres peroxydes (ROOH). La glutathion S-transférase (GST) catalyse la conjugaison du glutathion avec divers composés indésirables qui sont ensuite éliminés par la bile et l'urine. Pour maintenir l'équilibre redox cellulaire, le GSSG est réduit en GSH par la GSSG réductase, avec comme cofacteur le NADPH, formant ainsi un cycle redox.

### 3. Multifonctionnalité des peptides

Quelle que soit leur origine, les peptides bioactifs correspondent à une multiplicité de composés, qui de ce fait sont susceptibles d'agir sur de multiples fonctions. De plus, un même peptide peut avoir plusieurs effets. C'est particulièrement le cas des peptides de l'histidine ou du glutathion mais c'est aussi constaté pour des peptides provenant des protéines alimentaires. Ainsi, la  $\beta$ -casomorphine 7 qui a une activité opioïde, a également des propriétés immuno-modulatrices et peut inhiber l'ACE. Souvent, ces peptides ont des séquences qui se recouvrent partiellement et proviennent de zones qui échappent en partie à la protéolyse en raison de la structure primaire de la protéine.

### 4. Modes de production et sources

Certains peptides bioactifs peuvent être naturellement présents dans l'aliment mais la plupart sont issus de protéines. Inactifs au sein de leur protéine précurseur, ils doivent être libérés par protéolyse pour devenir fonctionnels. Ces peptides peuvent être produits directement dans l'aliment par l'action de protéases endogènes au cours de différents procédés technologiques de transformation de l'aliment, tels que la fermentation, la maturation de la viande et la cuisson, mais ils peuvent être également générés *in vitro* par l'utilisation de protéases exogènes. Néanmoins, la majorité des peptides bioactifs sont principalement formés au cours de la digestion au sein de l'organisme. De plus, toute source protéique alimentaire est susceptible d'apporter des peptides bioactifs. En dehors du

lait et des produits laitiers, qui ont été les plus étudiés, des peptides bioactifs ont pu être isolés à partir d'hydrolysats de protéines d'œuf, de poisson, de céréales et de soja notamment.

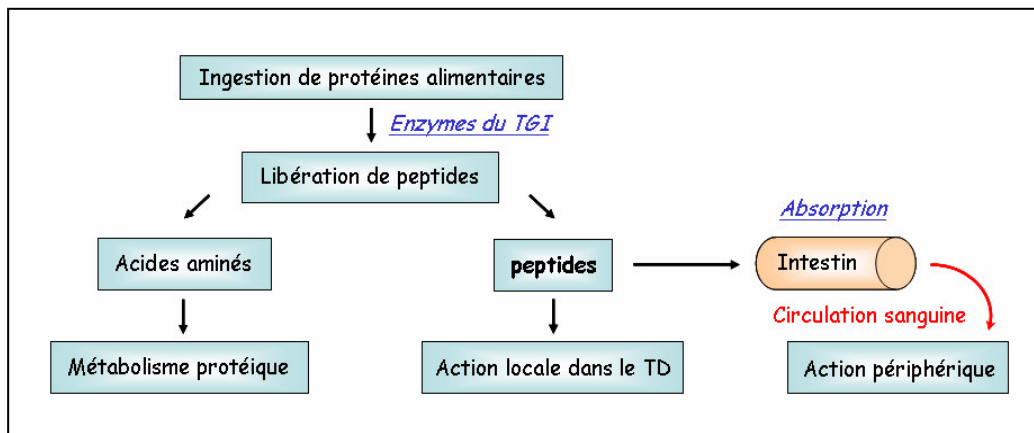
#### 4.1. Action des protéases fermentaires

La présence de diverses protéases dans l'aliment permet la formation de peptides bioactifs dans certains aliments transformés. A côté des procédés de maturation de la viande et de la cuisson qui seront développés par la suite, des peptides bioactifs ont été mis en évidence dans des aliments fermentés. Le processus de fermentation implique généralement des enzymes issues de microorganismes. C'est le cas notamment de la fermentation du lait par des bactéries lactiques qui produit divers peptides bioactifs ayant des activités antihypertensives (Yamamoto et al., 1994; Nakamura et al., 1995 ;Belem et al., 1999), immunomodulatrices (Matar et al., 1996 ; Gill et al., 2000) et antimicrobiennes (Gobetti et al., 2004). Des peptides à activité antihypertensive ont été mis en évidence dans des aliments fermentés japonais tels que l'alcool de riz (saké), la pâte de soja où la séquence peptidique antihypertensive est HHL, dans la sauce de soja où le peptide inhibiteur de l'ACE identifié est la nicotianamine (un dérivé peptidique non protéinique des plantes), et des activités antihypertensives ont été également détectées dans la sauce de poisson, les graines de soja et le tofu (Yamamoto et al., 2003). Récemment, des peptides ayant une activité immunomodulatrice ont été mis en évidence dans des protéines de poisson fermenté : après administration orale chez des souris, une augmentation de l'immunité non spécifique intestinale a été observée en l'absence d'état inflammatoire (Duarte et al., 2006).

#### 4.2. Action des protéases ajoutées

L'hydrolyse enzymatique contrôlée reste la méthode la plus couramment utilisée pour produire des peptides bioactifs. Plusieurs ont été produits par protéolyse *in vitro* à l'aide d'enzymes du tractus gastro-intestinal, principalement la pepsine et la trypsine. Par exemple, les peptides inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) et les phosphopeptides fixant du calcium (CPPs) sont produits principalement par la trypsine (Meisel et FitzGerald, 2003 ; Yamamoto et al., 2003 ; FitzGerald et al., 2004; Gobetti et al., 2004 ; Vermeirssen et al., 2004). D'autres enzymes digestives et différentes combinaisons d'enzymes protéolytiques, telles que l'alcalase, la chymotrypsine, la pancréatine et la pepsine ainsi que des enzymes d'origine bactériennes et fongiques, ont

**Figure 7** : Digestion et absorption des protéines alimentaires.



TGI : Tractus gastro-intestinal ; TD : Tube digestif

également été utilisées pour générer des peptides bioactifs à partir de protéines diverses (Kilara et Panyam, 2003 ; Korhonen et Pihlanto, 2003). Différents peptides bioactifs ont été mis en évidence dans des hydrolysats ainsi obtenus à partir de protéines d'œuf, de poisson, de céréales, de soja, de pois chiche, de gélatine, de gelée royale, d'algue wakamé, d'épinard, dans le muscle de porc et de poulet.

#### 4.3. Hydrolyse digestive

Au cours de la digestion, les protéines alimentaires, suite à leur ingestion, sont soumises à une hydrolyse enzymatique au sein du tractus gastro-intestinal (**Figure 7**). Les peptides libérés peuvent à leur tour être hydrolysés en acides aminés, et participer au métabolisme protéique. Mais certains peuvent résister à l'hydrolyse et sont capables d'exercer un effet soit localement dans le tube digestif, soit à distance dans l'organisme, après être passés dans le système circulatoire.

## **II. PRODUCTION DE PEPTIDES AU COURS DE L'HYDROLYSE DIGESTIVE**

Une des principales fonctions de l'appareil digestif est de réduire les macromolécules des aliments en composés de taille plus faible et plus hydrophiles de façon à en permettre l'assimilation. Ainsi, les protéines alimentaires sont dégradées par les enzymes protéolytiques en peptides et en acides aminés qui peuvent être absorbés. La digestion est donc par essence une étape majeure de la production de peptides alimentaires. L'hydrolyse des protéines débute dans l'estomac et se poursuit au niveau de l'intestin. Plusieurs facteurs peuvent influencer l'efficacité de la digestion. L'acidité stomacale, la vidange gastrique, le taux de sécrétion des différentes enzymes digestives, le pH de l'intestin grêle, la durée du transit intestinal et la flore microbienne sont des exemples de ces facteurs. D'autre part, certaines caractéristiques des protéines alimentaires peuvent aussi influencer leur hydrolyse gastro-intestinale telles leur composition en acides aminés, leur séquence primaire et leur conformation. De plus, les sécrétions digestives peuvent être à l'origine d'un flux luminal de peptides endogènes.



## 1. La digestion buccale

La bouche a un rôle limité dans la digestion des protéines et donc dans la production de peptides alimentaires. Toutefois, les glandes salivaires et la muqueuse buccale sécrètent une grande variété de protéines (mucoprotéines, enzymes, immunoglobulines, lysozyme, lactoferrine, défensines, inhibiteurs de protéases, etc) (Vitorino et al., 2004 ; Hardt et al., 2005 ; Hu et al., 2005) et de peptides (cytokines, facteurs de croissance, glutathion, etc) dont les proportions relatives varient en fonction de la nature de l'aliment (Neyraud et al., 2006), l'état physiopathologique et le cycle nyctéméral (Humphrey et Williamson, 2001).

## 2. La digestion gastrique

La dégradation des protéines alimentaires débute réellement dans l'estomac où la sécrétion d'acide chlorhydrique (HCl) par les cellules pariétales, stimulée par la gastrine, provoque leur dénaturation, ce qui favorise l'exposition des liaisons peptidiques aux protéases gastriques. Les pepsines (A et C), endoprotéases à aspartate sécrétées par la muqueuse gastrique sous forme de pepsinogènes, sont activées par l'acidité de l'estomac et autolyse. Elles hydrolysent préférentiellement les liaisons peptidiques situées à l'intérieur de la chaîne polypeptidique impliquant des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine ou tryptophane) ou la leucine. Elles fragmentent les protéines en polypeptides de tailles variées. Ainsi, de nombreux peptides issus de la dégradation des caséines ont été identifiés dans les contenus gastriques après ingestion de lait ou de yaourt (Chabance et al., 1998). Ces protéases gastriques peuvent hydrolyser partiellement un très grand nombre de protéines alimentaires, y compris le collagène, permettant ainsi de les solubiliser (Sato et al., 1998 ; Galea et al., 2000). La spécificité de l'hydrolyse pepsique a été décrite par Kageyama et al. (2002).

L'efficacité de la digestion gastrique des protéines alimentaires est variable. Elle dépend de la nature de la protéine ingérée et des facteurs qui conditionnent l'action des protéases gastriques tels que le pH gastrique, la nature des autres composés du chyme et la vitesse d'évacuation gastrique. Une proportion variable, mais mal connue, des protéines alimentaires (5-80% selon leur nature) est transformée en composés solubles correspondant à des peptides de taille variée, les acides aminés libres étant peu abondants (Rérat et al.,

1976 ; Scanff et al., 1990). Une fraction apparemment importante de ces peptides est de taille réduite car ils sont solubles dans l'acide trichloracétique (TCA) 10% (0,6 M) mais le manque de données au niveau stomacal ne permet pas de la connaître précisément. Deux études anciennes permettent d'en avoir un ordre de grandeur chez le porc. En effet, cette fraction soluble représente 36% de l'azote alimentaire ayant quitté l'estomac en 12 h chez des porcs ayant ingéré des protéines de soja et de blé (Zebrowska et al., 1982). De plus, 3 heures après un repas à base de maïs et de soja, environ un quart des composés hydrosolubles des contenus gastriques (soit 20% de l'azote total) avait une masse molaire comprise entre 2 et 5 kDa, un quart entre 5 et 7 kDa et un quart entre 7 et 10 kDa (Asche et al., 1989).

### 3. La digestion intestinale

La digestion intestinale continue la production luminale de peptides d'origine alimentaire par une hydrolyse plus complète des polypeptides et protéines alimentaires entrant dans l'intestin. L'arrivée dans le duodénum du chyme gastrique acide stimule la sécrétion d'une hormone intestinale, la sécrétine. Cette hormone stimule à son tour la sécrétion pancréatique de bicarbonate qui neutralise le chyme gastrique. Cette neutralisation permet d'inhiber l'action de la pepsine qui subit une dénaturation irréversible à pH 6-7 (Konno et al., 2000).

#### 3.1. Hydrolyse par les enzymes pancréatiques

La digestion des protéines se poursuit ensuite au niveau de la lumière intestinale sous l'action de cinq enzymes protéolytiques synthétisées et sécrétées par les cellules acineuses du pancréas sous forme de zymogènes inactifs : le trypsinogène, le chymotrypsinogène, la proélastase et les procarboxypeptidases A et B. En milieu légèrement alcalin (pH 7,6-8,2), le trypsinogène est activé en trypsine par l'entérokinase, enzyme de la muqueuse intestinale. La trypsine, à son tour, active le chymotrypsinogène, la proélastase et les procarboxypeptidases respectivement en chymotrypsine, élastase et carboxypeptidases. La trypsine est l'enzyme la plus abondante, représentant 20% des protéines pancréatiques. Cette endopeptidase scinde la liaison peptidique au voisinage des acides aminés hydrophiles, notamment la lysine et l'arginine. La chymotrypsine agit au niveau d'un acide aminé aromatique (phénylalanine, tyrosine) ou volumineux (tryptophane, leucine, méthionine). L'action de l'élastase se situe au niveau des acides aminés neutres

**Tableau 4** : Spécificité des principales peptidases de la membrane de la bordure en brosse de l'intestin (d'après Langguth et al, 1997).

Enzyme	Substrat
Aminopeptidase N (EC 3.4.11.2)	AA neutres en position N-terminale
Aminopeptidase A (EC 3.4.11.7)	AA anioniques (Glu, Asp) en position N-terminale
Aminopeptidase P (EC 3.4.11.9)	Hydrolyse la liaison X-Pro en position N-terminale
Aminopeptidase W (EC 3.4.11.-)	Hydrolyse la liaison X-Trp en position N-terminale
Dipeptidyl aminopeptidase IV (EC 3.4.14.5)	Libère les dipeptides X-Pro ou X-Ala en position N-terminale
$\gamma$ -glutamyltranspeptidase (EC 2.3.2.2)	Transfère le groupement $\gamma$ -Glu sur un AA ou un peptide en position N-terminale
Endopeptidase 24.11 (EC 3.4.24.11)	AA hydrophobes
Endopeptidase 24.18 (EC 3.4.24.18)	AA hydrophobes et aromatiques
Carboxypeptidase P (EC 3.4.17.-)	Hydrolyse les liaisons Pro-X, Ala-X, Gly-X en position C-terminale
Carboxypeptidase M (EC 3.4.17.12)	Lysine ou arginine en position C-terminale
ACE ou dipeptidyl carboxypeptidase (EC3.4.15.1)	Libère les dipeptides -Pro-X, -Phe-X, -Leu-X en position C-terminale

AA : acides aminés ; ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine

(alanine, glycine, sérine) (Schmitz et Triadou, 1982). La carboxypeptidase A coupe préférentiellement au niveau d'un acide aminé aromatique ou aliphatique et la carboxypeptidase B au niveau d'un acide aminé basique (arginine, lysine) à l'extrémité C-terminale (Langguth et al., 1997).

### 3.2. Hydrolyse par les peptidases intestinales

L'action de ces enzymes est complétée par celle des peptidases liées à la bordure en brosse de l'intestin par l'intermédiaire de liaisons hydrophobes. De nombreuses aminopeptidases sont présentes à ce niveau, notamment les aminopeptidases N et A qui libèrent les acides aminés neutres et les acides aminés anioniques en position N-terminale, respectivement. Les aminopeptidases P et W hydrolysent les liaisons X-P- et X-W-, respectivement, en position N-terminale. La dipeptidyl aminopeptidase IV libère des dipeptides à partir de peptides ayant en avant-dernière position N-terminale un résidu proline ou alanine. La  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase catalyse le transfert du groupement  $\gamma$ -glutamyl du glutathion ou d'autres molécules sur un acide aminé ou un peptide en position N-terminale.

En plus de ces enzymes, la bordure en brosse de l'intestin contient également des endopeptidases et des carboxypeptidases. L'endopeptidase 24.11 ou enkephalinase, qui hydrolyse la liaison peptidique  $-G^3-F^4-$  de l'enképhaline, et les liaisons peptidiques au niveau d'un acide aminé hydrophobe. L'endopeptidase 24.18 ou néprilysine, qui a une activité équivalente à la chymotrypsine, hydrolyse les liaisons peptidiques au niveau d'un acide aminé hydrophobe ou aromatique. La carboxypeptidase P libère les acides aminés en position C-terminale lorsque une proline, mais aussi une alanine et une glycine, sont en avant dernière position. La carboxypeptidase M libère la lysine et l'arginine en position C-terminale. Enfin, l'ACE ou la dipeptidyl carboxypeptidase hydrolyse les dipeptides avec un résidu proline, phénylalanine ou leucine à l'extrémité C-terminale (Langguth et al., 1997 ; Ganapathy et Leibach, 1999).

La spécificité des principales peptidases de la membrane de la bordure en brosse de l'intestin est présentée au **Tableau 4**.

L'activité de ces systèmes enzymatiques est considérable et complète rapidement l'action des protéases gastriques. Ainsi, la part de l'azote peptidique (soluble dans l'éthanol 70% v/v) dans l'azote alimentaire qui transite dans le jéjunum proximal (20 cm après le ligament de Treitz) au cours des 2 heures qui suivent un repas est de 67% avec du lait et

**Tableau 5** : Composition et rôle de la salive.

Substance	Nature	Rôle
Mucine	Glycoprotéine	Lubrification
Ptyaline (amylase salivaire)	Enzyme	Digestion de l'amidon
Lipase linguale	Enzyme	Digestion des lipides
Lysozyme	Enzyme	Antibactérien
IgA	Protéine	Antibactérien et défense immunitaire
PRPs (protéines riches en proline)	Protéine	Protection et minéralisation de l'émail

**Tableau 6** : Composition et rôle du suc gastrique.

Substance	Nature	Rôle
Mucine	Glycoprotéine (75 kDa)	Lubrification
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Ion	Protection
HCl	Ion	Digestion des protéines
Facteur intrinsèque	Glycoprotéine (44 kDa)	Lier la vitamine B12
Pepsinogène	Enzyme (43 kDa)	Digestion des protéines
Lipase gastrique	Enzyme	Digestion des lipides
Gastrine	Hormone	Régulation de la sécrétion d'acide
Histamine	Hormone	Régulation de la sécrétion d'acide
Somatostatine	Hormone	Régulation de la sécrétion d'acide

65% avec du yaourt (Gaudichon et al., 1995). Elle est de 82%, 4 heures après un repas de caséine (Mahé et al., 1994). Toutefois, la présence dans la lumière intestinale de peptides spécifiques d'origine alimentaire présentant des propriétés particulières susceptibles de modifier certaines fonctions physiologiques n'a été rapportée que plus rarement et jamais quantifiée. Ce sont principalement :

- les exorphines détectées dans les contenus intestinaux chez l'homme (Svedberg et al., 1985) ou duodénaux chez le porc (Meisel, 1986) ;
- les caséinophosphopeptides retrouvés au niveau de l'estomac et du duodénum (Chabance et al., 1998) et de l'iléon chez l'homme (Meisel et al., 2003) ;
- les peptides à activité antithrombotique provenant des caséines  $\kappa$  ou  $\alpha_{S1}$  trouvés dans les contenus d'estomac ou du duodénum chez l'homme (Chabance et al., 1998) et chez le rat (Fosset et al., 2002) ;
- et enfin les autres fragments du CMP, susceptibles d'agir sur la régulation de la digestion, observés dans des contenus gastriques et intestinaux chez le rat après administration d'un repas enrichi en CMP (Fosset et al., 2002).

### 3.3. Rôle de la microflore intestinale

La microflore intestinale qui renferme environ 100 000 milliards de bactéries appartenant à plus de 400 espèces différentes (Bourlieux, 1998) constitue une biomasse très importante qui présente une activité de synthèse et de dégradation des protéines et peptides considérable. Alors qu'elle est quasi inexistante dans l'estomac ( $<10^3$  UFC/g), du fait d'un pH bas, et peu présente dans l'intestin grêle (duodénum  $10^3$ - $10^4$  UFC/g, jéjunum  $10^4$ - $10^6$  UFC/g, iléon  $10^6$ - $10^8$  UFC/g), la population bactérienne est très importante dans le côlon (de  $10^9$ - $10^{11}$  UFC/g). Du fait de sa localisation distale par rapport aux principaux sites de digestion des protéines alimentaires, on peut considérer que sa participation à la production de peptides bioactifs d'origine alimentaire est sans doute réduite dans la plupart des cas avec les protéines digestibles des aliments usuels mais cela doit être étudié pour des protéines moins digestibles.

### 3.4. Résistance à l'hydrolyse digestive

Les peptides contenant de la proline ou de l'hydroxyproline sont généralement plus résistants à l'hydrolyse par les enzymes digestives. De plus, les tripeptides contenant un groupement Proline-Proline en position C-terminale ont été décrits comme étant résistants aux peptidases spécifiques des prolines (Vanhoof et al., 1995 ; FitzGerald et Meisel, 2000).

**Tableau 7** : Les enzymes et les hormones contenues dans le suc pancréatique.

Substance	Nature	Rôle
Trypsinogène	Enzyme	Digestion des protéines
Chymotrypsinogène	Enzyme	Digestion des protéines
Proélastase	Enzyme	Digestion des protéines
Procarboxypeptidase A	Enzyme	Digestion des protéines
Procarboxypeptidase B	Enzyme	Digestion des protéines
Lipase pancréatique	Enzyme	Digestion des lipides
Phospholipase	Enzyme	Digestion des phospholipides
Cholestérol-ester-hydrolase	Enzyme	Digestion des esters de cholestérol
Amylase pancréatique	Enzyme	Digestion de l'amidon
Ribonucléase	Enzyme	Digestion de l'ARN
Désoxyribonucléase	Enzyme	Digestion de l'ADN
Sécrétine	Hormone (3 kDa)	Active la sécrétion de bicarbonate
Cholécystokinine	Hormone (13 kDa)	Stimule la sécrétion des enzymes pancréatiques
Glucagon	Hormone (21 kDa)	Hormone hyperglycémiant
Insuline	Hormone (12 kDa)	Hormone hypoglycémiant
GRP ( <i>Gastrin Releasing Peptide</i> )	Hormone (1 kDa)	Stimule la sécrétion de gastrine
Somatostatine	Hormone (12,7 kDa)	Inhibe la sécrétion d'insuline et de glucagon
Peptide YY	Hormone (4,3 kDa)	Active l'absorption d'eau et d'électrolytes
VIP ( <i>Vasoactive Intestinal Peptide</i> )	Hormone (19 kDa)	Active l'excrétion d'eau et d'électrolytes
Motiline	Hormone (12,8 kDa)	Active les mouvements péristaltiques de l'intestin

**Tableau 8** : Composition et rôle de la bile.

Substance	Nature	Rôle
Sels biliaires	Acide	Favorisent l'absorption des graisses
Phospholipides	Lipide	
Cholestérol	Lipide	
Bilirubine	Protéine	Pigment biliaire
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	ion	
Electrolytes	ion	

Ainsi, certains peptides, non digérés dans l'intestin, peuvent être soit absorbés intacts par l'entérocyte soit métabolisés par les microorganismes présents dans le côlon (Vermeirssen et al., 2004).

### 3.5. Peptides endogènes

La lumière intestinale contient également des protéines endogènes qui sont les enzymes et les glycoprotéines contenues dans la salive (**Tableau 5**), les sucs gastrique (**Tableau 6**), pancréatique (**Tableau 7**) et intestinal (35 g par jour) ainsi que les protéines de la bile (**Tableau 8**) (10 g par jour). La desquamation cellulaire due au renouvellement rapide de l'épithélium intestinal apporte également environ 30 g de protéines par jour. Ainsi, les protéines endogènes (20 à 50 g par jour) sont digérées de la même façon que les protéines ingérées (40 à 110 g par jour) et apportent ainsi des peptides endogènes qui peuvent être absorbés au niveau de la bordure en brosse de l'intestin en même temps que les peptides alimentaires. La microflore dans la partie distale de l'intestin surtout est aussi une source de peptides très divers dont les effets commencent aussi à être étudiés.

**Si les mécanismes de l'hydrolyse des protéines alimentaires par les enzymes gastriques, pancréatiques et intestinales sont bien décrits, la nature et les proportions des peptides qu'ils libèrent lors de la digestion *in vivo* de protéines alimentaires, sont beaucoup moins connues. Or, ce sont elles qui conditionnent l'activité potentielle de certains peptides au niveau du tractus digestif et aussi leur absorption, étape nécessaire pour leur permettre d'agir au niveau périphérique dans l'organisme.**

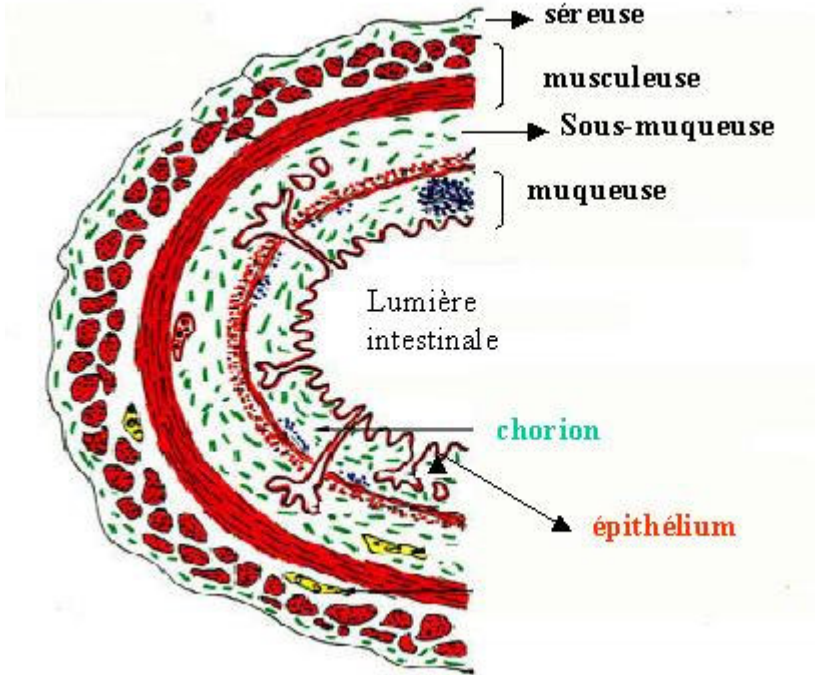
## **III. L'ABSORPTION DES PEPTIDES DANS L'INTESTIN GRELE**

L'absorption est ici définie comme le passage à travers la muqueuse intestinale, de la lumière digestive jusqu'à la circulation sanguine.

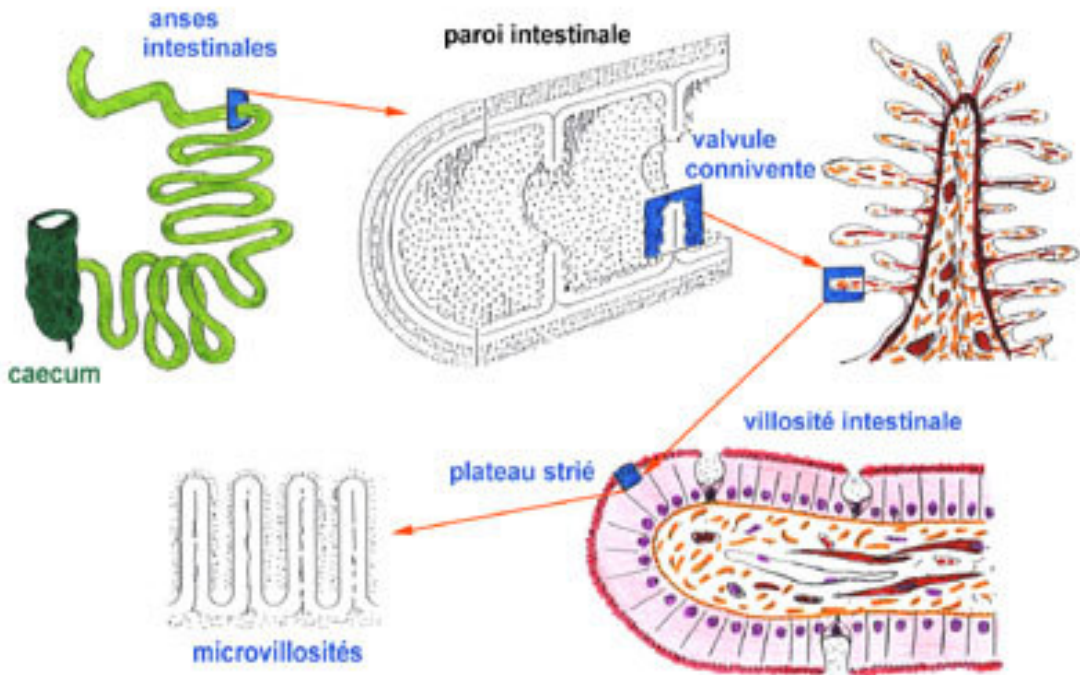
Un bref rappel de la structure de l'intestin grêle est présenté avant d'aborder les mécanismes d'absorption des peptides.



**Figure 8** : Anatomie de la paroi de l'intestin grêle.



**Figure 9** : Anatomie de la muqueuse intestinale.



## 1. L'intestin grêle

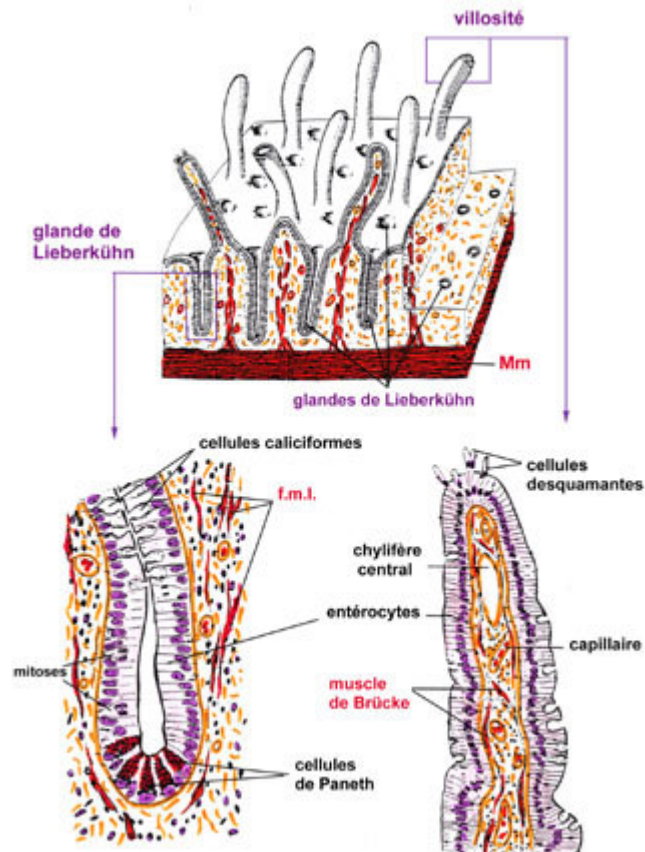
L'intestin grêle s'étend du pylore à la valvule iléocolique. Il est divisé en trois segments : un segment initial court, le duodénum, suivi par le jéjunum puis par le segment terminal qui est le plus long, l'iléon. Le jéjunum est considéré comme étant le siège principal de l'absorption intestinale des peptides.

La paroi de l'intestin grêle est constituée des quatre couches concentriques : la séreuse, la musculuse, la sous-muqueuse et la muqueuse (**Figure 8**). En contact avec la lumière intestinale, la muqueuse est constituée d'un épithélium de revêtement reposant sur un tissu conjonctif. Elle est parcourue de capillaires qui nourrissent l'épithélium et absorbent les nutriments résultant de la digestion.

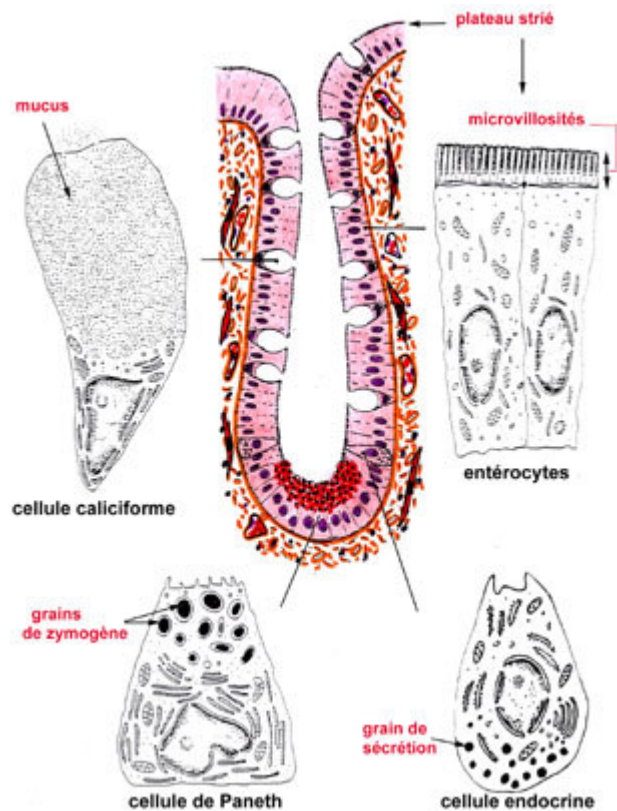
La structure de la muqueuse de l'intestin grêle (**Figure 9**) offre une surface considérable d'échange entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. La muqueuse intestinale est d'abord tapissée de nombreux replis transversaux et circulaires : les valvules conniventes. Ces valvules sont elles-mêmes tapissées de villosités, invaginations de la muqueuse intestinale dans la lumière de l'intestin, ce qui a pour effet d'augmenter de 40 à 60 fois la surface d'absorption de la muqueuse. Les villosités sont recouvertes par une seule couche de cellules épithéliales, appelée "plateau strié", dont les membranes de surfaces forment de petites projections appelées microvillosités. Ces microvillosités augmentent à leur tour la surface d'absorption de la muqueuse de 10 à 20 fois. On estime ainsi que la surface absorbante de l'intestin grêle humain peut atteindre environ 300 m<sup>2</sup>.

La villosité intestinale (**Figure 10**) est l'unité essentielle de l'absorption. En moyenne, elle est formée pour trois quarts par la villosité proprement dite et pour un quart par la crypte de Lieberkühn qui s'ouvre à la base de celle-ci et qui assure le renouvellement de l'épithélium. Les cellules germinatives situées dans la crypte vont progresser le long de la villosité, devenir matures puis atteindre le sommet et se détacher pour tomber dans la lumière intestinale. Chaque villosité comprend un épithélium de revêtement et un axe conjonctif, le chorion. L'épithélium comprend cinq types cellulaires (**Figure 11**) : des entérocytes, des cellules caliciformes, des cellules neuroendocrines, des cellules de Paneth et au niveau de l'iléon des cellules "M" appartenant au système immunitaire. Les entérocytes sont les cellules les plus nombreuses et sont responsables de la fonction d'absorption. Leur partie apicale, appelée bordure en brosse, est garnie de microvillosités (plus de 2000 par cellule). Les cellules caliciformes, au pôle apical large et au pôle basal étroit, sécrètent en continu un mucus qui protège l'épithélium contre les enzymes

**Figure 10** : Anatomie des villosités intestinales.



**Figure 11** : Types cellulaires de l'épithélium des villosités intestinales.



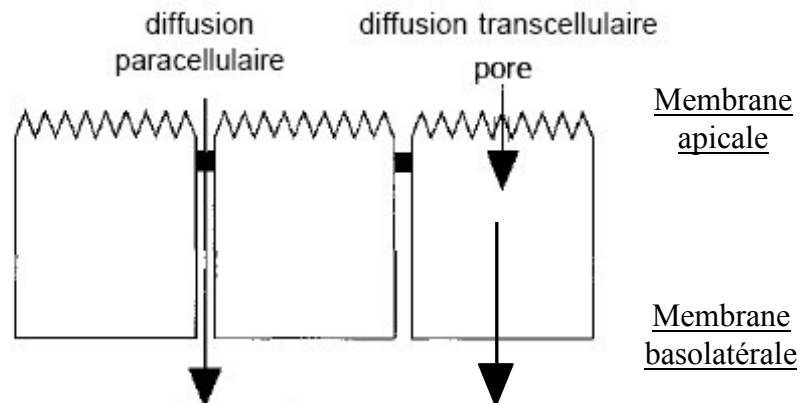
intraluminales. Les cellules neuroendocrines, disséminées sur la totalité de l'épithélium, sécrètent différentes substances telles que la gastrine, la somatostatine, la sécrétine, la cholécystokinine, le VIP (*Vasoactive Intestinal Peptide*), le GIP (*Gastric Inhibitory Peptide*). Les cellules de Paneth, localisées uniquement au niveau des cryptes de Lieberkühn, possèdent de volumineux grains de sécrétion au pôle apical. Elles possèdent également des capacités phagocytaires vis à vis de la microflore intestinale. Elles sécrètent du lysozyme intestinal et des défensines (peptides naturels à vocation d'antibiotiques). Les cellules de Paneth jouent donc un rôle évident dans les processus de défense et de bactériostase. Les cellules M, situées au niveau d'une zone particulière de l'épithélium intestinal de l'iléon appelée EAF ou épithélium associé aux follicules lymphoïdes, jouent un grand rôle dans le passage de l'information antigénique aux structures immunitaires sous-jacentes. Ces cellules dérivent des entérocytes ; elles sont dépourvues de lysosome et sont douées de propriétés d'endocytose. Elles sont ainsi capables de transporter des macromolécules ou des micro-organismes jusqu'au tissu lymphoïde sous-jacent sans dégradation.

## 2. L'absorption intestinale des peptides

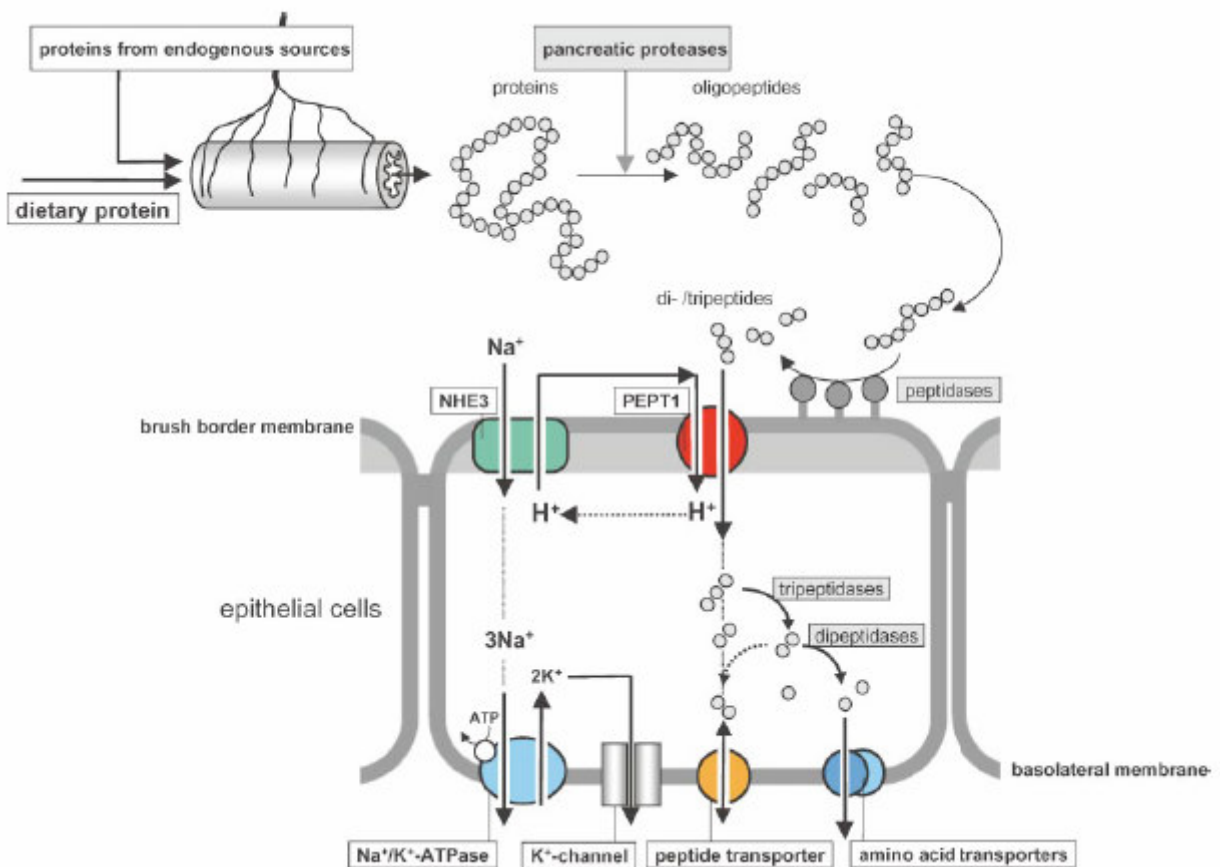
Jusqu'aux années 70, il était généralement admis que l'absorption de l'azote  $\alpha$ -aminé par l'intestin grêle s'effectuait exclusivement sous la forme d'acides aminés libres, après hydrolyse des protéines et des peptides dans la lumière digestive (Pour revue, Matthews, 1975). On sait maintenant qu'une partie considérable des acides aminés traverse la bordure en brosse des entérocytes sous forme de di- et tripeptides, par l'intermédiaire d'un transporteur spécifique (PEPT1). La plupart des peptides entrant dans l'entérocyte sont hydrolysés par les peptidases cytosoliques avant d'être libérés dans la circulation sanguine sous forme d'acides aminés libres. Les peptides qui résistent à l'hydrolyse intracellulaire peuvent être transportés intacts à travers la membrane basolatérale des entérocytes et atteindre la circulation sanguine. Depuis la découverte du transporteur PEPT1, d'autres transporteurs de peptides ont été mis en évidence dans l'épithélium intestinal (OATP, PHT1, etc), leur rôle est cependant encore assez mal connu.

L'absorption des peptides de plus de 4 acides aminés semble également possible, par transcytose (Shimizu et al., 1997) ou par voie paracellulaire (Pappenheimer et al., 1994) (**Figure 12**). La diffusion passive à travers la double couche phospholipidique des

**Figure 12** : Absorption intestinale par voie transcellulaire ou paracellulaire.



**Figure 13** : Absorption intestinale des di- et tripeptides au niveau du transporteur PEPT1 (Daniel, 2004).



membranes apicales et basolatérales des entérocytes est, quand à elle, limitée en raison de l'hydrophilicité de la plupart des peptides.

## 2.1. Absorption par voie transcellulaire

### 2.1.1. Transporteurs membranaires de peptides

#### 2.1.1.1. Transporteurs associés à la membrane apicale

##### - PEPT1

Les di- et tripeptides libérés par la digestion gastro-intestinale traversent la membrane apicale des entérocytes par l'intermédiaire d'un co-transport  $H^+$ /peptide au niveau d'un transporteur spécifique nommé PEPT1 (**Figure 13**). Un gradient électrochimique de protons ( $H^+$ ) apporte l'énergie nécessaire aux peptides pour entrer dans la cellule intestinale. Les ions  $H^+$  sont excrétés de la cellule épithéliale de l'entérocyte par un antiport  $Na^+/H^+$  (transport inverse) au niveau de la membrane apicale (Daniel, 2004).

Le gène du transporteur PEPT1 appartient à la famille de gènes SLC15A (Daniel et Kottra, 2004 ; Steffansen et al., 2004). Cette famille de gènes regroupe un ensemble de transporteurs de peptides qui font partie de la superfamille des transporteurs de peptides couplés à l'entrée d'ions  $H^+$  appelés POT pour *Proton-coupled Oligopeptide Transporter*, également connus sous le nom de PTR pour *Peptide Transporter*. Les principales caractéristiques de chaque membre de cette famille sont présentées dans le **Tableau 9**. La protéine PEPT1 humaine est localisée dans la membrane apicale des entérocytes matures sur toute la longueur de l'intestin grêle, avec une plus forte expression de l'ARNm au niveau du duodénum qu'au niveau du jéjunum et de l'iléon (duodénum > jéjunum > iléon) (Terada et al., 2005). Il est intéressant de noter qu'il existe sur l'axe jéjuno-iléal un gradient inverse dans la répartition des transporteurs de peptides et d'acides aminés libres : la présence de transporteurs de peptides est plus importante dans la partie proximale de l'intestin grêle alors que pour les acides aminés libres elle est plus élevée dans la partie distale.

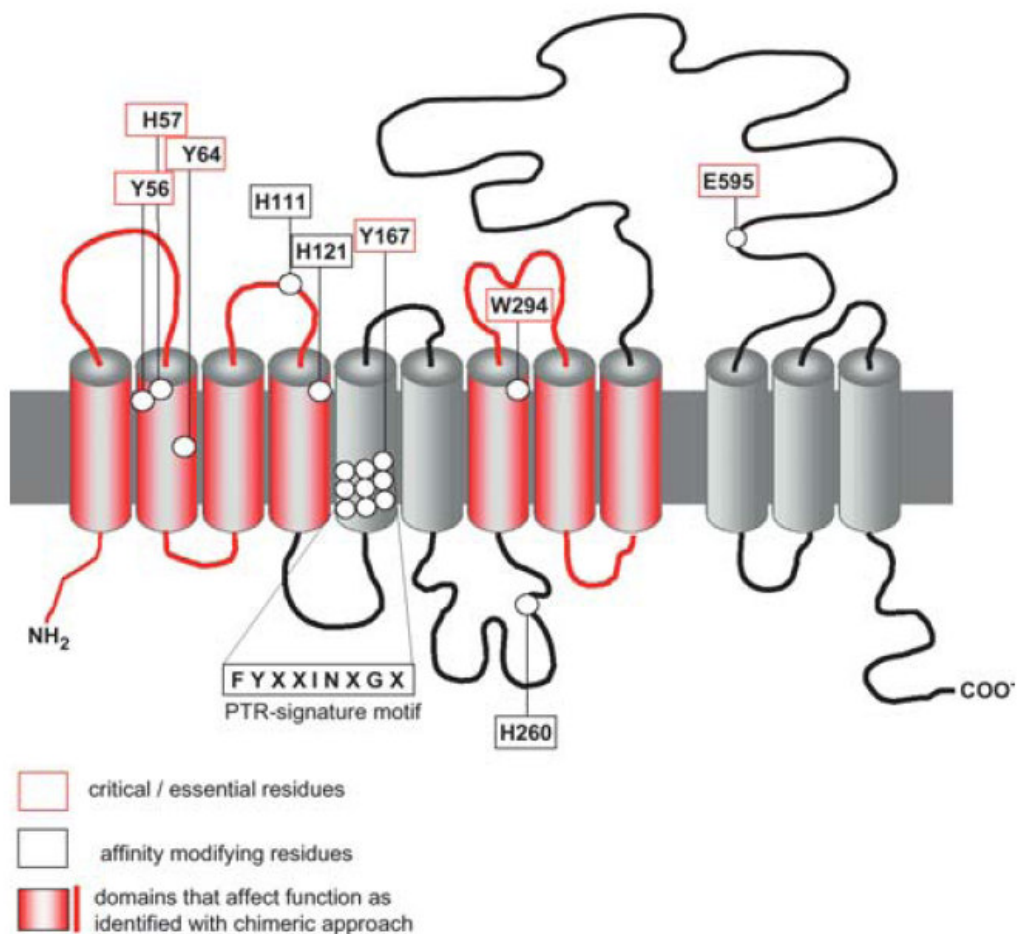
Chez l'homme, la protéine PEPT1 (**Figure 14**) comprend 708 acides aminés et possède 12 domaines transmembranaires avec ses extrémités N- et C-terminale dans le cytosol (Daniel et Kottra, 2004). La tyrosine en position 167 ( $Y_{167}$ ), située dans le 5<sup>ème</sup> domaine transmembranaire, tient un rôle essentiel dans le transport des substrats par



**Tableau 9** : Principales caractéristiques des transporteurs de peptides POT ou PTR (d'après Bhardwaj et al., 2006 ; Daniel et Kottra, 2004).

Gène	Transporteur	Substrat	Distribution tissulaire
SLC15A1	PEPT1	Di-, tripeptides et H <sup>+</sup>	Intestin grêle, rein,
SLC15A2	PEPT2	Di-, tripeptides et H <sup>+</sup>	Rein, poumon, cerveau, glande mammaire
SLC15A3	PHT2 (hPTR3)	Histidine, di-, tripeptides et H <sup>+</sup>	Poumon, rate, thymus (en plus faible quantité dans cerveau, foie, glande surrénale, cœur)
SLC15A4	PEPT1 (PTR4)	Histidine, di-, tripeptides et H <sup>+</sup>	Cerveau, rétine, placenta
	hPHT1	Histidine, di-, tripeptides et H <sup>+</sup>	Estomac, intestin grêle, colon

**Figure 14** : Structure secondaire du transporteur PEPT1 (Daniel et Kottra, 2004).



PEPT1. En effet, Yeung et al. (1998) ont montré qu'un changement de cet acide aminé en alanine, phénylalanine ou sérine empêche complètement le transport de [<sup>3</sup>H]-Gly-sar utilisé comme substrat.

Les di- et tripeptides dérivés de l'hydrolyse des protéines alimentaires sont très variables en taille, en poids moléculaire, en charge nette, en solubilité et en polarité, en fonction des acides aminés qu'ils contiennent. PEPT1 possède la capacité de transporter un grand nombre de di- et tripeptides différents dérivés des 20 acides aminés entrant dans la composition des protéines, ainsi que l'acide aminé libre histidine (Daniel et Kottra, 2004). Les structures moléculaires et conformationnelles nécessaires à la reconnaissance du substrat par la protéine PEPT1 sont résumées dans la **Figure 15**.

La liaison peptidique n'est pas utilisée dans la reconnaissance du substrat par PEPT1, une modification telle qu'une méthylation de cette liaison ne change pas l'affinité du substrat pour PEPT1 (Daniel et Adibi, 1994). Cependant, la conformation de la liaison peptidique (*cis-trans*) peut modifier l'affinité des peptides pour PEPT1. Brandsch et al. (1999) ont testé *in vitro*, sur des cellules Caco-2 en culture, l'affinité de dipeptides contenant de la proline (X-Pro) pour le transporteur PEPT1 en fonction de la conformation de la liaison peptidique, 24 à 70 % des liaisons étant de type *trans*. Ces résultats indiquent qu'il existe une corrélation positive entre l'affinité de X-Pro pour PEPT1 et la proportion de la liaison peptidique de type *trans*.

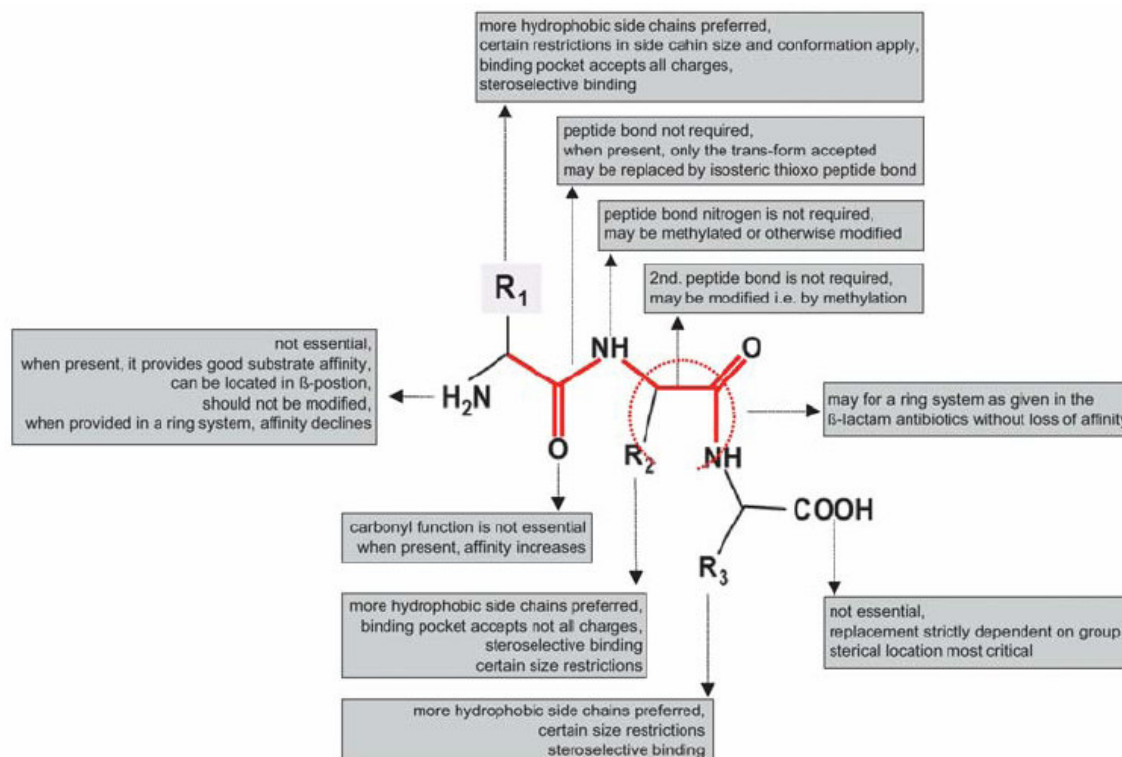
Les peptides anioniques et cationiques sont transportés par le même système que les peptides sous forme de zwitterions. Cependant, les dipeptides chargés ont une plus faible affinité pour PEPT1 que les dipeptides non chargés. En effet, différents auteurs ont montré dans différents systèmes cellulaires *in vitro* (cellules Caco-2 et cellules LLC-PK1) que le dipeptide KK avait une faible affinité pour PEPT1 (Eddy et al., 1995 ; Terada et al., 2000). De plus, dans les cellules Caco-2, le dipeptide AA a une meilleure affinité pour PEPT1 (0,08 mM) que les dipeptides EA (0,25 mM) et KA (0,34 mM), et qu'une modification du dipeptide KA en norleucyl-alanine augmente son affinité à 0,14 mM (Brandsch et al., 1999). Le même effet a été observé pour le changement du dipeptide KP en norleucyl-proline.

D'une façon générale, les dipeptides contenant de la proline en position N-terminale (PX) présentent en général une faible affinité pour PEPT1 (Brandsch et al., 2004).

Une modification du groupement  $\alpha$  aminé de l'extrémité N-terminale par méthylation, acétylation ou d'autres substitutions diminue l'affinité du peptide pour PEPT1.



**Figure 15** : Structures moléculaires et conformationnelles nécessaires à la reconnaissance du substrat par la protéine PEPT1 (Daniel et Kottra, 2004).



**Tableau 10** : Classification des gènes des transporteurs OATP (Hagenbuch et Meier, 2004).

Nom de la protéine	Alias	Symbole du gène humain	Symbole du gène de rat	Symbole du gène de souris
Oatp1	Oatp	-	<i>Slc21a1</i>	<i>Slc21a1</i>
PGT	hPGT (homme), rPGT (rat), mPGT (souris)	<i>Slc21A2</i>	<i>Slc21a2</i>	<i>Slc21a2</i>
OATP-A	OATP, OATP1	<i>Slc21A3</i>	-	-
OAT-K1		-	<i>Slc21a4</i>	-
Oatp2		-	<i>Slc21a5</i>	<i>Slc21a5</i>
OATP-C	LST-1, OATP2, OATP6	<i>Slc21A6</i>	-	-
Oatp3		-	<i>Slc21a7</i>	<i>Slc21a7</i>
OATP8	LST-2	<i>Slc21A8</i>	-	-
OATP-B	OATP-RP2 (homme), moat 1 (rat), Oatp9	<i>Slc21A9</i>	<i>Slc21a9</i>	<i>Slc21a9</i>
Oatp4	Rlst-1 (rat), mlst-1 (souris)	-	<i>Slc21a10</i>	<i>Slc21a10</i>
OATP-D	OATP-RP3 (homme), Pgt2 (rat), MJAM (souris), Oatp11	<i>Slc21A11</i>	<i>Slc21a11</i>	<i>Slc21a11</i>
OATP-E	OATP-RP1 (homme), oatpE (rat), Oatp12	<i>Slc21A12</i>	<i>Slc21a12</i>	<i>Slc21a12</i>
Oatp5		-	<i>Slc21a13</i>	<i>Slc21a13</i>
OATP-F	OATP-RP5 (homme), BSA T1 (rat), Oatp2 (souris), Oatp14	<i>Slc21A14</i>	<i>Slc21a14</i>	<i>Slc21a14</i>
OATP-J	OATP-RP4	<i>Slc21A15</i>	-	-
Oatp16	TST-1, GST-1	-	<i>Slc21a16</i>	<i>Slc21a16</i>
Oatp17		-	-	<i>Slc21a17</i>
Oatp18	TsT-2, GST-2	-	<i>Slc21a18</i>	<i>Slc21a18</i>
OATP-I	GST	<i>Slc21A19</i>	-	-
OATP-H		<i>Slc21A20</i>	-	-

Ainsi, par rapport au peptide GP, l'affinité pour PEPT1 est fortement diminuée pour les dipeptides Sar-Gly ou Sar-Pro, dans lesquels l'azote du groupement  $\alpha$  aminé est méthylé, et pour les dipeptides PG ou PP, pour lesquels l'azote du groupement  $\alpha$  aminé est inclus dans un cycle (Thwaites et al., 1994 ; Eddy et al., 1995 ; Brandsch et al., 1999). De même, l'incorporation d'acides aminés  $\beta$  dans les dipeptides, comme dans la carnosine, diminue l'affinité (Nielsen et al., 2002). Une modification du groupement carboxy-terminal, comme une conversion en un groupement aminé, diminue également l'affinité mais dans un moindre degré que dans la modification de l'extrémité N-terminale (Hidalgo et al., 1995 ; Meredith et al., 2000).

La stéréospécificité des di- et tripeptides joue également un rôle important dans l'affinité pour PEPT1. Les L-L-dipeptides et les L-L-L-tripeptides ont une plus grande affinité que les di- et tripeptides contenant des acides aminés de conformation D (Lister et al., 1995 ; Li et al., 1998).

#### - OATP-B

Les gènes des transporteurs OATPs pour *Organic Anion Transporting Polypeptides* appartiennent à une large famille de gènes (**Tableau 10**) (Hagenbuch et Meier, 2004). Les transporteurs permettent le transport transmembranaire de substrats anioniques de structures chimiques diverses tels que les sels biliaires, les hormones stéroïdiennes et leurs conjugués, les hormones thyroïdiennes, de nombreuses drogues, xénobiotiques et peptides. Ce mode de transport  $\text{Na}^+$ -indépendant semble faire appel à un mécanisme d'échange d'anions bidirectionnel. Les OATPs ont été mis en évidence dans de nombreux tissus tels que le cerveau, le foie, l'intestin, le rein, le placenta, les yeux (Ganapathy et Miyauchi, 2005).

Chez l'homme, seul OATP-B a été clairement localisé au niveau de la membrane apicale des entérocytes (Kobayashi et al., 2003), celui-ci pourrait transporter des peptides ayant une masse supérieure à 450 Da (Hagenbuch et Meier, 2003). Son mode de fonctionnement et sa spécificité de substrat sont encore mal connus. Sa sensibilité au pH suggère cependant qu'il est dépendant d'un gradient de protons (Nozawa et al., 2004). Son rôle dans l'absorption des peptides d'origine alimentaire reste encore à évaluer.

#### 2.1.1.2. Transporteur associé à la membrane basolatérale

Un transporteur de peptides est également présent au niveau de la membrane basolatérale de l'entérocyte permettant le passage des peptides de l'entérocyte vers les

vaisseaux sanguins. Ce transporteur est beaucoup moins sensible au pH que PEPT1 ; il a une plus faible affinité de substrat, mais une spécificité de substrat similaire (Terada et al., 1999 ; Irie et al., 2004). Il semble agir en coopération avec PEPT1 permettant ainsi le passage des di- et tripeptides à travers l'épithélium. Son affinité de substrat est asymétrique. Considérant l'accumulation rapide de peptides dans l'entérocyte induite par PEPT1, sa faible spécificité de substrat à l'intérieur de l'entérocyte semble approprié à une exportation des peptides efficace et sans saturation (Irie et al., 2004).

### 2.1.2. Absorption par transcytose

Les peptides formés de plus de 4 acides aminés ne sont pas reconnus par PEPT1. Ils peuvent être transportés par transcytose, comme les protéines (Gardner, 1988 ; Heyman et Desjeux, 1992).

L'absorption par transcytose (**Figure 12**) fait appel à un processus d'endocytose au niveau de la bordure en brosse des entérocytes, et d'exocytose au niveau de la membrane basolatérale. L'internalisation par endocytose des peptides de la lumière intestinale s'effectue par invagination de la membrane plasmique et formation de vésicules intracellulaires. Les peptides peuvent ainsi franchir la membrane apicale soit de manière aspécifique, par endocytose liquidienne ou endocytose avec adsorption, soit en se fixant de façon spécifique à des récepteurs membranaires (Shen et al., 1992). Les vésicules peuvent alors migrer jusqu'à la membrane basolatérale et exporter leur contenu dans le liquide interstitiel.

Les cellules M ont également la capacité de transporter des polypeptides par transcytose (Gangwar et al, 1997).

L'hydrophobicité des peptides augmente fortement l'absorption intestinale par transcytose aspécifique (Shimizu et al., 1997). La bradykinine (RPPGFSPFR, 1060 Da) apparaît comme un exemple de peptide pouvant être absorbé par transcytose après adsorption au niveau de la membrane épithéliale de l'entérocyte (Shimizu et al., 1997). De même, il a été montré que des polypeptides tels que l'insuline (51 acides aminés) pouvaient être absorbés par transcytose (Ziv et Bendayan, 2000).

### 2.1.3. Devenir des peptides entrés dans l'entérocyte

Une fois entrés dans l'entérocyte, que ce soit par l'intermédiaire d'un transporteur ou par endocytose, la plupart des peptides (di-, tripeptides et peptides formés de plus de 4 acides aminés) sont hydrolysés par des peptidases cytosoliques telles que des dipeptidases,

des tripeptidases, la prolidase ou peptidase D (EC 3.4.13.9) qui catalyse l'hydrolyse de di- et tripeptides ayant un résidu proline à leur extrémité C-terminale (à l'exception du dipeptide PP), la prolinase qui hydrolyse les dipeptides dans lesquels la proline occupe la position N-terminale, et la leucine aminopeptidase (peptidase S) (EC 3.4.11.1) qui libère l'acide aminé en position N-terminale, préférablement si cet acide aminé est la leucine et si il n'est pas basique. A notre connaissance, il n'existe aucune donnée disponible sur la demi-vie des peptides dans l'entérocyte.

## 2.2. Absorption par voie paracellulaire

La voie paracellulaire, voie de passage entre les cellules (**Figure 12**), peut également être envisagée pour l'absorption intestinale des peptides. Les jonctions serrées, structures d'assemblage et de polarisation cellulaires, localisées à l'apex des cellules épithéliales, séparent la membrane apicale du domaine basolatéral et forment une barrière sélective régulant le passage des ions et molécules à travers l'espace paracellulaire. De plus, en empêchant les protéines et les lipides de la membrane apicale de diffuser dans la membrane basolatérale, et inversement, elles contribuent au maintien de la polarité cellulaire (Zahraoui, 2004).

Les travaux de Pappenheimer et al. (1994) qui mettent en évidence chez le rat une absorption intestinale significative (30-50%) de l'octapeptide EASASYSA (784 Da), suggèrent une absorption par voie paracellulaire. Des études *in vitro* montrent que le passage trans-épithélial du térapeptide GGYR (450 Da) pourrait se faire principalement par diffusion paracellulaire (Shimizu et al., 1997), et que ce mode de transfert pourrait également être prépondérant pour certains tripeptides tel que l'inhibiteur d'activité ACE VPP (Satake et al., 2002).

Adson et al. (1994) ont observé que le taux de diffusion paracellulaire était étroitement lié à la taille des peptides, le flux paracellulaire du térapeptide FFFG étant plus faible que pour le dipeptide FG. Okumu et al. (1995) ont également montré que l'hexapeptide WAGGXA cyclisé était 2 à 3 fois plus transporté que sous forme linéaire dans des cellules Caco-2 en culture. La cyclisation diminuerait le poids moléculaire, ce qui pourrait expliquer l'augmentation du flux d'absorption paracellulaire. Ainsi, la taille des peptides apparaît comme l'un des facteurs limitants majeurs de cette voie d'absorption, normalement limitée aux peptides d'une taille inférieure à 600 Da, dans des conditions physiologiques où les jonctions serrées ne sont pas modifiées (Watson et al., 2001). La charge des peptides ne semble pas limiter de façon prépondérante la perméabilité par voie

paracellulaire, par contre étant donné que cette voie est une voie "aqueuse", une certaine hydrophilicité des peptides est nécessaire. Les peptides les plus hydrophiles utiliseront préférentiellement la voie paracellulaire par rapport aux peptides lipophiles qui s'orienteront vers la voie transcellulaire par interaction avec la membrane plasmique.

La perméabilité des jonctions serrées peut être modulée par l'alimentation. En effet, Shimizu (1999) a montré que la perméabilité des jonctions serrées des cellules intestinales Caco-2 en culture était augmentée par traitement avec un extrait de poivre où les substances actives ont été identifiées comme étant des capsianosides ("*diterpene esters of monomeric diterpene glycosides*") qui agiraient en altérant la structure des jonctions serrées après avoir été incorporés dans la membrane cellulaire et associés dans les filaments d'actine intracellulaires. Il a également observé une augmentation de la perméabilité des jonctions serrées avec un extrait de champignon (*Flammulina velutipes*) où la substance active est une protéine de 31 kDa. Cette protéine aurait la propriété d'ouvrir les jonctions serrées mais le mécanisme reste à ce jour inconnu.

### 2.3. Absorption des peptides chez l'homme

On considère généralement que très peu de peptides traversent intacts l'épithélium intestinal, et que l'absorption des peptides contribue peu à l'absorption des acides aminés d'origine alimentaire. Cependant, on manque de données expérimentales pour étayer cette affirmation. Nous venons de voir que plusieurs mécanismes peuvent permettre le franchissement de l'épithélium par des peptides de taille variable et des travaux sur animaux adultes suggèrent que l'absorption intestinale de peptides de faible poids moléculaire (< 3000 Da) peut représenter 25% de la libération des acides aminés libres et peptidiques absorbés dans le sang porte (Rémond et al., 2000 ; 2003).

Chez l'homme, la possibilité d'une absorption de peptide intact à travers l'épithélium a été peu étudiée, mais démontrée pour quelques peptides : les peptides riches en proline et hydroxyproline après l'ingestion de gélatine (Prockop et al., 1962), la carnosine après un repas de viande (Park et al., 2005), des peptides issus du CMP et des fragments des caséines détectés dans le plasma après l'ingestion de produits laitiers (Chabance et al., 1998), GG après perfusion dans l'intestin (Adibi, 1971) et VY après administration orale (Matsui et al., 2002).

**Tableau 11** : Spécificité des principales peptidases du plasma (d'après Werle et Bernkop-Schnürch, 2006).

Nom	Substrats
Aminopeptidase N (EC 3.4.11.2)	AA neutres en position N-terminale
Aminopeptidase A (EC 3.4.11.7)	AA anioniques (Glu, Asp) en position N-terminale
Aminopeptidase P (EC 3.4.11.9)	Hydrolyse la liaison X-Pro en position N-terminale
Carnosinase (EC 3.4.13.3)	Hydrolyse la carnosine ( $\beta$ -Ala-His) et l'anserine ( $\beta$ -Ala-1-méthyl-His)
Prolyl-dipeptidase (EC 3.4.13.18)	Dipeptides hydrophobes ayant un résidu proline
Dipeptidyl-peptidase II (EC 3.4.14.2)	Libère les dipeptides X-Pro ou X-Ala en position N-terminale
Dipeptidyl-peptidase IV (EC 3.4.14.5)	Libère les dipeptides X-Pro ou X-Ala en position N-terminale
Pyroglutamyl-peptidase I (EC 3.4.19.3)	Goupement pyroglutamyl en position N-terminale
$\gamma$ -glutamyltranspeptidase (EC 2.3.2.2)	Transfère le groupement $\gamma$ -Glu sur un AA ou un peptide en position N-terminale
ACE ou dipeptidyl carboxypeptidase (EC 3.4.15.1)	Libère les dipeptides -Pro-X, -Phe-X, -Leu-X en position C-terminale
Prolyl-carboxypeptidase (EC 3.4.16.2)	Hydrolyse les liaisons Pro-X, en position C-terminale
Carboxypeptidase B (EC 3.4.17.2)	Lysine et arginine en position C-terminale
Carboxypeptidase N (EC 3.4.17.3)	AA basiques (Lys) en position C-terminale
Carboxypeptidase U (EC 3.4.17.20)	Lysine et arginine en position C-terminale
Glutamate carboxypeptidase II (EC 3.4.17.21)	Libère un résidu glutamyl en position C-terminale

AA : acides aminés ; ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine

#### **IV. DEVENIR DES PEPTIDES APRES ABSORPTION INTESTINALE**

##### **1. Hydrolyse plasmatique des peptides**

L'activité des peptides dépend fortement de leur résistance à la dégradation par les peptidases plasmatiques (**Tableau 11**), qui est fonction notamment de leur taille et de leur structure moléculaire.

Les petits peptides sont généralement rapidement hydrolysés dans le plasma. En effet, il a été montré que la demi-vie des dipeptides AQ et GYr administrés par voie intraveineuse sous la forme d'une charge à des volontaires sains est de 3,8 et 3,4 min respectivement (Albers et al., 1988), celle du térapeptide RGDS incubé dans du plasma humain est de 10 min (Fok et al., 1991). L'angiotensine II, un octapeptide, est dégradée très rapidement en quelques secondes par l'ACE (Moskowitz, 2003). La diminution de la concentration plasmatique de ces peptides, suite à leur dégradation, s'accompagne généralement d'une augmentation consécutive de la concentration de leurs acides aminés constitutifs dans le plasma. La présence de certains résidus tels que la proline et la glycine limiterait l'hydrolyse plasmatique des peptides. En effet, Chabance et al. (1998) ont montré que le CMP, issu de la caséine  $\kappa$  (résidus 106-169), restait présent dans le plasma pendant 8 h après l'ingestion de lait ou de yaourt chez des volontaires sains. De même, le remplacement d'un résidu alanine par un résidu glycine en position N-terminale dans des dipeptides diminue significativement leur hydrolyse et par conséquent augmente leur demi-vie (Adibi et al., 1986).

La conformation des acides aminés impliquée dans la structure secondaire du peptide peut également influencer son affinité vis-à-vis de peptidases spécifiques et jouer un rôle important dans sa dégradation. En effet, Darlak et al. (1988) ont observé que la substitution d'acides aminés de conformation L par des acides aminés de conformation D dans la dermorphine (heptapeptide opioïde) augmentait son hydrolyse. La majorité des peptidases présentes dans le plasma sont des exopeptidases (aminopeptidases et carboxypeptidases). La protection des extrémités N- et C-terminales, telle que la N-acétylation et la C-amidation, augmenterait la stabilité des peptides en empêchant leur dégradation enzymatique. Par exemple, Brinckerhoff et al. (1999) ont significativement prolongé la demi-vie du peptide immunogénique MART-I<sub>27-35</sub> (AAGIGILTV) par amidation de l'extrémité C-terminale et/ou acétylation de l'extrémité N-terminale. De même, la N-pyroglutamylation améliore la stabilité du peptide GLP-1 (7-36) incubé dans

du plasma humain (Green et al., 2004). La cyclisation du peptide peut également prolonger sa demi-vie. En effet, Su et al. (1991) ont montré que la cyclisation du peptide GRF (1-29) (*Growth regulating factor*) entre les résidus Asp<sup>8</sup> et Lys<sup>12</sup> augmentait significativement sa demi-vie, passant de 13 min à plus de 2 h.

## 2. Prélèvement tissulaire

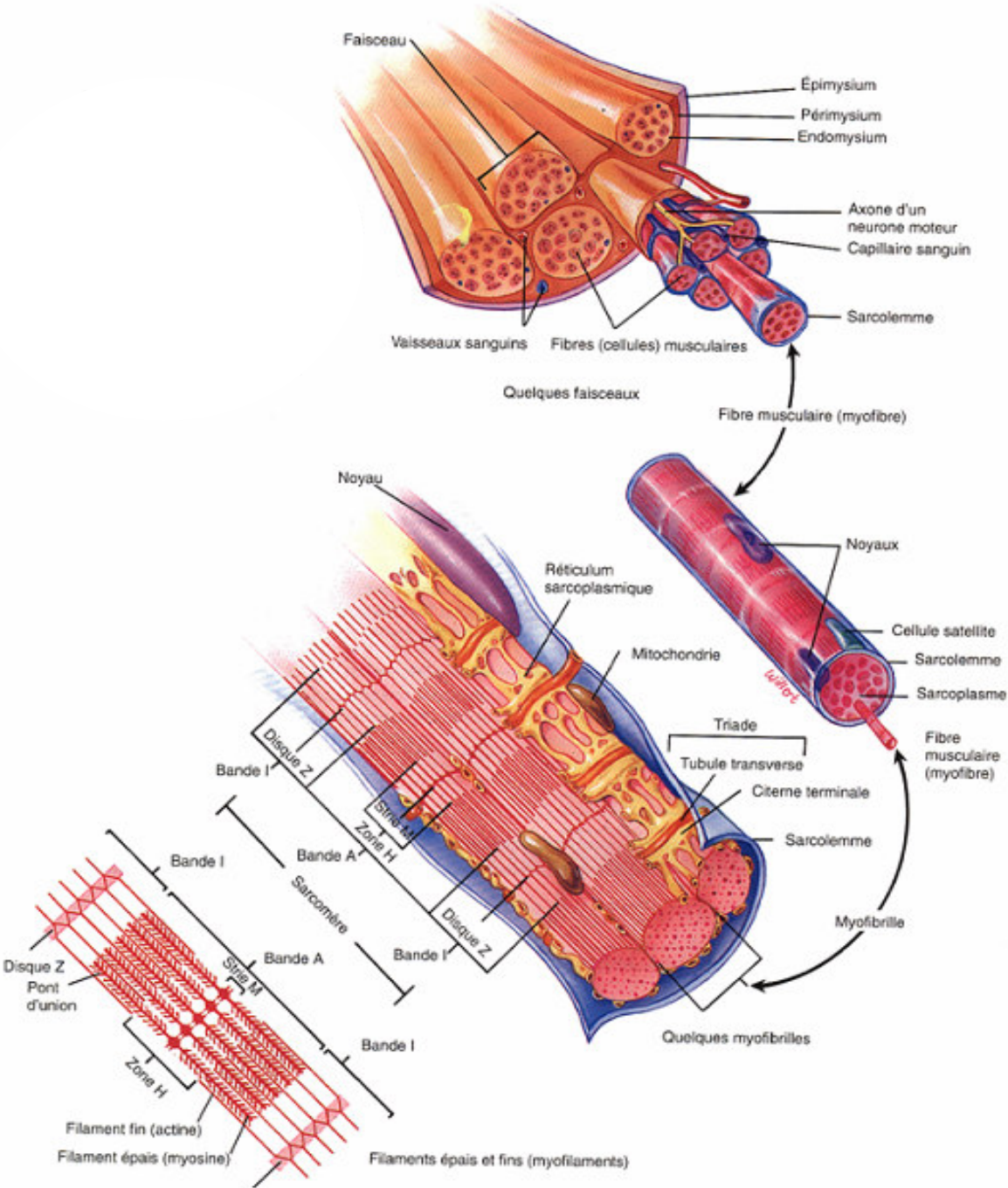
Le prélèvement tissulaire des peptides peut également expliquer leur diminution de concentration dans le plasma. Les peptides présents dans le sang périphérique sont extraits principalement par le foie, le rein, le muscle et l'intestin (Lochs et al., 1988) L'extraction hépatique de la cholécystokinine (octapeptide) et de huit analogues structuraux de synthèse marqués au <sup>125</sup>I a été étudiée dans un modèle de foie isolé perfusé chez le rat (Hunter et al., 1990). Le taux d'extraction hépatique, compris entre 4% et 86%, était positivement corrélé au degré d'hydrophobicité du peptide, indépendamment de sa charge. Abumrad et al. (1989) ont observé que des dipeptides de la glutamine (GQ et AQ) administrés à des chiens étaient captés par le foie, l'intestin, le rein et le muscle mais avec des affinités différentes. La glycylglutamine est davantage captée par le rein que par l'intestin, le foie et le muscle tandis que le muscle extrait préférentiellement l'alanylglutamine. Ces observations montrent la spécificité des organes pour certains peptides en fonctions de leur besoin nutritionnel en acides aminés spécifiques.

## 3. Les peptides dans le sang

Le développement des techniques de spectrométrie de masse permet aujourd'hui d'étudier le profil des peptides présents dans le sang dans différents états physiopathologiques. Ces techniques d'analyse sont regroupées sous le terme de peptidomique (Richter et al., 1999 ; Schrader et Schulz-Knappe, 2001 ; Schulte et al., 2005 ; Hortin, 2006). Ainsi, Richter et al. (1999) ont recensé dans le sang humain plus de 5 000 masses moléculaires correspondant à des peptides dans une gamme de 900 à 10 000 Da. La moitié de ces peptides a été identifiée comme des fragments de protéines plasmatiques, un tiers correspond à des fragments de co-facteur, d'enzyme, d'inhibiteur d'enzyme ou de transporteur. Dans la fraction restante se trouvent les peptides à activité biologique et des précurseurs de peptides. Les techniques utilisées (notamment le MALDI-ToF) ne permettent cependant pas d'étudier la fraction des petits peptides (PM < 600 Da),



**Figure 16** : Anatomie du muscle squelettique au niveau macroscopique et microscopique.



dans laquelle il paraît plus vraisemblable de trouver des peptides d'origine alimentaire. De ce fait, elle est mal connue.

## **V. LE MUSCLE ET LA VIANDE, SOURCES DE PEPTIDES**

La viande (chair chez le poisson) est l'aliment issu du muscle squelettique après transformation *post mortem*. Le muscle contient des peptides endogènes non protéiniques (*cf* paragraphe 1.2.) qui peuvent résister aux procédés de transformation et cuisson. Quelques études suggèrent également que ces mêmes procédés technologiques peuvent générer des peptides à partir des protéines des aliments. La viande pourrait donc représenter une source de peptides bioactifs d'origine protéinique ou non. Dans cette partie, nous présenterons donc le muscle et particulièrement sa composition en protéines puis les procédés de transformation pouvant aboutir à la génération de nouveaux peptides.

### **1. Le muscle squelettique**

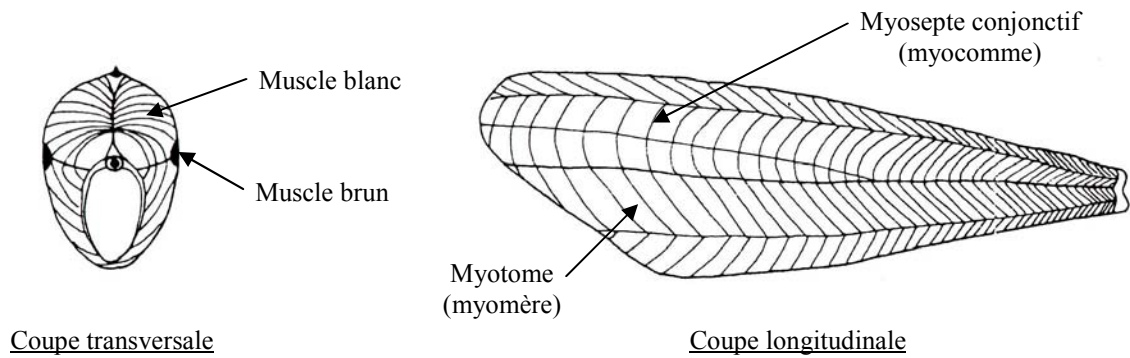
#### **1.1. Anatomie et fonction**

Le muscle squelettique, recouvrant le squelette osseux, est un muscle strié assurant essentiellement le maintien de la posture et la production de mouvements volontaires.

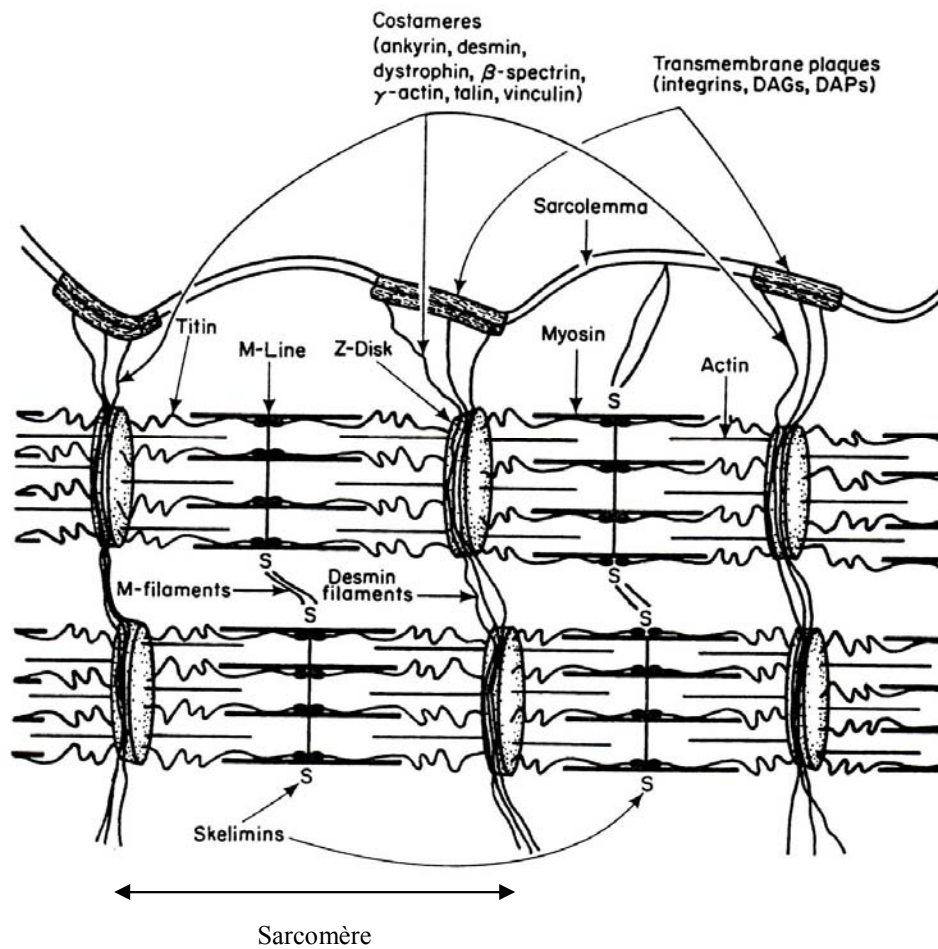
Chez le bovin, et les mammifères en général, le muscle squelettique (**Figure 16**) a généralement la forme d'un fuseau aux extrémités duquel se trouvent les tendons qui assurent la fixation sur les os. Le muscle est un assemblage de faisceaux parallèles, enveloppés dans un tissu conjonctif élastique. Les faisceaux sont formés de fibres musculaires. Chez les poissons, il n'existe pas de système tendineux. Les muscles des poissons sont segmentés en myotomes ou myomères (**Figure 17**) qui ont la forme d'un W et qui s'emboîtent les uns dans les autres. Les myotomes sont délimités par des myoseptes conjonctifs, ou myocommes.

L'unité de base du muscle squelettique est la fibre musculaire. Une fibre musculaire est une longue et fine cellule plurinucléée formée de la fusion de plusieurs centaines de cellules appelées myoblastes. Les noyaux des fibres musculaires sont accolés à la membrane plasmique ou sarcolemme. Chaque fibre contient des organites fibrillaires appelés myofibrilles (**Figure 16**).

**Figure 17** : Structure métamérique des muscles de poisson (d'après Dunajski, 1979).



**Figure 18** : Ultrastructure du sarcomère (d'après Taylor et al., 1995).



Au niveau ultrastructural, la fibre musculaire se caractérise par une alternance de bandes sombres (bande A) et claires (bande I). Ces différences de densité sont dues à la présence de filaments fins (d'actine) et épais (de myosine) se chevauchant partiellement (**Figure 16**). La bande I est traversée par une ligne étroite et dense, la strie Z, où s'accrochent les filaments fins à une de leur extrémité. Le sarcomère (**Figure 18**), segment de myofibrille compris entre deux stries Z successives, est l'unité de contraction élémentaire. La contraction musculaire s'effectue par glissement des filaments de myosine le long des filaments d'actine, glissement assuré par l'ancrage puis le basculement de têtes de myosine sur l'actine (**Figure 19**).

Une fibre se caractérise par son type métabolique (oxydatif ou glycolytique) et son type contractile (rapide ou lent). Les fibres oxydatives produisent l'ATP nécessaire au fonctionnement de la cellule par la voie aérobie, tandis que les fibres glycolytiques le produisent par le système anaérobie. On distingue ainsi au moins trois types de fibres :

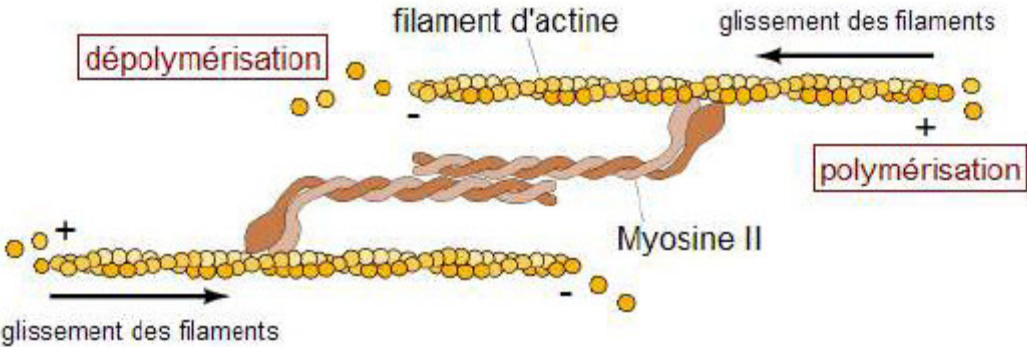
- Les fibres de type I à contraction lente ou fibres rouges sont caractérisées par un métabolisme de type oxydatif. De petit diamètre et très vascularisées, ces fibres contiennent de nombreuses mitochondries et peu de glycogène. Peu fatigables, ces fibres sont surtout utilisées lors d'exercices peu puissants et prolongés. Elles sont abondantes dans les muscles impliqués dans le maintien de la posture.

- Les fibres de type IIA à contraction rapide ou fibres intermédiaires sont caractérisées par un métabolisme de type oxydo-glycolytique. Elles contiennent beaucoup de myoglobine, de mitochondries et de capillaires. Ces fibres sont résistantes à la fatigue.

- Les fibres de type IIB à contraction rapide ou fibres blanches sont caractérisées par un métabolisme de type glycolytique. Elles contiennent peu de myoglobine et de mitochondries, et de grandes réserves en glycogène. Elles ont un large diamètre et sont peu vascularisées. Ces fibres sont très fatigables mais très puissantes. Elles sont sollicitées lors d'exercices brefs mais intenses.

Chez les mammifères, les muscles sont toujours hétérogènes et les différents types de fibres se côtoient. Ceux-ci diffèrent des poissons où la musculature se divise en deux zones très distinctes, homogènes quant à leur type de fibre : le muscle blanc à fibres glycolytiques et le muscle rouge à fibres oxydatives situé sous la peau, plus particulièrement sous la ligne latérale. Le muscle blanc représente la grande majorité de la musculature.

**Figure 19** : Complexe d'acto-myosine.



## 1.2. Les protéines constitutives

Le muscle squelettique contient des protéines du tissu conjonctif d'une part, et de la fibre musculaire d'autre part. Au sein de la fibre musculaire, on distingue à nouveau plusieurs grandes classes de protéines : les protéines de structure (des myofilaments et du cytosquelette), les enzymes (les plus abondantes étant celles impliquées dans le métabolisme énergétique), les protéines de stress, etc. Quelques protéines sont présentées ici, en raison de leur abondance, bien que peu de quantifications relatives soient disponibles dans la littérature à notre connaissance. En revanche, leur structure primaire est généralement connue.

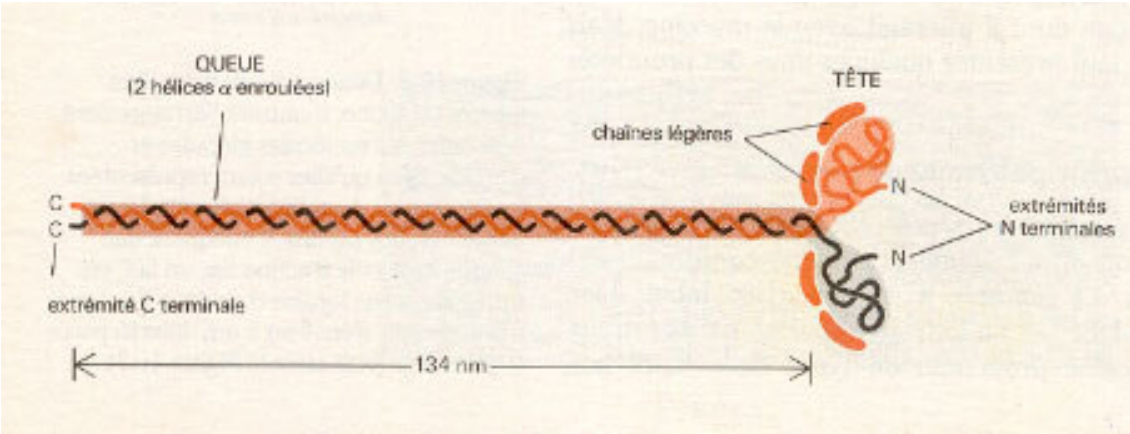
### 1.2.1. Les protéines du tissu conjonctif

Le tissu conjonctif assure le maintien de la structure musculaire et intervient au niveau de la transmission des forces de la contraction myofibrillaire vers le squelette. Ce tissu est constitué essentiellement de collagène et d'élastine, deux protéines fibreuses. Le tissu conjonctif représente environ 10 et 2-3% des protéines musculaires totales chez le bovin et le poisson, respectivement.

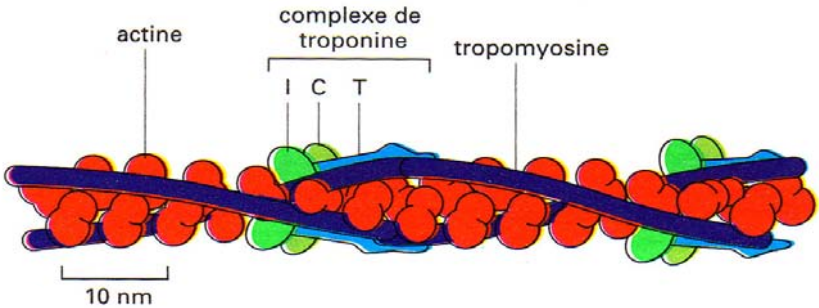
Le collagène, grande protéine de 162 kDa, est le composé le plus important du tissu conjonctif puisqu'il représente environ 80% des protéines du tissu conjonctif. La molécule de collagène est formée de trois chaînes polypeptidiques reliées par des liaisons covalentes et hydrogènes, afin de former une triple hélice stable. Le collagène est inextensible et résistant à la traction. Sa séquence en acides aminés est composée d'une unité tripeptidique qui se répète, du type GXY, où X et Y peuvent être n'importe quel acide aminé. Dans la composition du collagène, trois acides aminés prennent une part importante, à savoir la glycine, la proline et l'hydroxyproline.

L'élastine, protéine de 66 kDa, représente moins de 10% des protéines du tissu conjonctif. Cette protéine fibreuse est constituée de deux types de fibres : des fibres épaisses (5 à 10 µm de diamètre) orientées parallèlement aux cellules musculaires et des fibres fines (1 à 2 µm de diamètre) qui suivent l'alignement des fibres de collagène du périnysium et de l'endomysium. La protéine possède des propriétés élastiques, contrairement au collagène. Elle comprend de nombreux résidus lysine et peu d'hydroxyproline.

**Figure 20** : Structure d'un filament épais de myosine.



**Figure 21** : Structure d'un filament fin d'actine.



### 1.2.2. Les protéines myofilamentaires et associées

Les myofilaments épais sont formés de l'assemblage régulier de molécules de myosine (**Figure 20**). Les filaments fins (**Figure 21**) sont des polymères fibreux formés de l'association d'actine et de deux autres types de protéines, la tropomyosine, qui s'étend dans la gouttière de l'hélice d'actine, et les troponines, qui se fixent sur la tropomyosine.

La myosine est une protéine hexamérique de 520 kDa. Elle est constituée de deux chaînes lourdes de 205 kDa, présentant une structure en hélice  $\alpha$ , qui s'enroulent l'une autour de l'autre pour former une queue fibrillaire, et de deux paires de chaînes légères de 27,5 et 16,5 kDa formant les têtes globulaires de la molécule. La partie distale des têtes de myosine possède deux sites de fixation, l'un pour l'ATP et l'autre pour l'actine. La tête de myosine possède une activité ATPasique activée au contact de l'actine.

L'actine est une protéine globulaire de 42 kDa (actine G) qui polymérise pour former un filament, l'actine F.

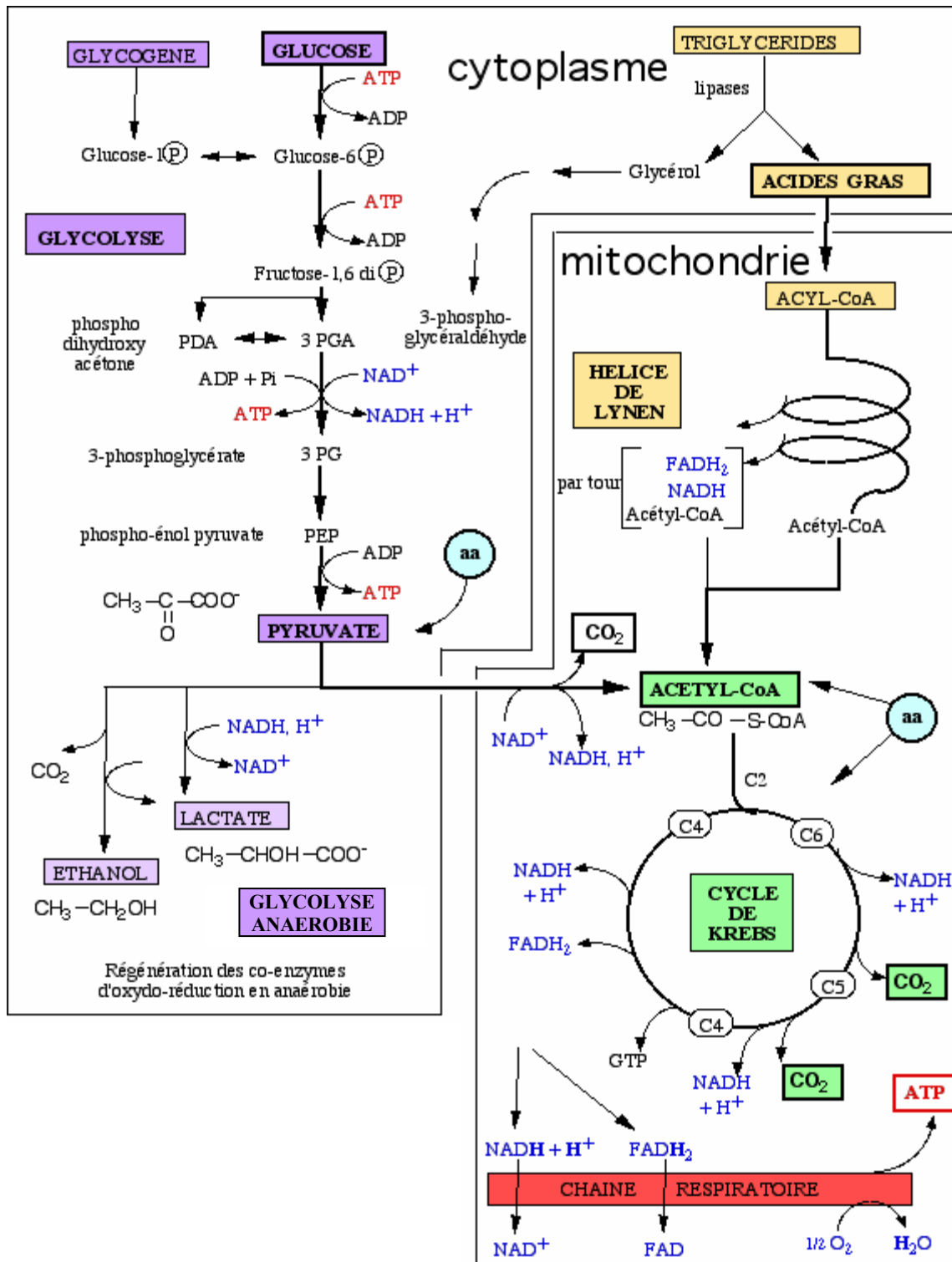
La tropomyosine est une protéine de 66 kDa composée de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  d'environ 33 kDa chacune qui s'organisent en une structure hélicoïdale. Elle s'associe en polymères selon un enchaînement tête-queue. Une molécule de tropomyosine est fixée sur les filaments fins toutes les 7 molécules d'actine. La tropomyosine bloque les sites de liaison de l'actine et de la myosine.

Les troponines sont les protéines responsables de l'activité calcium-dépendante du complexe acto-myosine. On distingue 3 protéines nommées T, I et C, fixées à intervalles réguliers sur la tropomyosine. La troponine T, molécule de forme allongée d'environ 35 kDa, se lie à la tropomyosine et stabilise le complexe de troponines sur le filament fin. La troponine I, protéine de 21 kDa environ, se lie à l'actine. Lorsqu'elle est associée à la troponine T et la tropomyosine, le complexe ainsi formé inhibe l'interaction de l'actine et de la myosine. La troponine C, protéine de 31 kDa environ, possède quatre sites de liaison pour le calcium. Elle joue un rôle déterminant dans la régulation de la contraction musculaire, chez les mammifères et les oiseaux, puisque quand elle fixe du calcium, elle lève l'inhibition de la liaison de la myosine à l'actine produite par les troponines T et I.

Il convient également de citer les protéines spécifiques de la strie Z, parmi lesquelles l' $\alpha$ -actinine et des protéines plus récemment décrites, myozénine (Takada et al., 2001) et les protéines "cypher" (Zhou et al., 1999).



**Figure 22 :** Métabolisme énergétique du muscle.



### 1.2.3. Les protéines du cytosquelette

Le rôle des protéines du cytosquelette est d'assurer l'intégrité structurale et fonctionnelle de la myofibrille. Ces protéines s'organisent en réseaux longitudinaux et intermédiaires matérialisés par des filaments.

Les filaments longitudinaux composés principalement de titine et de nébuline constituent une armature longitudinale de renforcement du sarcomère sous la forme d'un troisième réseau parallèle imbriqué dans celui des filaments épais et fins.

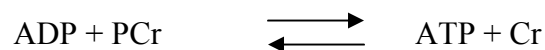
La titine ou connectine est une molécule géante existant sous deux formes,  $\alpha$  et  $\beta$ , de 2800 et 2100 kDa, respectivement. La forme la plus légère résulte de la protéolyse endogène de la molécule de titine native. Cette protéine s'étend de la strie Z jusqu'à la bande M (**Figure 18**). Elle maintient l'alignement des filaments épais. Cette protéine élastique oppose une résistance à l'étirement excessif du sarcomère et assure ainsi la majeure partie de la stabilité longitudinale de la fibre musculaire. C'est la troisième protéine la plus abondante dans la fibre musculaire après la myosine et l'actine.

La nébuline, protéine de 800 kDa environ, joue un rôle important dans la stabilisation des filaments fins, en favorisant l'ancrage de l'actine dans la strie Z, et dans la régulation de leur longueur.

Le réseau de filaments intermédiaires permet de maintenir les myofibrilles alignées les unes par rapport aux autres et permet leur attachement au sarcolemme. La principale protéine des filaments intermédiaires est la desmine, protéine d'environ 53 kDa, qui connecte les disques Z entre eux (**Figure 18**) et assure ainsi la stabilité de la structure de la fibre musculaire au niveau latéral. Citons aussi la synémine assurant la liaison de la desmine avec les stries Z, et les protéines des costamères (dystrophine, intégrine, vinculine, taline, etc), structures d'ancrage des disques Z au sarcolemme.

### 1.2.4. Les enzymes du métabolisme énergétique et de détoxification

En raison de sa fonction spécialisée en production de mouvements, la fibre musculaire est très riche en enzymes permettant de fournir l'énergie nécessaire à la contraction. Une des enzymes les plus abondantes est la créatine kinase, permettant la régénération immédiate d'ATP à partir d'ADP et de phosphocréatine (PCr) selon la réaction :



Les enzymes des métabolismes glycolytique (protéines sarcoplasmiques) et oxydatif (protéines mitochondriales) sont également largement représentées (**Figure 22**).

Sans pouvoir faire un inventaire exhaustif, on peut également citer les enzymes impliquées dans l'élimination des produits toxiques pour la cellule, par exemple les trois principales enzymes antioxydantes : superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase qui neutralisent respectivement l'ion superoxyde  $O_2^\circ$ , le peroxyde  $H_2O_2$  et les hydroxyperoxydes ROOH (pour revue Matés et Sánchez-Jiménez, 1999).

#### 1.2.5. Autres protéines

Les protéines de stress ou chaperones ont un rôle dans la reconformation des protéines dénaturées et assurent la stabilisation des myofilaments (Neufer et Benjamin, 1996). Il s'agit particulièrement de l' $\alpha$ -crystalline et des protéines de choc thermique (HSPs pour *Heat Shock Proteins*), la HSP 27 étant la plus abondante et existant sous de très nombreuses isoformes dans le muscle squelettique (Scheler et al., 1999).

Enfin, citons deux protéines présentes en fortes concentrations, mais dans une seule des deux espèces considérées. Il s'agit du pigment myoglobine dans le muscle de bovin, et plus généralement des mammifères, qui assure le transport d'oxygène dans la cellule. Chez les poissons, les parvalbumines sont présentes à des concentrations élevées. En raison de leur pouvoir de séquestration du calcium, elles ont un rôle dans la régulation du taux de calcium libre sarcoplasmique. Cette fonction est assurée en grande partie par la troponine C chez les animaux à sang chaud (*cf paragraphe 1.2.2.*) mais son pouvoir de liaison du calcium décroît à basses températures. Les parvalbumines sont ainsi mieux adaptées aux animaux poïkilothermes.

## 2. La transformation du muscle en viande prête à être consommée

Que ce soit chez les mammifères ou les poissons et pendant la période qui va de la mort de l'animal à la consommation de la viande ou de la chair, on assiste à une altération des structures musculaires, en grande partie due à la protéolyse *post mortem*, potentiellement génératrice de peptides. Après une description générale et chronologique de l'évolution *post mortem* du muscle, nous présenterons les modifications affectant les protéines musculaires au cours de la maturation ou de la conservation, et au cours de la cuisson.

### 2.1. Les phases précoces *post mortem* d'évolution du tissu musculaire

A la mort de l'animal, le muscle est totalement détendu, sa texture est souple et élastique. Cette phase ne dure que quelques heures en général. Pendant cette période, le pH du muscle se maintient proche du pH physiologique aux alentours de 7.

L'état de *rigor mortis*, ou rigidité cadavérique, se caractérise par des muscles durs et inextensibles, phénomène causé par la stabilisation du complexe acto-myosine. Ainsi, après la mort de l'animal et afin de continuer à fonctionner, la cellule va d'abord régénérer l'ATP qui lui est nécessaire par consommation de ses réserves de phosphocréatine. Par la suite, dans l'incapacité de recourir au métabolisme oxydatif étant données les conditions anaérobies, les réserves en glycogène seront utilisées et la production d'énergie sera accompagnée de production d'acide lactique (**Figure 22**). Quand la régénération de l'ATP n'est plus possible, il manque l'énergie nécessaire pour assurer la dissociation du complexe actine-myosine et celui-ci s'installe de façon irréversible. Pendant la *rigor mortis*, l'acide lactique s'accumule et contribue à l'abaissement du pH à une valeur voisine de 5,3-5,8 chez les mammifères et de 6,0-6,5 pour les poissons. Cet état s'installe et dure environ 12 h chez le bovin et jusqu'à plusieurs jours chez le poisson.

### 2.2. La maturation (bovin) ou perte de fraîcheur (poisson)

Un ensemble de phénomènes de natures physico-chimiques et enzymatiques vont progressivement conduire à la sortie de la *rigor mortis* puis à une altération des structures musculaires. On parle de maturation chez le bovin, où ces phénomènes contribuent en particulier à l'attendrissement de la viande. La durée de maturation de la viande bovine doit idéalement atteindre 10 à 20 jours pour réduire la dureté de 80% par rapport à l'état de *rigor mortis*, permettant ainsi sa consommation. Chez le poisson, en revanche, cette évolution *post mortem* n'est pas favorable car elle entraîne un amollissement de la chair et est considérée comme une perte de fraîcheur. Au cours de cette période, le pH remonte à 7 chez le poisson tandis qu'il reste inférieur à 6 chez le bovin.

### 2.3. Les modifications protéiques après la sortie de *rigor mortis*

Au cours de cette période, les protéines musculaires vont être modifiées par trois phénomènes principaux, interagissant entre eux : la dénaturation, l'oxydation et la protéolyse. La dénaturation peut être définie comme le réarrangement spatial des protéines sans hydrolyse des liaisons peptidiques. Elle est provoquée par l'acidification du muscle, la dessiccation, l'exposition à des concentrations en sels élevées ou à des températures très

basses ( $< 0^{\circ}\text{C}$ ) ou élevées (Lawrie, 1998). Au cours de la période de maturation chez le bovin, c'est le pH qui est le principal facteur de dénaturation des protéines. Ce phénomène est moins prononcé chez le poisson.

En ce qui concerne l'oxydation des protéines, elle est provoquée par l'altération des systèmes de défense anti-oxydants, à savoir la perte d'activité des enzymes antioxydantes et la dégradation de molécules telles que la vitamine C. L'oxydation se traduit par la formation de groupements carbonyles sur les acides aminés à fonctions diamines ( $\text{R-NH}_2$  devenant  $\text{R-CHO}$ ), l'oxydation des groupements SH et ainsi la possibilité de formation de ponts disulfures entre deux cystéines, l'oxydation des groupements OH conduisant notamment à des dityrosines, ou encore par l'hydroxylation des acides aminés aromatiques (Davies, 1987, Stadtman, 1990). L'oxydation des protéines suscite un certain intérêt dans le domaine du muscle en tant qu'aliment, qu'il s'agisse de la viande (Liu et Xiong, 1996 ; Martinaud et al., 1997) ou de la chair de poisson (Kjærsgård et Jessen, 2004) en raison notamment de son rôle dans l'insolubilisation des protéines (Decker et al., 1993) et dans l'inhibition de la protéolyse *post mortem* (Rowe et al., 2004 ; Morzel et al., 2006).

#### 2.4. Les mécanismes de la protéolyse *post mortem*

L'altération de l'intégrité musculaire après la sortie de la *rigor mortis* est principalement le résultat de l'action des enzymes protéolytiques sur les protéines de structure. Ainsi, la dégradation de certaines protéines myofibrillaires et du cytosquelette au cours de la maturation de la viande a été largement décrite, que ce soit pour la titine ou connectine (Fritz et Greaser, 1991 ; Huff-Lonergan et al., 1995), la nébuline (Fritz et Greaser, 1991 ; Huff-Lonergan et al., 1995 ; Taylor et al., 1995), la desmine (Koochmaraie et al., 1991 ; Takahashi, 1996) et la troponine T (Mac Bride et Parrish, 1977 ; Ho et al., 1994). Chez le poisson, certaines protéines sont reconnues comme substrats de protéolyse, telles la connectine  $\alpha$  (Tsuchiya et al., 1992), la nébuline (Tsuchiya et al., 1992 ; Papa et al., 1997), la dystrophine (Papa et al., 1997), l'actinine  $\alpha$  (Tsuchiya et Seki, 1991 ; Tsuchiya et al., 1992 ; Papa et al., 1996) et la desmine (Verrez-Bagnis et al., 1999). Les systèmes protéolytiques impliqués dans la maturation de la viande et dans la perte de fraîcheur du poisson sont les mêmes que ceux qui assurent la dégradation des protéines au cours des cycles de renouvellement successifs chez l'animal vivant (Asghar et Bhatti, 1987). Trois systèmes enzymatiques sont ici susceptibles d'intervenir : les calpaïnes, les cathepsines et le protéasome. On évoque aussi depuis peu l'intervention des systèmes

enzymatiques impliqués dans l'apoptose, les caspases (Sentandreu et al., 2002 ; Herrera-Mendez et al., 2006).

#### 2.4.1. Les calpaïnes

Les calpaïnes sont des cystéine protéases neutres cytosoliques et ubiquitaires à activité calcium-dépendante. Au sein des calpaïnes, on distingue différents groupes selon leur exigence en calcium. La  $\mu$ -calpaïne ou calpaïne 1 et la m-calpaïne ou calpaïne 2 sont actives à des concentrations en calcium de l'ordre du micro-molaire et du milli-molaire, respectivement. Il existe une forme intermédiaire appelée la  $\mu/m$ -calpaïne (Sorimachi et al., 1995).

#### 2.4.2. Les cathepsines

Les cathepsines sont des protéases actives en milieu acide, dénommées en fonction de l'acide aminé de leur site actif (cystéine protéinase : cathepsines B, C, H, L, S ; aspartate protéinases : cathepsines D et E ; sérine protéinase : cathepsine G). Ces enzymes sont localisées essentiellement à l'intérieur des vésicules lysosomales qui incorporent par endocytose les protéines à dégrader. Dans le muscle *post mortem*, les cathepsines sont libérées dans le cytoplasme après rupture des lysosomes.

#### 2.4.3. Le protéasome

Le protéasome 26S est un complexe cytosolique comprenant plus de 30 sous-unités différentes, chargé de dégrader les protéines. Il est composé, chez les eucaryotes, d'une unité centrale 20S en forme cylindrique et de deux unités 19S à chaque extrémité de l'unité centrale. Le complexe 19S est responsable de la reconnaissance, de la dénaturation et du transfert du substrat à l'intérieur du complexe 20S où réside l'activité protéolytique. La reconnaissance du substrat requiert la présence d'une chaîne poly-ubiquitine attachée de manière covalente au substrat. La reconnaissance du substrat par le protéasome déclenche sa dégradation en acides aminés et en peptides courts.

#### 2.4.4. Les caspases

Les peptidases initiatrices ou effectrices d'apoptose, sont des cystéine peptidases neutres avec une spécificité de clivage après un résidu acide aspartique, d'où leur nom proposé par Alnemri et al. (1996) de caspases (C pour cystéine protéase, ASP pour acide aspartique, ASE correspondant au suffixe commun à toutes les enzymes). A ce jour, 14

caspases différentes ont été décrites. Leur rôle dans l'apoptose est bien décrit (Creagh et Martin, 2001 ; Zimmermann et al., 2001) mais ce n'est que récemment que leur implication dans la protéolyse *post mortem* a été suggérée (Herrera-Mendez et al., 2006).

#### 2.4.5. Contribution respective des différents systèmes protéolytiques

La part respective des différents systèmes protéolytiques dans la protéolyse *post mortem* et dans l'attendrissage ou l'amollissement de la chair ne fait l'objet d'aucun consensus. Une première explication est que le rôle des protéases a parfois été étudié sans tenir compte de leurs inhibiteurs (par exemple la calpastatine pour les calpaïnes, les cystatines pour les cathepsines), alors même que le ratio protéase/inhibiteur est généralement plus informatif sur l'efficacité de la protéolyse que l'abondance de protéases en soi (Ouali, 1992).

On peut tout de même dégager quelques généralités : les caspases interviendraient rapidement, dans les premières heures suivant la mort (Herrera-Mendez et al., 2006). L'action des calpaïnes est parfois considérée comme la seule réellement impliquée dans l'attendrissage de la viande (Delgado et al., 2001). Toutefois, dans des viandes à pH élevé, l'activité des calpaïnes n'explique statistiquement qu'en partie les propriétés mécaniques de la viande (Dransfield, 1992). Chez le poisson, on considère que les cathepsines, en particulier des types B et L, ont un rôle prépondérant dans la protéolyse *post mortem*, alors que l'action des calpaïnes est secondaire (Chéret et al., 2007). Ainsi, l'action des différents systèmes protéolytiques se fait vraisemblablement de façon synergique. Par exemple, Robert et al. (1999) ont suggéré l'action synergique des calpaïnes et du protéasome où les calpaïnes pourraient initier la rupture et la déstabilisation des structures myofibrillaires, libérant et dénaturant ainsi partiellement les protéines, ce qui permettrait alors au protéasome d'agir.

#### 2.4.6. Les mécanismes non-enzymatiques de la protéolyse *post mortem*

Un mécanisme de protéolyse non enzymatique a été suggéré (Takahashi, 1996 ; Hopkins et Thompson, 2002), par lequel les concentrations en calcium sarcoplasmique seraient suffisantes pour fragiliser les structures myofibrillaires. En effet, on observe en *post mortem* une forte augmentation de la pression osmotique dans la cellule, due essentiellement à la libération d'ions calcium initialement concentrés dans le réticulum sarcoplasmique et dans les mitochondries. Ce calcium se fixerait aux phospholipides, ce qui solubiliserait les phospholipides de la strie Z, provoquant la rupture des protéines la

constituant. De la même façon, le calcium se fixant sur la desmine provoquerait la dépolymérisation puis la rupture des filaments intermédiaires du cytosquelette (Takahashi, 1996). Il est toutefois difficile d'omettre totalement le rôle du calcium dans l'activation des calpaines.

### 2.5. La cuisson

La cuisson est le procédé par lequel l'aliment, tel que la viande et la chair de poisson, est transformé sous l'effet de la chaleur. La cuisson entraîne des modifications dans la texture, la flaveur et la couleur de la viande et de la chair de poisson. Ces changements diffèrent selon l'espèce, le type de muscle, le degré de maturité de la viande (Abugroun et al., 1985), l'état du muscle de poisson après stockage *post mortem* et l'origine du poisson (poisson sauvage ou d'élevage) (Ofstad et al., 1996), mais aussi selon le mode de cuisson de l'aliment (grillé, braisé, cuit à l'eau, à la vapeur, sous vide, au four, au four à micro-ondes, etc). Ces changements résultent d'un ensemble de réactions entraînant des modifications des protéines musculaires (oxydation, glycation, protéolyse) associées à une perte de la capacité de rétention d'eau (Bendall et Restall, 1983 ; Ofstad et al., 1996).

Toutefois, la modification la plus importante et immédiate des protéines est leur dénaturation sous l'effet de la chaleur. La myosine est généralement dénaturée entre 40 et 60 °C (Bendall et Restall, 1983) tandis que la dénaturation de l'actine ne devient complète qu'à environ 83 °C (Barbut et Findlay, 1991). La dénaturation thermique de la titine, protéine du cytosquelette, est maximale entre 76 et 80 °C dans le muscle *Longissimus* de bovin (Pospiech et al., 2002). La dénaturation de la myosine s'accompagne d'une libération de liquides dans les espaces extracellulaires (Brunton et al., 2006), modifiant la structure de la viande. La dénaturation des protéines sarcoplasmiques contribue également à la consistance de la viande cuite (Hamm, 1977 ; Tornberg, 2005) par formation de gels qui peuvent lier des éléments structuraux du muscle. C'est toutefois la dénaturation du collagène qui a reçu le plus d'attention. Les fibres de collagène commencent à se contracter à environ 64 °C et leur dénaturation devient complète vers 70 °C (Brunton et al., 2006). La dénaturation du collagène s'accompagne d'un durcissement de la viande due à la contraction des fibres conjonctives, et d'une importance expulsion de liquides, suggérant que le collagène est responsable de la perte d'une grande partie du jus à la cuisson (Rochdi et al., 1985 ; Brunton et al., 2006). A plus haute température, le collagène se solubilise et forme progressivement un gel appelé gélatine.



Dans le poisson, la dénaturation thermique du collagène entraîne une perte totale des propriétés d'attachement du tissu conjonctif observé après 10 min de cuisson à 100 °C chez le bar (Ayala et al., 2005) et les forces d'attraction agissant entre les myofibrilles et entre les fibres deviennent si faibles que les myotomes se détachent facilement après cuisson (Dunajski, 1979).

### 3. Génération de peptides au cours des procédés technologiques

#### 3.1. La maturation ou la conservation dans la glace

La dégradation des protéines ou protéolyse dans le muscle, qui survient au cours de la maturation de la viande ou au cours du stockage *post mortem* du poisson, génère des fragments de protéines ou oligopeptides (Etherington, 1991). Ces oligopeptides peuvent à leur tour être dégradés par des peptidyl-peptidases et des amino-peptidases conduisant à la production de peptides et à la libération d'acides aminés individuels dans la viande (Mullen et al., 2000). Par exemple, des dipeptidyl-peptidases, libérant des dipeptides à partir de l'extrémité N-terminale de protéines, sont présentes dans le muscle de porc (Sentandreu et Toldrá, 1998 ; 2000 ; 2001), mais la présence de dipeptides ainsi générés n'a été confirmée que dans le jambon sec (Sforza et al., 2001).

Malgré la présence reconnue de plusieurs peptidyl-peptidases, la littérature est curieusement pauvre en information sur les produits générés, au moins en ce qui concerne les peptides de petite taille (<5 kDa). Une augmentation de la concentration en peptides d'une taille comprise entre 3 et 17 kDa a été observée dans le muscle de bœuf et de porc ayant mûri 14 jours (Claeys et al., 2004) mais il est difficile de déterminer la part de la fraction de poids moléculaire de 3 à 5 kDa. En revanche, dans le muscle d'agneau, une augmentation de la concentration de peptides de faible poids moléculaire (< 2,4 kDa) a été observée après 21 jours de maturation (Sylvestre et al., 2001) mais l'identification de ces peptides n'a pas été faite. Quelques peptides générés au cours de la maturation ont tout de même été identifiés. Dans le boeuf, il s'agit du peptide APPPPAEVPEVHEEVH (1734,8 Da), fragment 23-38 issu de la troponine T, purifié par RP-HPLC et identifié par séquençage d'Edman (Muroya et al., 2003). Ce même peptide est retrouvé dans une étude s'attachant spécifiquement à la fraction de la viande bovine soluble dans une solution de TCA (Stoeva et al., 2000). La présence de trois autres petits peptides (1282,8, 1807,5 et 3607,3 Da) y a été mis en évidence. Le premier correspond au fragment 258-269

KVVVKQASEGPLK de l'enzyme glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, et les autres séquences n'ont pas été identifiées.

Chez le porc, un peptide APPPPAEVHEVHEEVH (1774 Da) également issu de la troponine T (fragment 23-28) est considéré comme un marqueur du processus de maturation (Okumura et al., 2003). Les mêmes auteurs rapportent qu'un fragment de glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (233-244), de séquence VPTPNVSVVDLT (1240,4 Da), apparaît à l'état *post mortem*.

Dans la chair de poisson, il n'existe à notre connaissance aucune étude s'intéressant aux peptides de petites tailles générés au cours de la conservation dans la glace.

### 3.2. La cuisson

Parallèlement à la dénaturation des protéines musculaires, la cuisson génère également des fragments protéiques, plus particulièrement à haute température (Spanier et al., 1990). Ces polypeptides sont observés par électrophorèse dans la partie basse d'un gel d'acrylamide avec gradient (maximum 21%), mais il est difficile de leur attribuer une taille précise. Ces peptides participeraient, avec les acides aminés libres, à la flaveur de la viande (Nishimura et Kato, 1988 ; Spanier et al, 1988), en particulier au faux-goût "*warmed over flavour*", une flaveur se rapprochant de la rancidité mais se développant à la cuisson.

Toujours en rapport avec la flaveur de la viande, trois peptides isolés de viande de porc maturée et cuite à 60°C ont montré la capacité d'atténuer l'intensité de la saveur acide de la viande. Il s'agit des peptides APPPPAEVHEVV, APPPPAEVHEVVE et APPPPAEVHEVHEEVH (Okumura et al., 2004), ce dernier différant par un seul acide aminé de la séquence de troponine T isolée du muscle de boeuf au cours de la maturation (*cf paragraphe 3.1.*). Les deux autres également sont des fragments de troponine T. Il ne s'agit pas nécessairement de peptides générés par la cuisson, mais plutôt résistants à ce traitement thermique.

A nouveau, nous n'avons pas connaissance d'études sur les peptides de petite taille dans la chair de poisson cuite.

---

---

# **ETUDE EXPERIMENTALE**

---

---

## INTRODUCTION

Jusqu'à présent, la recherche de peptides bioactifs dans les aliments était essentiellement centrée sur le lait et les produits laitiers. Peu de données sont disponibles concernant la présence de peptides bioactifs dans les viandes et le poisson, alors que ces aliments constituent une part importante de l'apport protéique dans l'alimentation de l'homme (respectivement 27% et 6%, enquête INCA, 2000). La viande et le poisson peuvent pourtant vraisemblablement représenter une source de peptides bioactifs. D'une part, le muscle est source de peptides endogènes non protéiniques tels que la carnosine, l'ansérine et le glutathion. Par ailleurs, les procédés technologiques de transformation du muscle (maturation/conservation et cuisson) entraînent des modifications physico-chimiques et structurales des protéines pouvant générer de nouveaux peptides. Enfin, au cours de l'hydrolyse digestive, des peptides sont également produits à partir des protéines alimentaires. Certains de ces peptides peuvent résister à l'hydrolyse digestive et être retrouvés dans les contenus digestifs. Ils peuvent alors exercer soit une action locale au niveau du système digestif, soit une action périphérique après absorption intestinale et passage dans la circulation sanguine.

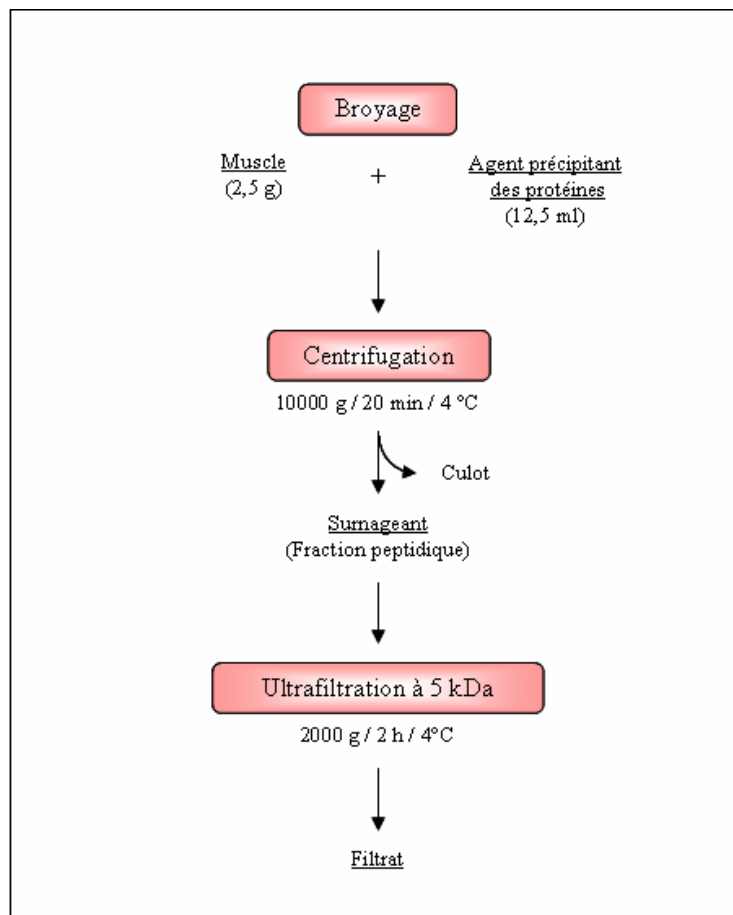
De nombreuses études ont décrit la présence de peptides bioactifs dans des hydrolysats protéiques et la plupart des activités des hydrolysats ou des peptides purifiés a été mise en évidence à l'aide de test *in vitro* ou bien *in vivo* après administration par voie intraveineuse. Dans la majorité des cas, ces résultats ne permettent pas d'affirmer, d'une part, que ces peptides sont naturellement générés *in vivo* au cours de la digestion gastro-intestinale et, d'autre part, comment ils atteignent leurs cibles (récepteur, enzyme, etc) dans l'organisme.

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail de thèse étaient multiples. Dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser et identifier les peptides présents dans deux aliments riches en protéines, la viande et le poisson. Nous avons ainsi caractérisé la fraction peptidique de ces produits carnés à trois stades : dans le muscle frais, après conservation du poisson dans la glace ou maturation de la viande et après cuisson, c'est-à-dire dans le produit prêt à être consommé. Ceci nous a permis d'étudier l'apparition et la stabilité des peptides produits au cours des différents procédés technologiques de transformation du muscle. Dans un deuxième temps, nous avons cherché à caractériser et

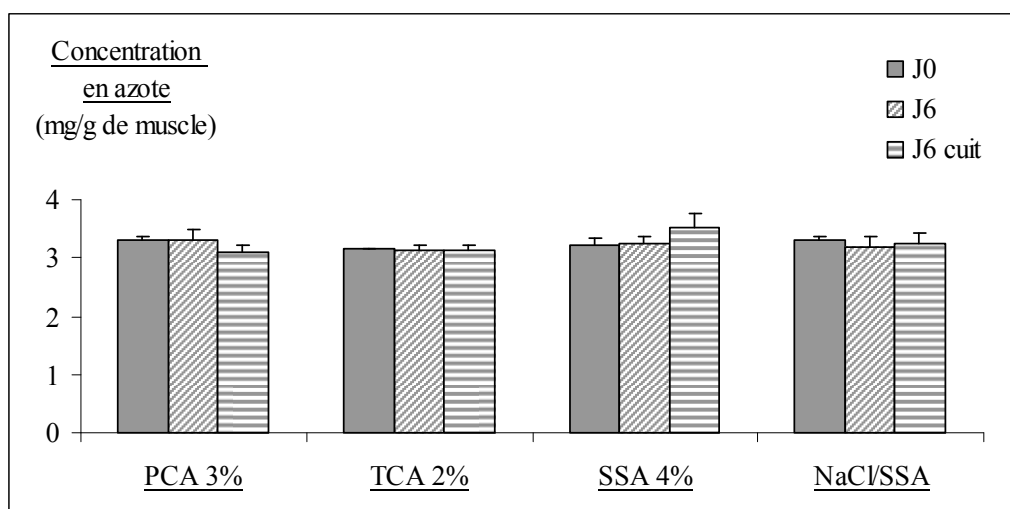
identifier les peptides alimentaires, issus de ces mêmes produits carnés, générés au cours de l'hydrolyse digestive *in vivo* afin de pouvoir établir un lien entre l'aliment et son devenir après digestion gastro-intestinale, en utilisant le porc comme modèle animal. Enfin, nous nous sommes ensuite intéressés aux peptides apparaissant dans le sang drainant le tube digestif (veine porte) afin d'évaluer la possibilité d'une absorption intestinale des peptides présents dans la lumière digestive.

Pour atteindre ces objectifs, différentes mises au point ont été nécessaires notamment pour l'extraction, la caractérisation et l'identification des peptides issus des différentes matrices étudiées (aliment, digesta et plasma).

**Figure 23** : Protocole d'extraction de peptides à partir de muscle.



**Figure 24** : Contenu en azote des différentes fractions peptidiques extraites à partir de muscle de truite frais (T0), stocké 6 jours sur la glace (J6) et cuit après 6 jours de stockage sur la glace (J6 cuit) avec différents agents précipitants des protéines : l'acide perchlorique à 3% (PCA 3%), l'acide trichloroacétique à 2%(TCA 2%), l'acide sulfosalicylique à 4% (SSA 4%) et du NaCl à 0,9% + SSA 4% (NaCl/SSA).



Les résultats sont des moyennes (n = 3) ± l'erreur standard.

## **I. MISES AU POINT METHODOLOGIQUES**

L'étude des peptides de taille inférieure à 5 kDa, présents dans une matrice solide (aliment) ou semi-solide (digesta), nécessite la mise en œuvre de méthodes spécifiques et adaptées dont la première étape est naturellement l'extraction des peptides. Cette étape est suivie de l'acquisition des données sur leur masse et leur séquence. Ces informations sont classiquement obtenues après purification de chaque peptide par des analyses successives par chromatographie en phase inverse (RP-HPLC) suivie d'un séquençage selon la méthode d'Edman. Cette approche est adaptée à l'étude d'un peptide particulier mais n'est pas compatible avec une caractérisation plus globale des peptides présents dans la matrice étudiée. C'est la raison pour laquelle nous avons privilégié une autre approche qui consiste à fractionner l'extrait par RP-HPLC, sans rechercher à atteindre une séparation individuelle des peptides, et à identifier les séquences peptidiques par spectrométrie de masse (MS/MS), le fractionnement préliminaire par HPLC pouvant être effectué en ligne ou non. Nous avons également mis en œuvre une méthode sans fractionnement pour obtenir le spectre de masse des composés présents dans nos échantillons (MALDI-ToF). Notre démarche analytique, basée sur les outils précédemment décrits, a donc été :

- 1) d'extraire les peptides de leur matrice,
- 2) de déterminer le profil de masse de chaque échantillon afin d'évaluer globalement la reproductibilité de nos observations,
- 3) d'identifier les composés dont la masse était trouvée de façon reproductible dans les différents échantillons.

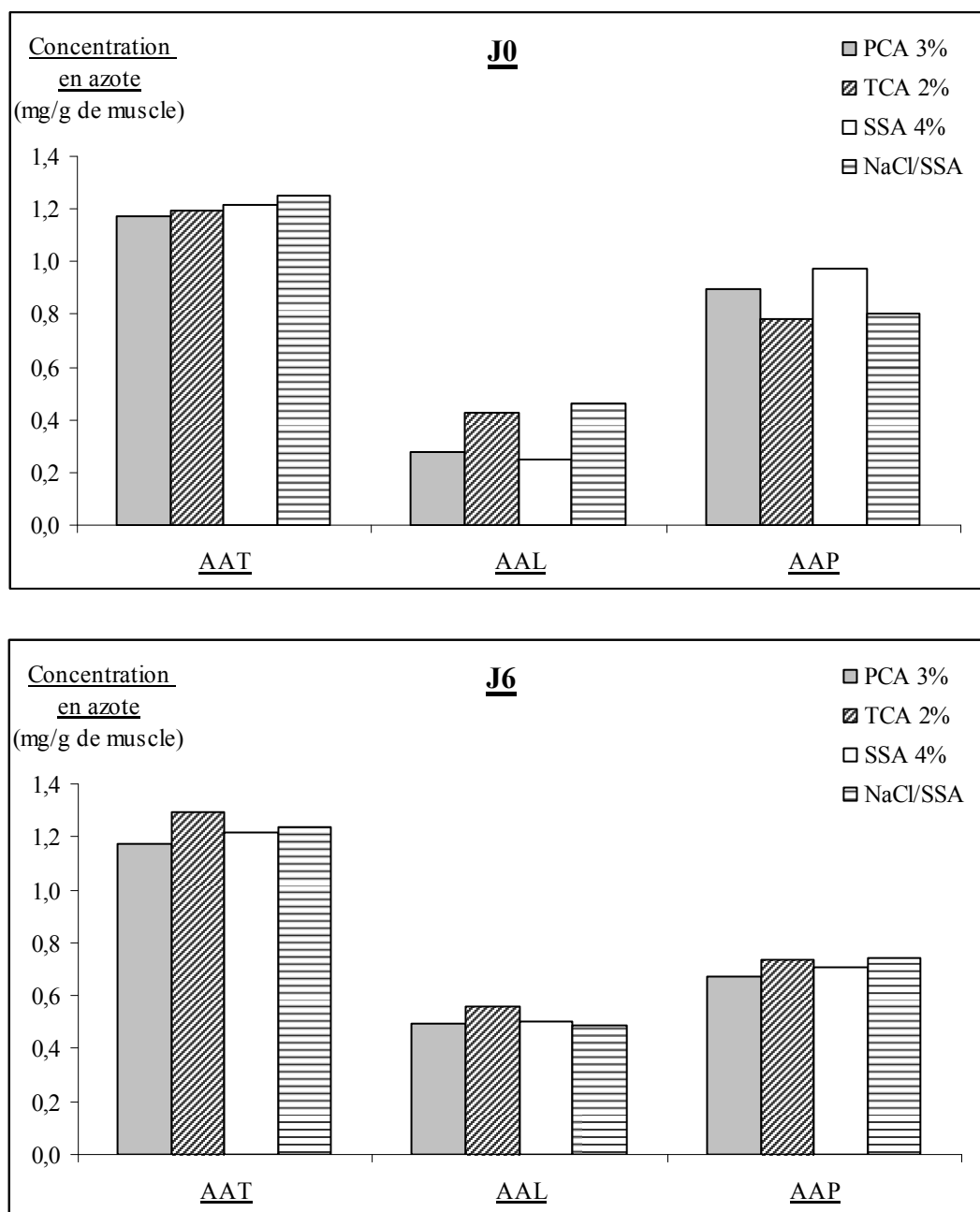
Afin d'optimiser les conditions expérimentales, ces différentes étapes ont fait l'objet d'essais décrits ci-dessous.

### **1. Extraction des peptides**

#### **1.1. Principe**

Le matériel dans lequel sont inclus les peptides (aliment ou digesta) étant composé majoritairement de protéines, le principe retenu ici est de broyer la matrice et de précipiter les protéines, concentrant ainsi les peptides dans la phase soluble. Le surnageant est ensuite ultrafiltré sur membrane avec une limite d'exclusion à 5 kDa pour ne recueillir que la fraction contenant les constituants de faible poids moléculaire, compte tenu de la taille la

**Figure 25 :** Quantification des acides aminés des fractions peptidiques extraites à J0 et J6 à partir d'une truite.



Les acides aminés libres (AAL) et totaux (AAT) (après hydrolyse acide) sont analysés par chromatographie liquide échangeuse d'ions. Les dérivés d'acides aminés, obtenus en post-colonne après réaction à la ninhydrine, sont détectés à 570 et 440 nm. La fraction d'acides aminés peptidiques (AAP) est calculée par différence entre AAT et AAL.



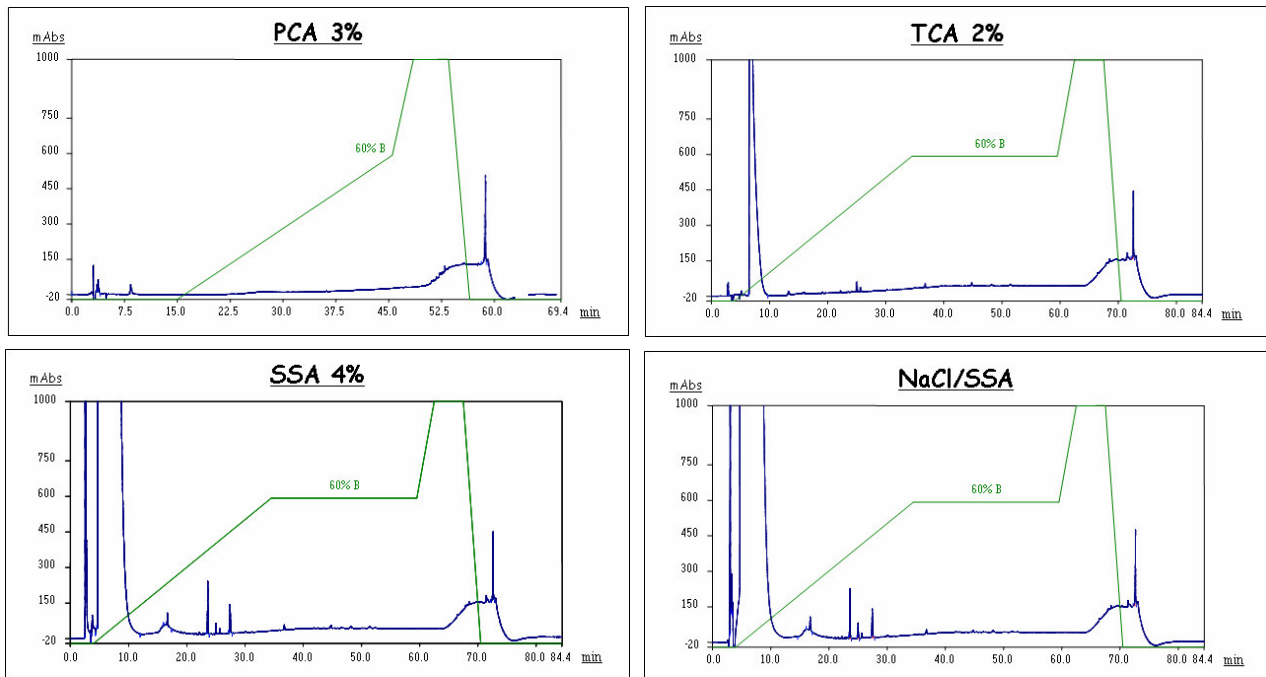
plus fréquente des peptides bioactifs. Un protocole optimal doit d'une part, permettre d'extraire un maximum de peptides et d'autre part, être compatible avec les analyses ultérieures, en RP-HPLC ou spectrométrie de masse.

### 1.2. Choix de l'agent précipitant

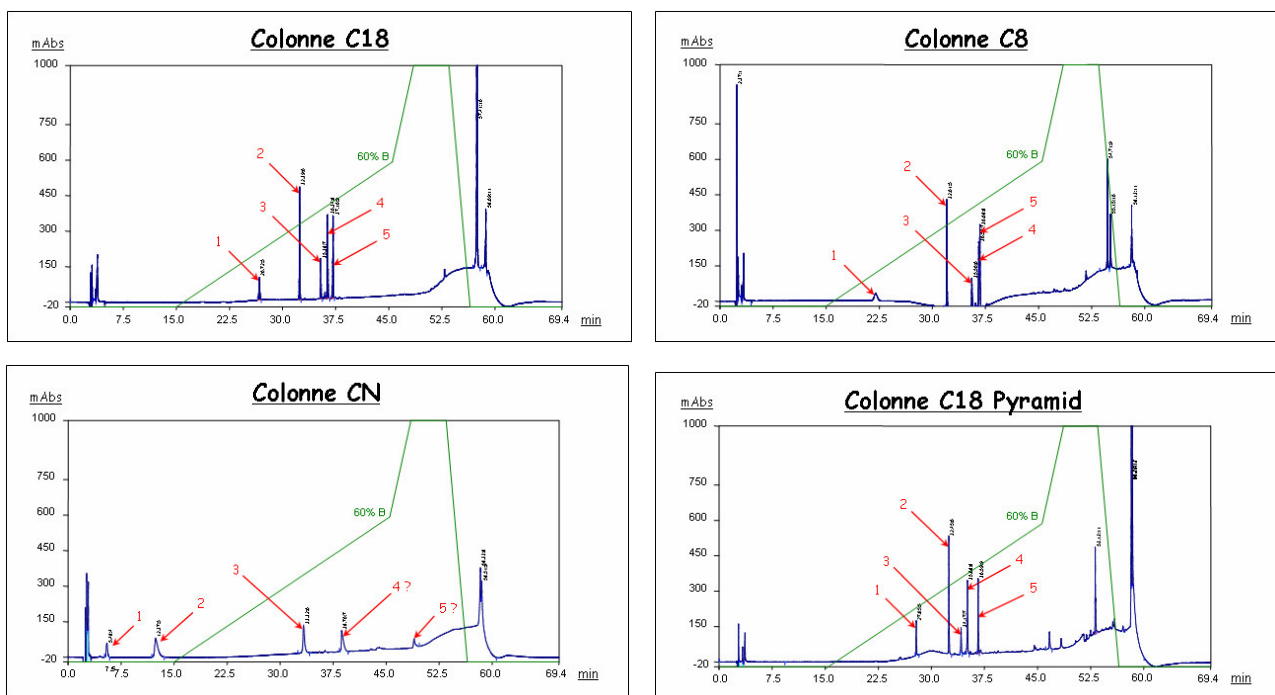
Ces essais, effectués en début de thèse, ont été réalisés sur la chair de truite Arc-en-ciel sous trois états : juste après abattage (J0), après 6 jours de conservation dans de la glace (J6) et après cuisson au bain-marie à 70°C pendant 5 min après 6 jours de conservation dans de la glace (J6 cuit). Nous avons comparé l'efficacité de l'extraction par l'acide perchlorique (PCA) à 3% (v/v), l'acide trichloroacétique (TCA) à 2% (m/v) et l'acide sulfosalicylique (SSA) à 4% (m/v), en utilisant comme indicateurs la concentration en azote et en acides aminés libres et peptidiques (**Figure 23**). Ces agents ainsi que leur concentration étaient choisis en référence à des travaux publiés sur l'extraction de peptides présents dans les aliments (Feidt et al., 1998 ; Hughes et al., 2002). Un autre protocole a été testé où l'on extrait les protéines et les peptides, en les solubilisant dans du sérum physiologique (NaCl à 0,9%), avant de précipiter les protéines avec du SSA 4% (Carnegie et al., 1983).

Le contenu en azote, déterminé par la méthode de Kjeldahl, n'est pas significativement différent selon les méthodes d'extraction utilisées (**Figure 24**). De même, la quantité d'acides aminés libres et peptidiques présente dans les extraits n'est pas affectée par le traitement d'extraction (**Figure 25**). L'ensemble de ces résultats quantitatifs montre que les 4 protocoles d'extraction sont équivalents. L'analyse par RP-HPLC (*technique décrite dans le paragraphe suivant*) des différents agents précipitants en solution révèle des différences d'absorbance à 220 nm en début de gradient d'éluant (entre environ 0 et 15% d'éluant) (**Figure 26**). Dans nos conditions, seul le PCA à 3% fournit un chromatogramme satisfaisant, contrairement aux autres agents où la forte absorbance observée en début de chromatogramme perturbe la détection des composés élués rapidement. Ainsi, le protocole d'extraction de peptides choisi est celui utilisant le PCA comme agent précipitant des protéines. Pour les aliments, les extractions ont été réalisées dans du PCA à 3 % soit 500 mM. Pour les digesta, nous avons diminué la concentration de PCA à 170 mM, la présence trop importante de PCA dans les extraits rendant difficile une analyse directe en MALDI-ToF (*cf paragraphe 3.2.*). L'utilisation d'une concentration plus faible de PCA a peut-être limité l'efficacité de la précipitation des protéines mais l'ultrafiltration ultérieure permettait d'assurer une complète déprotéinisation.

**Figure 26 :** Analyse en RP-HPLC à 220 nm des différents agents précipitants des protéines testés (PCA 3%, TCA 2%, SSA 4%, NaCl/SSA).



**Figure 27 :** Analyse en RP-HPLC à 220 nm d'un mélange standard de cinq peptides (YG, VYV, YGGFM, YGGFL, DRVYIHPF) avec quatre colonnes différentes (C18, C8, CN, C18 Pyramid).



## 2. Séparation des peptides par RP-HPLC

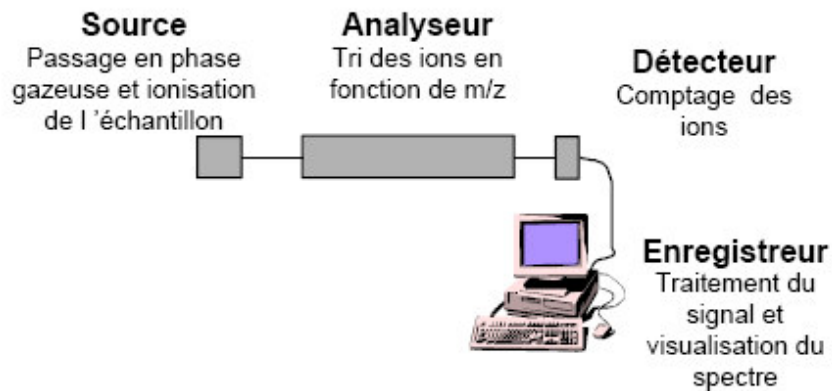
### 2.1. Principe

La chromatographie liquide haute pression ou haute performance (HPLC) est une technique de séparation des molécules basée sur les différences d'affinité entre deux phases, stationnaire et mobile. En HPLC en phase inverse ou RP-HPLC, la phase stationnaire (la colonne) se caractérise par son apolarité. Elle est constituée par des silices apolaires greffées à des chaînes carbonées de 2 à 18 atomes de carbone (C2 à C18). La phase mobile ou éluant, initialement polaire et hydrophile, est rendue de plus en plus hydrophobe. La séparation est fondée sur les interactions hydrophobes entre les molécules à séparer et la phase stationnaire. Ainsi, plus le soluté est apolaire (hydrophobe), plus il est retenu initialement sur la phase solide stationnaire. A l'inverse, plus un soluté est polaire (hydrophile), plus il est entraîné rapidement par la phase mobile qui, par la suite, entraîne les composés hydrophiles à mesure de l'augmentation de son hydrophobicité.

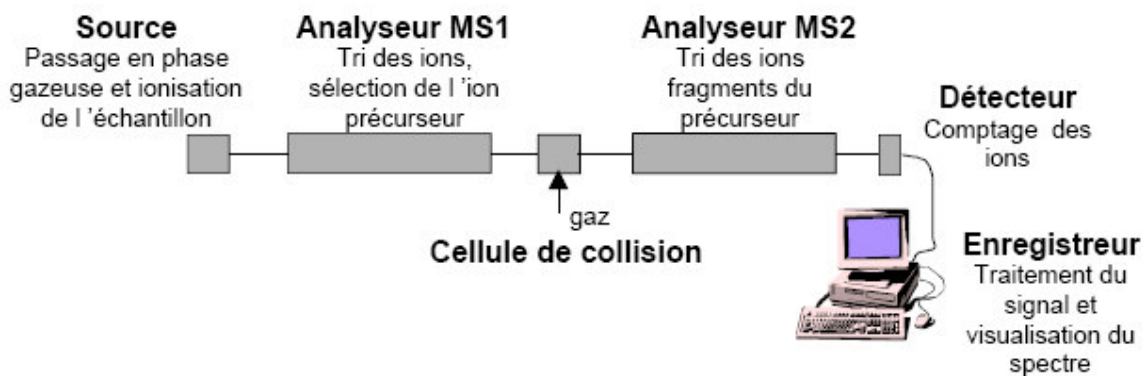
### 2.2. Choix de la colonne

Afin de comparer leurs performances, différentes colonnes (C18, C8, CN, C18 Pyramid) ont été utilisées pour séparer un mélange de 5 peptides standards. L'élution des différents peptides a été réalisée à l'aide d'un gradient de deux solvants : solvant A, 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) dans de l'eau et solvant B, 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) dans de l'acétonitrile (ACN) 100%. Le gradient d'élution utilisé est le suivant : 0% B de 0 à 5 min, 0-60% B de 5 à 35 min, 60-100% B de 35 à 38 min, 100% B de 38 à 43 min, 100-0% B de 43 à 46 min (adapté de Flores et al., 2000). La séparation était réalisée à un débit de 0,9 ml/min et à 30 °C. La détection a été réalisée à 220 nm, longueur d'onde spécifique des liaisons peptidiques. Les résultats d'analyse par RP-HPLC dans ces conditions ont révélé une meilleure séparation des peptides avec les colonnes NUCLEOSIL C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm, 100 Å, CIL CLUZEAU) et NUCLEODUR® C18 Pyramid (4,6 x 250 mm, 5µm, 100 Å, MACHEREY-NAGEL) (**Figure 27**). Cette dernière colonne a la particularité d'avoir des groupements polaires greffés sur la silice en plus des chaînes carbonées C18. Ce type de colonne paraît donc adapté à la séparation d'un mélange hétérogène de composés à la fois hydrophobes et hydrophiles que représentent nos extraits musculaires de peptides. C'est sur la colonne C18 Pyramid que s'est porté notre choix. Des fractions de 0,5 ml de chaque échantillon ont été collectées en sortie de colonne pour des analyses par spectrométrie de masse.

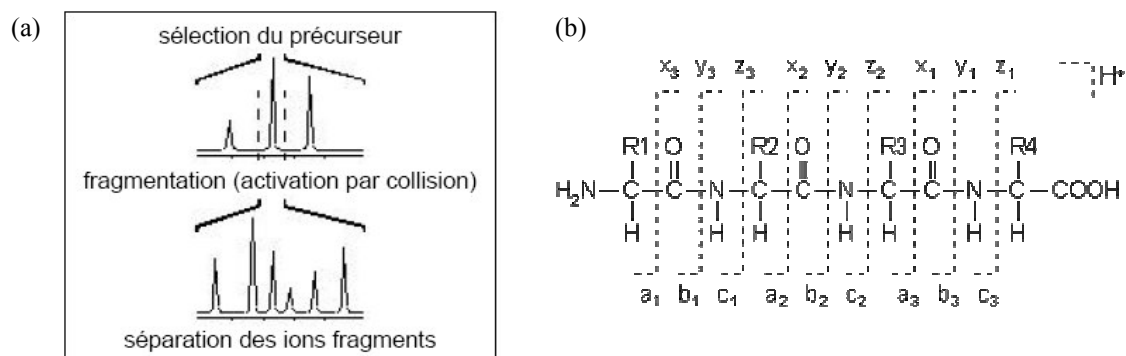
**Figure 28** : Schéma de principe d'un spectromètre de masse.



**Figure 29** : Schéma de principe d'un spectromètre de masse en tandem.



**Figure 30** : Principe général de l'obtention d'un spectre de fragmentation MS/MS (a) et nomenclature de Roepstorff et Fohlman (1984) des ions générés lors de la fragmentation d'un peptide (b).



### 3. Caractérisation et identification des peptides par spectrométrie de masse

Dans le but de caractériser ou d'identifier les peptides présents dans les aliments, les digesta et le plasma, nous avons eu recours à plusieurs méthodes de spectrométrie de masse (MALDI-ToF, ESI-IT MS/MS par infusion ou après séparation par nano-HPLC, HPLC-ESI-Q-ToF MS/MS). La démarche générale était d'effectuer dans un premier temps une analyse MALDI-ToF ou ESI-Q-ToF, techniques nous permettant d'observer la masse des composés ionisables présents dans les extraits, puis dans un deuxième temps, de rechercher leur séquence en utilisant la spectrométrie de masse en tandem ou MS/MS.

#### 3.1. Principe général

Un spectromètre de masse permet de mesurer le rapport masse/charge ( $m/z$ ) des ions formés à partir de l'échantillon analysé. Il se compose de trois parties distinctes (**Figure 28**) :

- une source d'ions dans laquelle se produit le passage en phase gazeuse de l'échantillon à analyser et l'ionisation des molécules ;
- un analyseur, en temps de vol, quadripolaire ou à trappe ionique, qui permet de trier les ions en fonction de leur rapport  $m/z$  ;
- un détecteur qui mesure, en fonction des différentes valeurs de  $m/z$ , l'intensité du signal qui leur correspond.

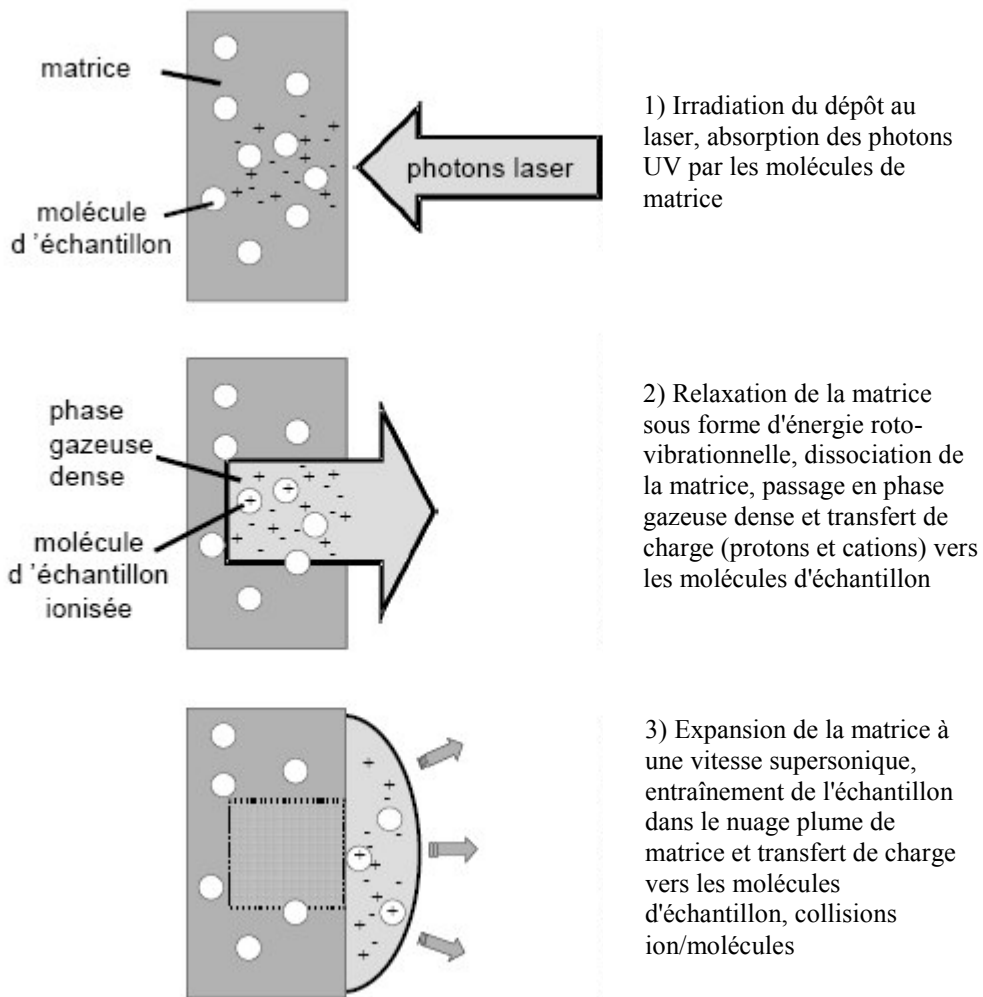
Quant à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), elle combine deux analyses MS, dans le temps (ESI-IT MS/MS) ou dans l'espace (ESI-Q-ToF MS/MS) (**Figure 29**). Dans les deux cas, un ion précurseur ou "parent" est sélectionné et fragmenté puis les rapports  $m/z$  des fragments sont mesurés. Dans le cas des peptides, la formation des ions fragments dépend de leur séquence et état de charge. Les ions formés sont très spécifiques et ont été caractérisés par Roepstorff et Fohlman (1984) (**Figure 30**). Ainsi, le profil d'un spectre MS/MS de bonne qualité fournit des informations suffisamment précises pour identifier et/ou caractériser le composé précurseur.

#### 3.2. MALDI-ToF

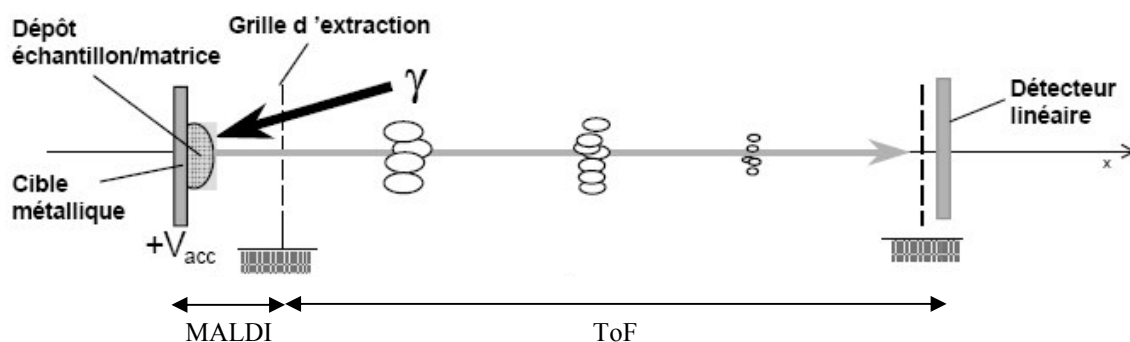
##### 3.2.1. Principe

La désorption laser assistée par une matrice ou MALDI pour *Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation* est une technique pouvant s'appliquer à une large gamme de

**Figure 31** : Schéma de principe de l'ionisation par MALDI.



**Figure 32** : Schéma de principe de l'analyseur en temps de vol (ToF) en mode linéaire.



molécules. Ses atouts sont une bonne précision de mesure de masse, une mise en œuvre relativement simple et une grande rapidité d'analyse. Pour analyser un échantillon, celui-ci est co-cristallisé avec une matrice sur une surface métallique, la cible. Pour l'étude des peptides, la matrice utilisée est l' $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique ou  $\alpha$ -CHCA. Un faisceau laser vient ensuite percuter le cristal. L'irradiation laser provoque l'éjection des molécules de l'échantillon et de la matrice en phase gazeuse : c'est la désorption (**Figure 31**). L'échantillon est ionisé majoritairement par transfert de protons, soit avant désorption dans la phase solide, soit par collision après désorption avec la matrice excitée pour former des ions essentiellement monochargés  $[M + H]^+$ .

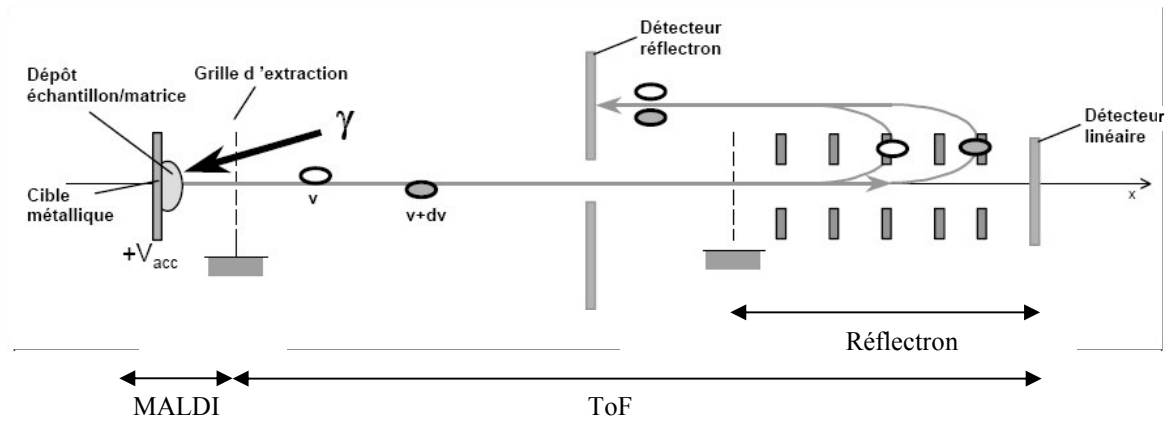
Ces ions sont ensuite séparés dans un analyseur en temps de vol ou ToF pour *Time of Flight* : ils sont accélérés par un champ électrique et séparés dans un tube de vol selon leur rapport  $m/z$ . L'analyseur ToF peut être utilisé en mode linéaire ou en mode réflectron. En mode linéaire, les ions accélérés entrent dans un tube de vol libre de champ et y progressent, d'autant plus rapidement que leur rapport  $m/z$  est faible, jusqu'à atteindre le détecteur (**Figure 32**). Le mode linéaire est adapté pour la mesure de masses de protéines entières ou de peptides pouvant dépasser 5 kDa, avec une précision de 0,5%. En mode réflectron, un miroir électrostatique placé à l'extrémité du tube de vol impose un champ électrique s'opposant à la progression des ions. Les ions font donc demi-tour et sortent du réflectron avec une vitesse longitudinale de sens opposé à leur vitesse initiale, avant d'être détectés (**Figure 33**). Ce mode permet d'améliorer la résolution des pics et la précision de la mesure de masse (0,05%). Le miroir électrostatique permet aussi d'allonger la distance de vol sans augmenter la taille de l'instrument. L'analyse en mode réflectron est adaptée à des molécules de masse inférieure à 4 kDa.

### 3.2.2. Optimisation des conditions d'analyse

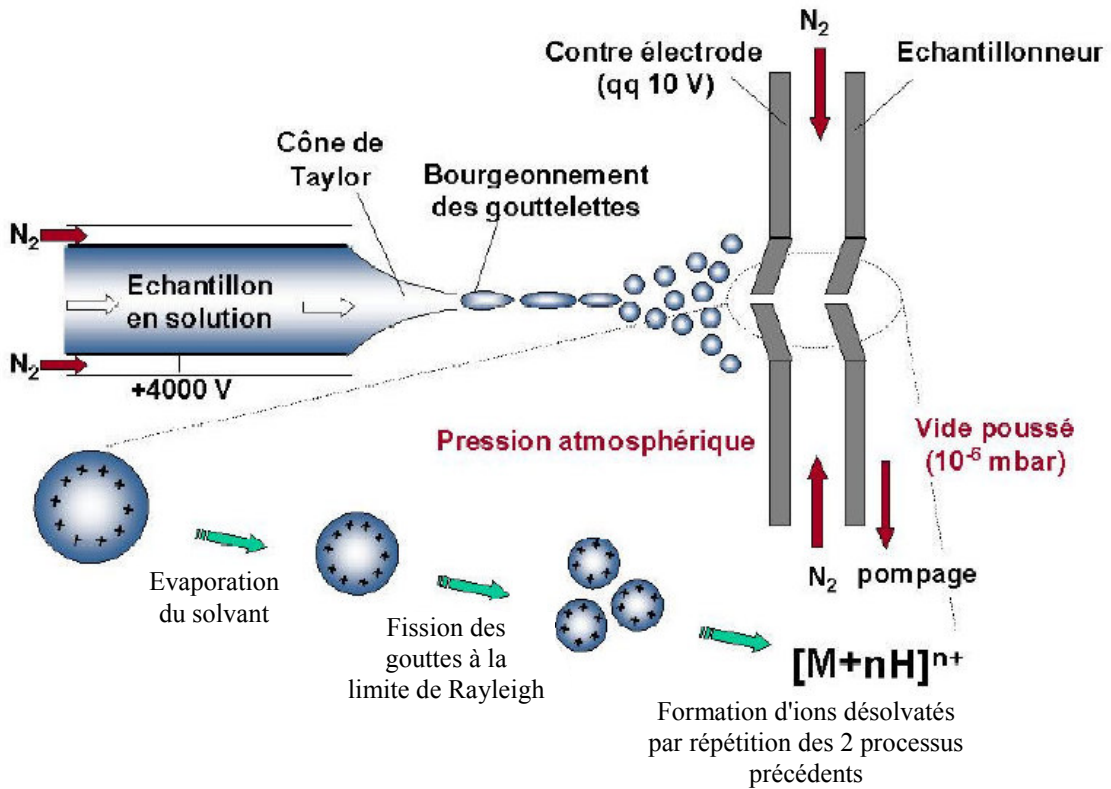
Les premiers essais ont été effectués sur des extraits provenant des aliments étudiés. Deux types de problème d'ordre méthodologique sont apparus.

Tout d'abord, en présence de PCA à 3% (500 mM), la co-cristallisation matrice/échantillon n'était que très partielle et les spectres résultants étaient de mauvaise qualité. Nous avons donc traité l'extrait par un passage sur membrane de type C18 (Vivascience). Cette membrane a une affinité pour les peptides et permet d'éliminer le PCA. L'élution des peptides a été faite avec un milieu parfaitement compatible avec l'analyse MALDI-ToF (ACN 50%, TFA 0,1%). Dans ces conditions, la cristallisation et l'acquisition des spectres étaient satisfaisantes. Il faut toutefois remarquer que toute étape

**Figure 33** : Schéma de principe de l'analyseur en temps de vol (ToF) en mode réflectron.



**Figure 34** : Schéma de principe de l'ionisation par électrospray (ESI).





supplémentaire de purification risque de provoquer la perte de certains des composés de l'extrait. Ainsi, pour les contenus digestifs contenant du PCA mais en plus faible concentration (170 mM), nous n'avons pas appliqué cette étape. En effet, malgré la présence d'un halo autour de la cible MALDI, la cristallisation s'opérait correctement.

Par ailleurs, la détection de pics ayant des  $m/z$  en deçà de 600 est difficile en raison de la présence de nombreux pics de matrice dans cette zone. Nous avons par conséquent procédé à un essai inspiré d'une publication de Guo et al. (2002), dans laquelle le cétrimonium bromide ou CTAB est ajouté à la matrice dans le but de "rassembler" tous les pics de matrice en un seul. Toutefois, nous avons dû diminuer fortement le signal de détection pour obtenir un résultat similaire, les pics peptidiques provenant des échantillons devenant par là même inexploitable. Finalement, nous avons eu recours à des analyses du type ESI-Q-ToF MS/MS pour caractériser voire identifier les composés de faible poids moléculaire dans les contenus digestifs et le plasma (*cf* paragraphe 3.4.).

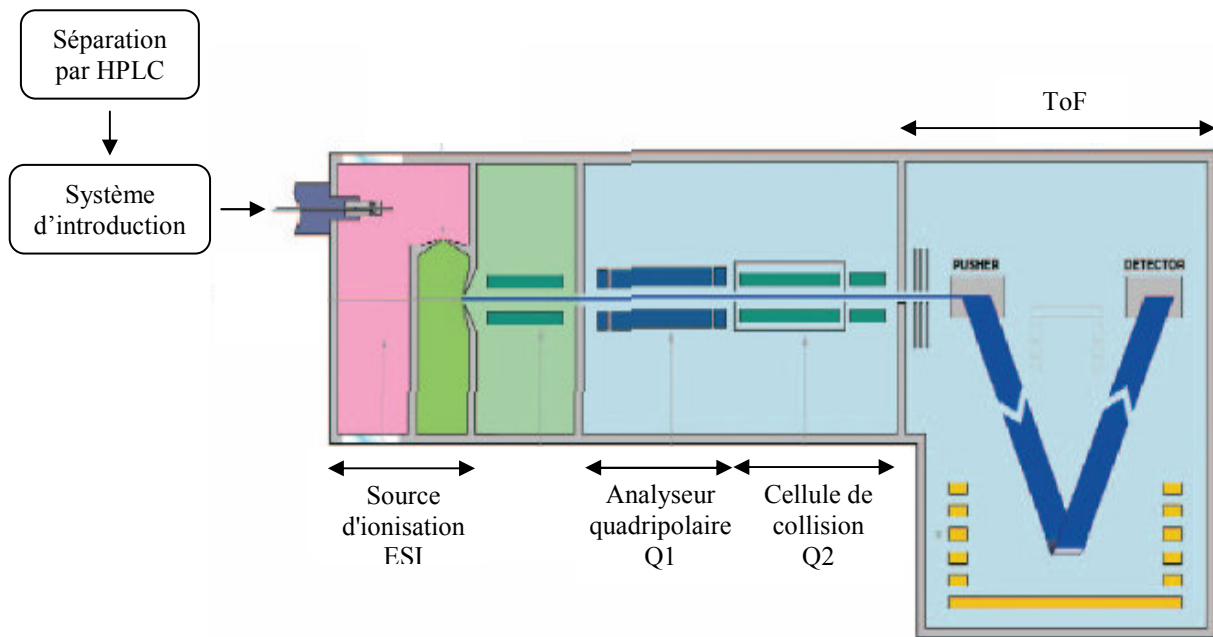
Enfin, une dernière difficulté que nous avons rencontrée initialement a trait à l'exploitation des spectres. En effet, une analyse en MALDI-ToF génère une quantité extrêmement importante de données puisque les intensités détectées sont enregistrées avec un pas inférieur à 0,05 unité  $m/z$  (ex : 500, 500,04, 500,08  $m/z$ , etc). A titre d'exemple, la liste des intensités détectées dans la gamme de 500 à 5000  $m/z$  représente un fichier de plus de 40000 lignes, dont la majorité correspond à des signaux du bruit de fond. La représentation sous forme de spectre fournit une excellente simplification visuelle des données, mais présente des limites évidentes quand il s'agit d'exploiter les résultats de nombreux échantillons (par exemple évaluer la reproductibilité de répliqués, comparer des échantillons provenant de traitements différents, etc). Nous avons donc établi une collaboration avec la faculté de pharmacie de Montpellier, où un algorithme de traitement des données spectrales brutes a été développé (Reynès et al., 2005).

### 3.3. Nano-ESI-IT MS/MS et nano-HPLC-ESI-IT MS/MS

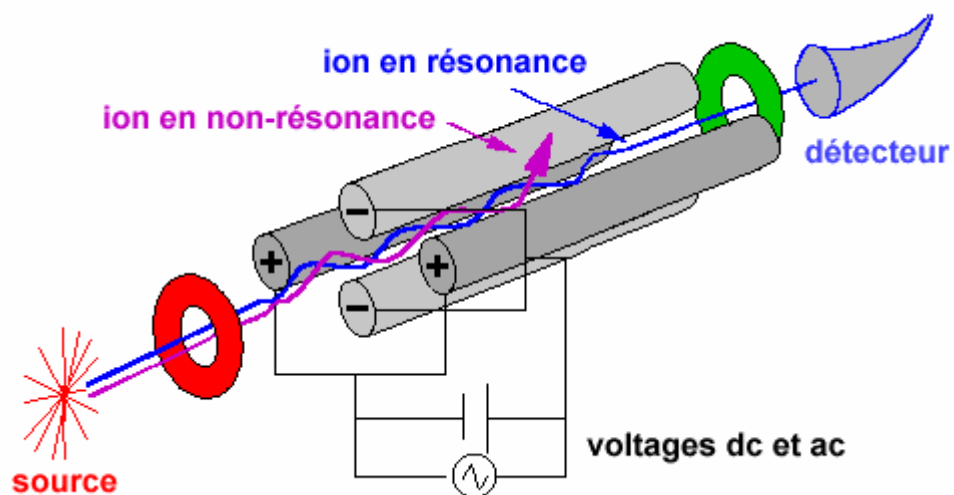
#### 3.3.1. Principe

L'électronébulisation ou *nano-electrospray* (ESI pour *Electrospray Ionisation*) repose sur l'introduction d'une solution d'échantillon dans un capillaire très fin porté à un haut potentiel électrique (**Figure 34**). L'introduction de l'échantillon dans l'aiguille peut se faire manuellement : on parle alors d'analyse ESI par infusion ou nano-ESI. Néanmoins, pour augmenter les performances de l'analyseur, la source *nano-electrospray* peut être

**Figure 35** : Schéma de principe du système HPLC-ESI-Q-ToF.



**Figure 36** : Schéma de principe de l'analyseur quadripolaire.



alimentée en continu par une chaîne nano-HPLC qui permet de séparer les analytes et d'obtenir une meilleure électro-ébulisaison. Il s'agit de la nano-HPLC-ESI. Quelle que soit la méthode d'introduction de l'échantillon, un champ électrique intense appliqué à la sortie du capillaire provoque la formation d'un nuage de gouttelettes chargées qui traversent simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression dans la direction de l'analyseur du spectromètre de masse. Les ions formés en mode positif sont des ions multichargés de type  $[M + nH]^{n+}$ . Ils sont analysés dans un analyseur du type "trappe ionique" ou IT pour *Ion Trap* par spectrométrie de masse en tandem (*cf paragraphe 3.1.*).

### 3.3.2. Optimisation des conditions d'analyse

La démarche générale que nous avons fixée initialement était de chercher à identifier les pics précédemment détectés par MALDI-ToF. Nous avons donc dans un premier temps opté pour une analyse en infusion, sur les extraits provenant de chair de truite, où nous fragmentions spécifiquement des ions correspondants à ceux précédemment listés. Cette approche a rapidement montré ses limites : ces ions, s'ils pouvaient même être détectés, étaient en général de faible intensité et la fragmentation peu efficace. Plusieurs raisons peuvent être avancées. D'une part, la présence de contaminants dans l'extrait peut perturber la formation du spray. Par ailleurs, les échantillons injectés étaient très riches en analytes, ce qui peut engendrer des phénomènes de suppression de charge lors de l'ionisation. Enfin, orienter la recherche sur les pics détectés en MALDI-ToF n'est pas toujours possible puisqu'il s'agit de deux modes d'ionisation différents, où une même molécule n'est pas nécessairement ionisée et détectée de la même façon.

En conséquence, pour les analyses ultérieures (viande et contenus digestifs), nous avons choisi la méthode nano-HPLC-ESI-IT MS/MS, qui permet d'éliminer les contaminants non peptidiques, de séparer les analytes ionisables et d'assurer un flux continu vers la source. Cette méthode a permis d'obtenir des spectres de fragmentations de bonne qualité et d'identifier certains peptides, toutefois les composés ainsi détectés ne correspondent qu'en partie à ceux détectés en MALDI-ToF (*cf publications n°1 et n°2*).

## 3.4. HPLC-ESI-Q-ToF

### 3.4.1. Principe (Figure 35)

Cette technique utilise le couplage de 2 analyseurs : un analyseur quadripolaire ("Q") et un temps de vol ("ToF"). L'analyseur quadripolaire (**Figure 36**) est constitué de

**Figure 37** : Schéma de principe de l'analyse en mode Scan (a) ou MS/MS (b) par HPLC-ESI-Q-ToF.



**Tableau 12** : Conditions chromatographiques utilisées pour chaque type de colonnes testées pour des analyses en nano-HPLC-ESI-Q-ToF.

Colonne	Caractéristiques	% de carbone	Phases mobiles	Gradient	Débit
Symmetry C18	2,1 x 100 mm 3,5 $\mu\text{m}$	19%	A : acide formique 0,1% / eau B : acide formique 0,1% / ACN	0% B $\rightarrow$ 95% B 27 min	0,2 ml.min <sup>-1</sup>
Atlantis C18	2,1 x 150 mm 3 $\mu\text{m}$	12%			
Jupiter C12	2 x 150 mm 4 $\mu\text{m}$	17%		20% B $\rightarrow$ 100% B 10 min	
Hypercarb Carbone	2,1 x 100 mm 3 $\mu\text{m}$	100%			

**Tableau 13** : Temps de rétention (en minutes) après analyses en nano-HPLC-ESI-Q-ToF de solutions standards de carnosine et d'ansérine à 0,5  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dans de l'acide formique 0,1% / eau avec différentes colonnes HPLC.

	Symmetry C18	Atlantis C18	Jupiter C12	Hypercarb Carbone
<b>Carnosine</b>	1,22	1,90	1,52	1,75
<b>Ansérine</b>	1,23	1,94	1,53	1,83

quatre barreaux à section cylindrique ou hyperbolique soumis à des tensions continues. Pour une valeur donnée de tension, seul un type d'ion de rapport  $m/z$  donné possède une trajectoire stable lui permettant de parcourir l'axe central des quatre barreaux, les autres étant éjectés. Ainsi, en effectuant un balayage de tension, on fait un balayage des ions susceptibles de le traverser. Le second analyseur ToF est un appareil à haute résolution permettant de mesurer la masse exacte et de déterminer la formule brute d'un composé détecté. Un signal au niveau du détecteur à un temps donné du balayage correspond à un  $m/z$  donné.

L'analyse peut être effectuée selon deux modes : le mode Scan ou MS/MS (**Figure 37**). Le mode Scan permet de faire l'acquisition de toutes les masses allant de 50 à 1500  $m/z$ . Pour cela, la cellule de collision Q2 est inactive afin de laisser passer tous les ions vers le second analyseur ToF. Le mode MS/MS permet de sélectionner un ion parent parmi tous les ions formés dans la source et de le fragmenter dans la cellule de collision Q2.

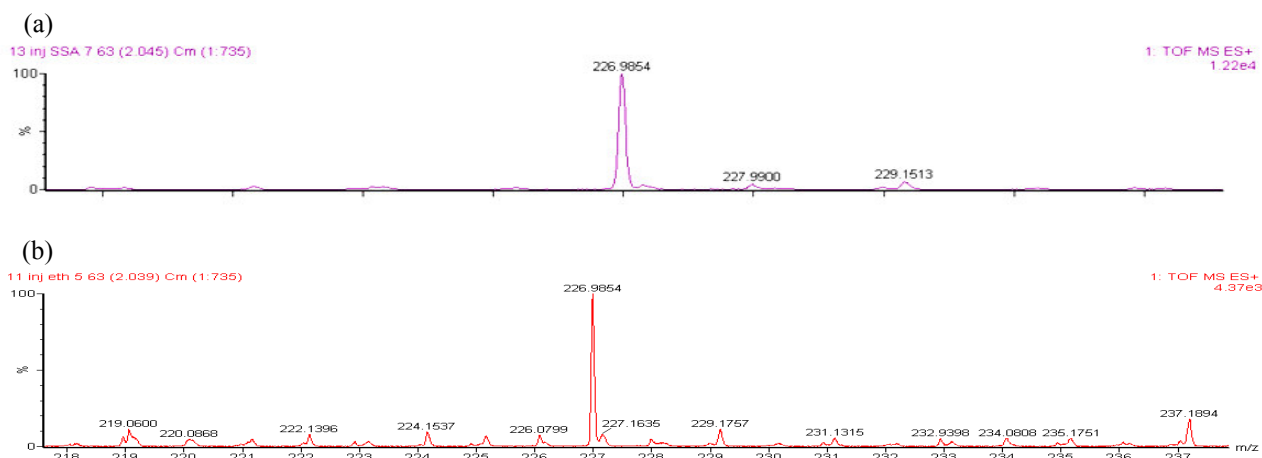
Enfin, une HPLC est couplée au spectromètre de masse en amont permettant ainsi une séparation des analytes présents dans nos échantillons avant analyse.

#### 3.4.2. Optimisation des conditions d'analyse

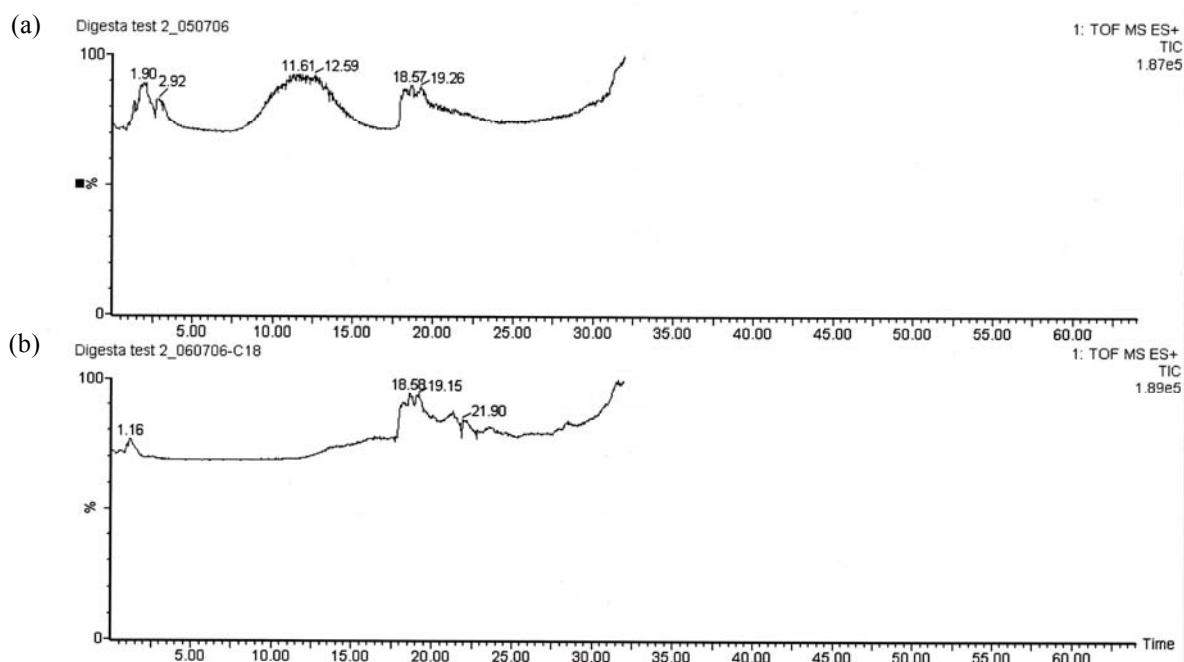
La démarche entreprise ici était de caractériser et d'identifier les peptides de petite taille (< 1500 Da) présents dans le plasma et ceux non détectés par MALDI-ToF et par nano-HPLC-ESI-IT MS/MS dans les digesta. La préparation d'échantillons (digesta et plasma) et la méthode d'analyse ont été mises au point. Le choix de la colonne HPLC a été déterminé à partir de solutions standards de carnosine et d'ansérine. Quatre colonnes ont été testées (Symmetry C18, Atlantis C18, Jupiter C12 et Hypercarb Carbone) avec des conditions chromatographiques spécifiques (**Tableau 12**). Nous avons choisi d'utiliser la colonne Atlantis C18 car elle retient davantage la carnosine et l'ansérine (**Tableau 13**). La séparation par HPLC est réalisée à l'aide d'un gradient de deux solvants (solvant A : acide formique 0,1%/eau et solvant B : acide formique 0,1%/ACN) : 0-95% B de 0 à 27 min. Le débit utilisé est de 0,2 ml.min<sup>-1</sup>.

Les premiers essais d'analyse HPLC-ESI-Q-ToF ont été réalisés sur du plasma de porc. Nous avons testé deux méthodes de préparation des échantillons plasmatiques auxquels nous avons rajouté une charge en carnosine (400 µg.ml<sup>-1</sup> dans de l'acide formique 0,1%/ACN). Deux agents de précipitation des protéines ont été testés : le SSA et l'éthanol. L'utilisation du SSA permet d'augmenter la sensibilité de l'analyse par rapport à l'éthanol

**Figure 38** : Analyse de la carnosine par nano-HPLC-ESI-Q-ToF d'échantillons de plasma préparés avec deux agents précipitant des protéines, le SSA (a) et l'éthanol (b).



**Figure 39** : Analyse par nano-HPLC-ESI-Q-ToF des échantillons de digesta préparés par précipitation avec du KOH (a) et purification sur membrane C18 (b).



(**Figure 38**). Les échantillons de plasma ont donc été préparés en utilisant le SSA comme agent précipitant des protéines.

L'analyse HPLC-ESI-Q-ToF des échantillons de digesta précipités au PCA à 170 mM puis ultrafiltrés à 5 kDa nécessite l'élimination du PCA car l'acidité et les ions Cl<sup>-</sup> présents dans nos échantillons perturberaient l'analyse. Nous avons testé deux méthodes de préparation : (1) la purification sur membrane C18 (Vivascience) et (2) la précipitation jusqu'à neutralité avec de l'hydroxyde de potassium (KOH). La purification sur membrane C18 élimine une grande partie des analytes présents dans les échantillons comparée à la précipitation par le KOH (**Figure 39**). Les échantillons de digesta sont donc préparés en utilisant le KOH pour précipiter les ions Cl<sup>-</sup> provenant du PCA.

Les échantillons ont été analysés tout d'abord par HPLC-ESI-Q-ToF en mode Scan, puis les données ont été traitées ensuite par le logiciel Markerlynx qui permet l'intégration des pics chromatographiques (correction par rapport à une valeur de référence en masse) et l'alignement des données de masse. Couplé à des analyses statistiques, nous avons obtenu une liste des pics (masses) détectés dans au moins deux échantillons à un même temps de rétention. A partir de cette liste, une deuxième analyse a été réalisée en mode MS/MS ciblée sur les masses obtenues lors de la précédente analyse afin de pouvoir identifier leur séquence. A ce niveau, nous avons été confronté à des difficultés dans l'identification des analytes. En effet, le logiciel Markerlynx présente certaines limites. Par exemple, le fait que l'abondance dans un échantillon donné d'une masse déterminée soit estimée comme nulle ne signifie pas forcément que cette masse n'est pas présente dans l'échantillon considéré. Cela signifie que cette masse n'a pas répondu aux critères définis dans la méthode de traitement du logiciel. D'autre part, comme il s'agit de valeurs normalisées par échantillon, toutes les masses mises en évidence par le logiciel ont été vérifiées "manuellement" pour l'ensemble des échantillons analysés, afin de s'assurer que ces masses sont bien présentes et qu'elle ne correspondent pas à du bruit de fond. De plus, ne possédant pas de logiciel adéquat nous permettant d'analyser les spectres MS/MS directement après analyse et ces spectres n'étant pas compatibles avec le logiciel utilisé après analyse en nano-HPLC-ESI-IT MS/MS, nous n'avons pu identifier avec certitude de peptides de petite taille (< 1500 Da) présents dans les plasmas et les digesta.

**Tableau 14** : Teneurs en ansérine, glutathion et acides aminés contenus dans les autres peptides (autres AAP) du filet dorsal de truite – Influence de la conservation et de la cuisson.

	Traitements			Effets <sup>a</sup>	
	J0	J7	J7c	conservation	cuisson
<b>Ansérine</b>	15,3 ± 0,84	15,0 ± 0,76	13,0 ± 0,59	NS	*
<b>Glutathion</b>	0,31 ± 0,02	0,34 ± 0,01	0,30 ± 0,02	NS	*
<b>Autres AAP</b>	8,01 ± 1,06	7,66 ± 0,50	7,92 ± 0,47	NS	NS

Moyenne ± erreur standard (n = 6) en µmoles/g de tissu.

<sup>a</sup> NS: non significatif ; \* :  $P < 0,05$ .

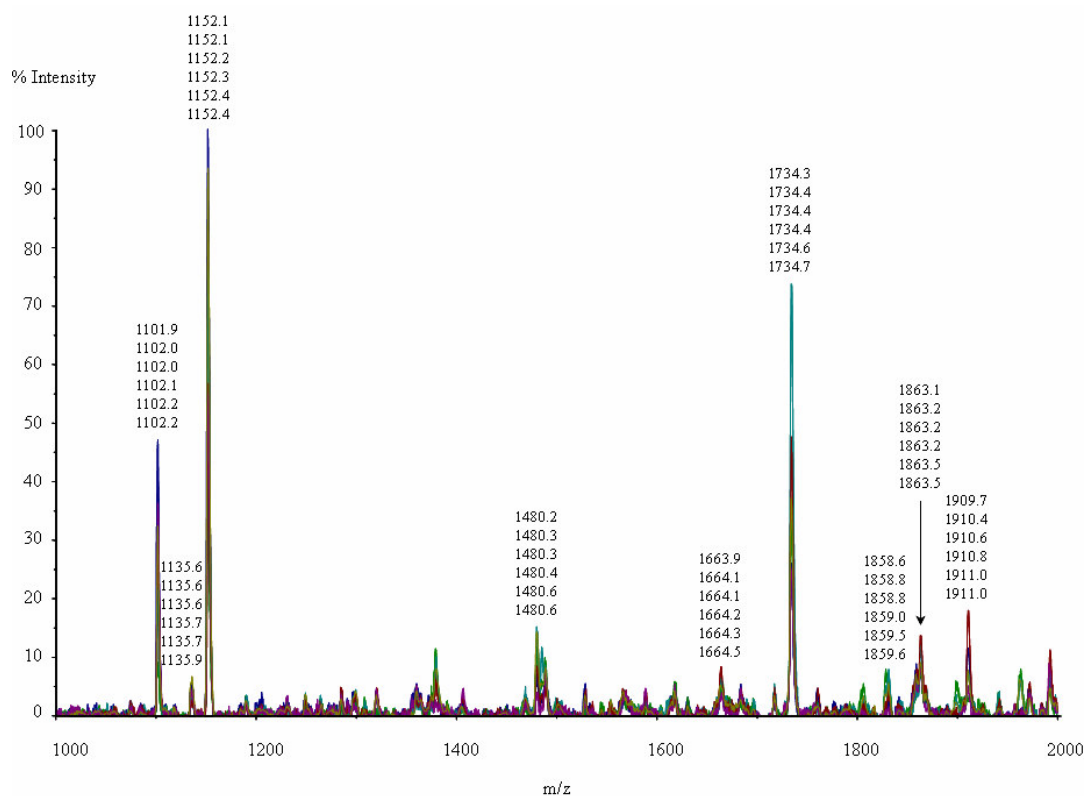
**Tableau 15** : Teneurs en carnosine, ansérine, glutathion et acides aminés contenus dans les autres peptides (autres AAP) du muscle pectoral profond de bovin – Influence de la maturation et de la cuisson.

	Traitements			Effets <sup>a</sup>	
	J0	J14	J14c	maturation	cuisson
<b>Carnosine</b>	22,43 ± 1,02	22,73 ± 0,83	18,52 ± 0,59	NS	***
<b>Ansérine</b>	4,29 ± 0,45	3,92 ± 0,37	3,26 ± 0,28	NS	**
<b>Glutathion</b>	0,89 ± 0,05	0,70 ± 0,04	0,44 ± 0,03	**	***
<b>Autres AAP</b>	3,75 ± 0,33	9,62 ± 1,30	13,92 ± 0,90	***	***

Moyenne ± erreur standard (n = 6) en µmoles/g de tissu

<sup>a</sup> NS : non significatif ; \*\* :  $P < 0,01$  ; \*\*\* :  $P < 0,001$ .

**Figure 40** : Spectres obtenus par analyse en spectrométrie de masse par MALDI-ToF des extraits de viande (pectoral profond) provenant de 6 bovins après 14 jours de maturation (exemple d'une zone comprise entre 1000 et 2000 m/z).





## **II. ETUDE DES PEPTIDES DANS L'ALIMENT**

### **Introduction**

L'objectif de cette première partie de la thèse est de caractériser les oligopeptides (< 5 kDa) issus des protéines tissulaires ou non, présents à l'origine dans le muscle puis dans la chair au cours de la conservation/maturation et de la cuisson. Pour cela, nos études ont porté sur deux muscles très différents : le muscle blanc dorsal du filet de truite Arc-en-ciel (*cf publication n°1*), et le muscle pectoral profond de jeunes bovins Charolais (*cf publication n°2*). Le filet dorsal a été retenu car il constitue une partie majeure de la musculature de la truite. Le pectoral profond a été choisi en relation avec la seconde partie de la thèse sur la recherche de peptides alimentaires après la digestion gastro-intestinale. En effet, nous avons fait l'hypothèse qu'un muscle riche en collagène comme le pectoral profond présente des caractéristiques mécaniques et structurales moins propices à une digestion complète des protéines de la viande et pourrait donc être plus favorable à la production de peptides qu'un muscle moins riche en collagène. D'autre part, il a été montré que les peptides contenant de la proline sont plus résistants à l'hydrolyse enzymatique. Le collagène étant riche en proline, on peut s'attendre d'une part à trouver davantage de peptides dans la lumière digestive avec ce type de muscle et d'autre part à ce que ces peptides résistent également aux peptidases associées à l'épithélium lors de leur absorption. Ce modèle semble donc particulièrement intéressant pour la deuxième partie de la thèse qui consiste à essayer de mettre en évidence une libération de peptides alimentaires dans le compartiment sanguin.

Nous avons donc cherché à caractériser, d'une part, les peptides du muscle frais (J0) et, d'autre part, à suivre leur évolution au cours de différents processus technologiques de transformation du muscle conduisant à l'aliment prêt à être consommé :

- conservation pendant 7 jours dans la glace (J7) et cuisson au bain-marie à 70 °C pendant 5 min après 7 jours de conservation dans la glace (J7c) pour la truite ;
- maturation sous vide pendant 14 jours et à 4 °C (J14) et cuisson à 75 °C pendant 90 min après 14 jours de maturation (J14c) pour le bovin.

Nous sommes plus particulièrement intéressés à l'identification des peptides présents dans l'aliment cuit qui sera ensuite donné à manger à des porcs pour étudier

**Tableau 16** : Liste des peptides identifiés par nano-HPLC-ESI-IT MS/MS dans le pectoral profond cuit après 14 jours de maturation (J14c).

Fragment protéique	m/z (M+H <sup>+</sup> )	Séquence	Numéro d'accession de la protéine parent
Troponine T (23-38)	1734,9	APPPPAEVPEVHEEVH	gi 21038992
Troponine T (25-38)	1566,7	PPPAEVPEVHEEVH	gi 21038992
Nébuline (1036-1048)	1326,6	IPITAAKASRNIA	gi 1205990
Procollagène type I $\alpha$ 2 (1101-1118)	1661,8	PGPPGPPGVSGGGYDFGF	gi 6680980
Procollagène type IV $\alpha$ 2 (1099-1117)	1904,1	GLKGERGITGIPGLKGFFG	gi 36031080
Protéine cypher (303-319)	1735,9	EHAPVCTSQATTPLLPA	gi 83288256
Protéine cypher (132-251)	2157,2	LPIKDLTVDSASPVYQAVIK	gi 73587220

**Tableau 17** : Séquences potentiellement bioactives contenues dans les peptides identifiés dans le muscle pectoral profond cuit après 14 jours de maturation (J14c) (Base de données BioPep, Dziuba et al., 1999).

Séquence du fragment protéique	Séquence bioactive	Activité biologique
Procollagène type I $\alpha$ 2 (1101-1118) PGPPGPPGVSGGGYDFGF	GGY GY	Antihypertensif
	PGP PG GP	Antithrombotique
Procollagène type IV $\alpha$ 2(1099-1117) GLKGERGITGIPGLKGFFG	PG	Antithrombotique
Protéine cypher (303-319) EHAPVCTSQATTPLLPA	LLP	Antihypertensif
Protéine cypher (132-251) LPIKDLTVDSASPVYQAVIK	VY	Antihypertensif

l'impact de la digestion sur la génération de peptides issus de protéines carnées et leur assimilation.

### **Principaux résultats**

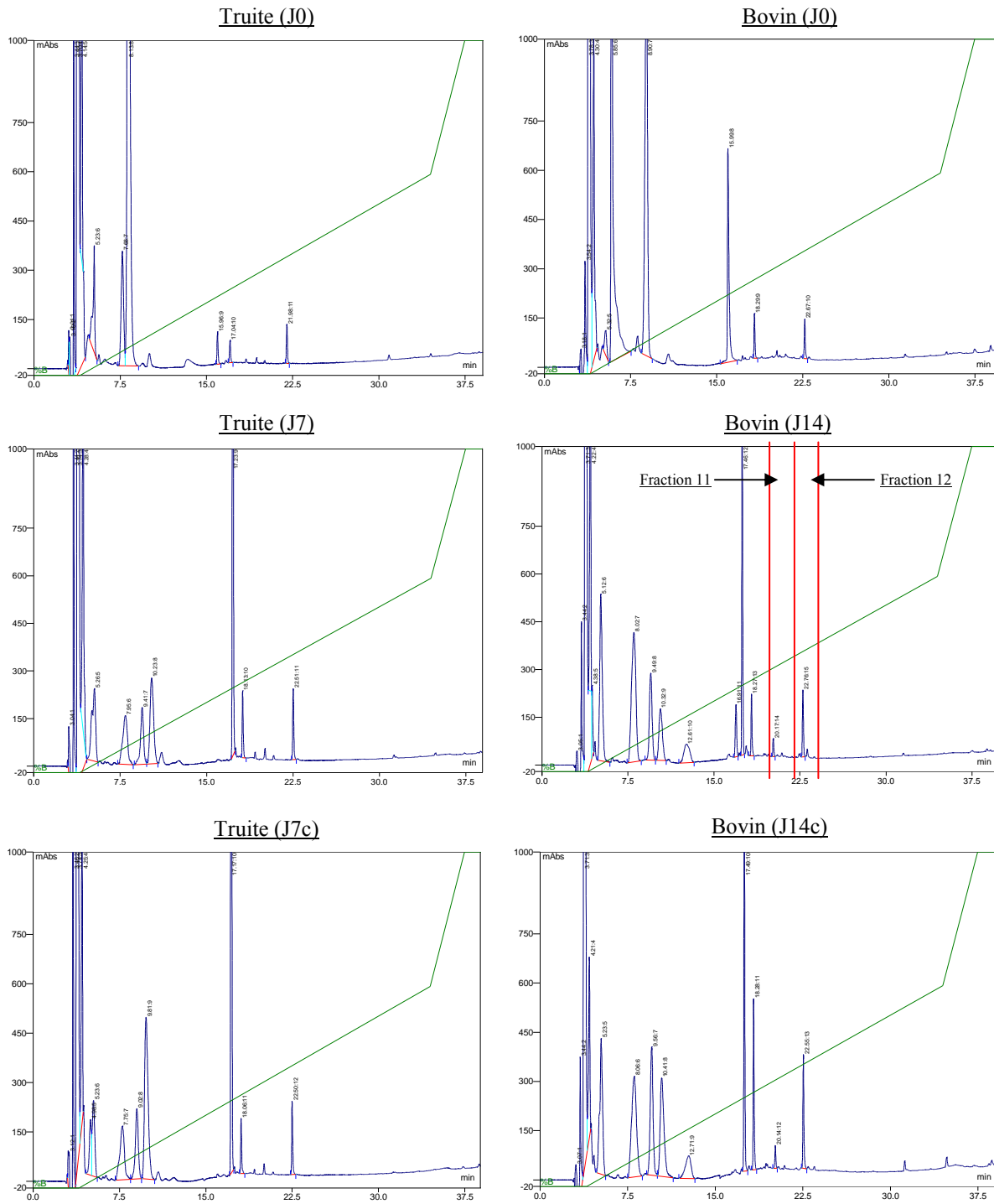
Dans le filet dorsal de la truite, les 2 seuls peptides présents en abondance étaient l'ansérine et le glutathion. Leurs concentrations n'étaient pas affectées par 7 jours de conservation dans la glace et légèrement diminuées par la cuisson (**Tableau 14**). L'analyse par spectrométrie de masse a cependant révélé l'apparition en quantité limitée mais très reproductible de petits peptides pendant la conservation et la cuisson. Les composés ainsi détectés n'ont pas été identifiés.

Dans le muscle pectoral profond de jeunes bovins, 89% des acides aminés peptidiques correspondaient à la carnosine, à l'ansérine et au glutathion. La maturation qui n'avait pas d'effet sur les concentrations en carnosine et ansérine, réduisait légèrement celle en glutathion. La cuisson a provoqué une diminution de leurs concentrations, légère pour la carnosine, plus importante pour les 2 autres (**Tableau 15**). Ces étapes ont aussi causé l'apparition de façon très reproductible de nombreux composés (**Figure 40**) puisque 7 composés étaient détectés dans le muscle à l'abattage, 18 après 14 jours de maturation et 92 après cuisson de la viande maturée. Les composés avec les masses les plus faibles disparaissaient pendant la maturation ( $m/z < 973,2$ ) ou la cuisson ( $m/z < 1664,2$ ). Ceux qui apparaissaient lors de la maturation et surtout de la cuisson étaient principalement des composés de plus grande taille, leur rapport  $m/z$  variant de 976,0 à 3546,4 dans la viande maturée et de 1523,3 à 4855,5 dans la viande maturée cuite. Parmi les peptides apparus après cuisson de la viande maturée, 7 ont été identifiés dont 2 qui avaient été détectés par spectrométrie de masse MALDI-ToF. Ces 7 peptides provenaient de la troponine T, de la nébuline, du procollagène et de protéines cypher (**Tableau 16**).

### **Résultats complémentaires**

Les analyses par RP-HPLC effectuées sur les extraits d'aliments (**Figure 41**) confirment les autres résultats publiés. Elles ont révélé des différences de profils d'absorbance entre le muscle prélevé au moment de l'abattage et les prélèvements ultérieurs, que ce soit avant ou après cuisson. Dans les deux espèces, on observe l'apparition de trois pics caractéristiques entre les temps de rétention 7 et 11 min et d'un

**Figure 41** : Spectre d'analyse en RP-HPLC à 220 nm des fractions peptidiques extraites à partir de muscle frais de truite et de pectoral profond de bovin (J0), après 7 jours de stockage dans la glace (J7) pour la truite et après 14 jours de maturation sous vide et à 4 °C (J14) pour le bovin, et enfin après cuisson au bain-marie à 70 °C pendant 5 min après 7 jours de stockage dans la glace (J7c) pour la truite et à 75 °C pendant 90 min après 14 jours de maturation (J14c) pour le bovin.



pic très intense à 17,3 min en moyenne. Les différences entre les deux espèces sont limitées à l'apparition chez la truite d'un pic à environ 18,2 min (pic présent dès l'abattage chez le bovin), et l'apparition de deux pics supplémentaires à 12,8 et 20,2 min chez le bovin. Considérant que l'absorbance à 220 nm est spécifique de la liaison peptidique, il apparaît que la formation dans le muscle *post mortem* de peptides détectables dans ces conditions est limitée, au moins en ce qui concerne leur nombre. La similitude des caractéristiques chromatographiques des 4 pics apparemment communs aux deux espèces suggère que les peptides auxquels ils correspondent présentent une homologie de séquence entre ces deux espèces.

Dans le but d'identifier les composés produits *post mortem*, des fractions de 1,8 ml ont été collectées systématiquement durant toute la durée du chromatogramme à partir d'un échantillon de bovin après 14 jours de maturation (J14). Ces fractions ont été évaporées, reprises dans 6 µl de TFA à 0,2% et analysées par spectrométrie de masse MALDI-ToF. Dans les fractions 11 et 12 (**Figure 41**) ont été observés des pics précédemment détectés dans les analyses MALDI-ToF sans fractionnement (*cf publication n°2*). Ces deux fractions, évaporées puis reprises dans une solution ACN 50%/acide formique 0,1%, ont été analysées par nano-ESI MS/MS, ce qui a permis d'identifier deux peptides : un fragment (142-151) de créatine kinase (LPPHCSRGER, 1151,3 Da) dans la fraction 11 et un fragment (23-38) de troponine T (APPPPAEVPEVHEEVH, 1734,8 Da) dans la fraction 12. Ce dernier a déjà été décrit et discuté dans la publication n°2. Concernant la créatine kinase, il a été démontré par électrophorèse bi-dimensionnelle que c'est une cible de la protéolyse *post mortem* chez le porc et notamment qu'un fragment de 34 kDa couvrant la séquence 31-156 est libéré (Lametsch et al., 2002). Il est possible que le fragment que nous décrivons ici soit issu de la protéolyse plus avancée de ce fragment de 34 kDa. Notons aussi qu'un peptide de 1151,3 m/z (soit 1150,3 Da) a également été détecté dans l'exsudat *post mortem* de muscle de mouton (Sayd et al., 2006). Il est vraisemblable qu'il s'agisse du même fragment de créatine kinase.

L'activité biologique potentielle des séquences identifiées dans le muscle pectoral profond de bovin cuit après 14 jours de maturation a été recherchée à l'aide de la base de données BioPep (Dziuba et al., 1999). Des séquences potentiellement bioactives, correspondant à des activités antihypertensives ou antithrombotiques, ont été mises en évidence au sein des séquences de ces peptides (**Tableau 17**). Ce sont de courtes séquences peptidiques formées de 2 à 3 acides aminés.

**Tableau 18** : Concentration des acides aminés libres (AAL) ( $\mu\text{mol/g}$  échantillon) dans les extraits de muscle pectoral profond de bovin à J0 (muscle frais), à J14 (après 14 jours de maturation) et à J14c (viande cuite après 14 jours de maturation).

AAL	Traitements			Effets <sup>a</sup>	
	J0	J14	J14ct	Maturation	Cuisson
Phosphosérine	0,08 ± 0,00	0,12 ± 0,03	0,06 ± 0,00	NS	NS
Taurine	2,72 ± 0,25	2,21 ± 0,23	1,81 ± 0,22	NS	NS
Acide aspartique	0,05 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,01	NS	*
Thréonine	0,26 ± 0,01	0,73 ± 0,04	0,63 ± 0,04	***	*
Sérine	0,32 ± 0,02	0,91 ± 0,10	0,86 ± 0,07	**	NS
Asparagine	0,19 ± 0,03	0,37 ± 0,06	0,44 ± 0,05	NS	NS
Acide glutamique	0,76 ± 0,12	1,63 ± 0,09	1,30 ± 0,11	**	***
Glutamine	4,48 ± 0,50	4,30 ± 0,29	2,48 ± 0,22	NS	***
Glycine	1,09 ± 0,09	1,50 ± 0,07	1,27 ± 0,08	***	***
Alanine	2,50 ± 0,23	4,21 ± 0,18	3,48 ± 0,23	***	***
Citrulline	ND	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	-	NS
Valine	0,26 ± 0,02	0,69 ± 0,05	0,64 ± 0,03	***	NS
Méthionine	0,01 ± 0,00	0,10 ± 0,02	0,14 ± 0,02	*	*
Isoleucine	0,12 ± 0,01	0,39 ± 0,05	0,38 ± 0,03	**	NS
Leucine	0,20 ± 0,01	0,85 ± 0,12	0,85 ± 0,07	**	NS
Tyrosine	0,07 ± 0,00	0,29 ± 0,06	0,33 ± 0,03	*	NS
Phénylalanine	0,06 ± 0,00	0,31 ± 0,04	0,29 ± 0,02	**	NS
Histidine	0,13 ± 0,01	0,28 ± 0,02	0,26 ± 0,02	***	NS
Ornithine	0,09 ± 0,02	0,17 ± 0,05	0,08 ± 0,01	NS	*
Lysine	0,15 ± 0,02	0,48 ± 0,09	0,49 ± 0,06	NS	NS
Arginine	0,16 ± 0,02	0,39 ± 0,08	0,45 ± 0,03	NS	NS
Proline	0,17 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,29 ± 0,02	***	***
$\beta$ -alanine	0,10 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,09 ± 0,01	NS	NS
3-méthyl-histidine	ND	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	-	NS
1-méthyl-histidine	ND	ND	ND	-	-
<b>Total</b>	13,95 ± 1,20	20,55 ± 0,72	16,75 ± 0,93	**	***

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  erreur standard (n = 6).

<sup>a</sup> NS : non significatif ; \* :  $P < 0,05$  ; \*\* :  $P < 0,01$  ; \*\*\* :  $P < 0,001$  ; ND : Non détecté.

Enfin, dans les échantillons de bovin, les acides aminés libres (AAL) les plus abondants ( $>1 \mu\text{mole/g}$  de muscle) du muscle pectoral profond frais (J0) sont la glutamine, la taurine, l'alanine et la glycine (**Tableau 18**). Une augmentation significative ( $P<0,01$ ) de la concentration totale des AAL est observée après maturation, conséquence de la protéolyse *post mortem* libérant des acides aminés. Alors que la concentration de nombreux AAL augmente après maturation (J14), celle des acides aminés de la carnosine ( $\beta\text{-Ala-His}$ ) et de l'ansérine ( $\beta\text{-Ala-1-méthyl-His}$ ), en particulier de la  $\beta$ -alanine et de la 1-méthyl-histidine spécifique de ces peptides, ne varie pas. Ces résultats sont parfaitement en accord avec les dosages spécifiques de carnosine et d'ansérine (**Tableau 15**). A la cuisson (J14c), une diminution significative ( $P<0,001$ ) de la concentration totale des AAL est observée, probablement due à une perte dans le jus de cuisson.

---

Publication n°1

**Peptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle  
subjected to ice storage and cooking**

Caroline Bauchart <sup>a, b</sup>, Christophe Chambon <sup>a</sup>, Philippe Patureau Mirand <sup>b</sup>,  
Isabelle Savary-Auzeloux <sup>c</sup>, Didier Rémond <sup>b</sup>, Martine Morzel <sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Qualité des Produits Animaux*, <sup>b</sup> *Unité Nutrition et Métabolisme Protéique*,

<sup>c</sup> *Unité de Recherches sur les Herbivores*,

*Institut National de la Recherche Agronomique*,

*Centre de Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France.*

***Food Chemistry* (2007) 100 (4), 1566-1572.**

---



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Food Chemistry 100 (2007) 1566–1572

Food  
Chemistry[www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

## Peptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle subjected to ice storage and cooking

Caroline Bauchart <sup>a,b</sup>, Christophe Chambon <sup>a</sup>, Philippe Patureau Mirand <sup>b</sup>,  
Isabelle Savary-Auzeloux <sup>c</sup>, Didier Rémond <sup>b</sup>, Martine Morzel <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Qualité des Produits Animaux, Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle, France*

<sup>b</sup> *Unité Nutrition et Métabolisme Protéique, Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle, France*

<sup>c</sup> *Unité de Recherches sur les Herbivores, Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle, France*

Received 18 July 2005; received in revised form 7 December 2005; accepted 7 December 2005

### Abstract

Although proteolysis during *post mortem* storage is an important factor affecting fish texture, little is known about degradation end-products. This study was performed to investigate the occurrence of low molecular weight peptides (<5 kDa) in *post mortem* rainbow trout muscle, during ice storage, and to evaluate their stability during cooking. It combined quantitative (amino acid analysis) and qualitative approaches (mass spectrometry). The results showed that muscle of trout was poor in peptides. These were mainly anserine and glutathione. Their concentration was almost unaffected by the seven days of ice storage and vacuum cooking for 5 min at 70 °C. MS analysis revealed a limited but highly reproducible appearance of small peptides in trout muscle during the ice storage and after cooking. The compounds detected by MS analysis remain to be characterised.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Trout; Muscle; Peptides; Proteolysis; *Post mortem*; Cooking

### 1. Introduction

Peptides are molecules which can be present in fish muscle *intra vitam* (e.g. anserine, glutathione) and/or could be produced by proteolysis during *post mortem* storage. Immediately after death, several biochemical and enzymatic changes are triggered in fish muscle, resulting in the gradual loss of fish freshness (Botta, 1994; Sikorski, Kolakowska, & Burt, 1990) and texture deterioration. Texture changes can be due to degradation of the extracellular matrix (Bremner, 1992; Sato et al., 1997) and weakening of the myofibrillar structure (Ladrat, Verrez-Bagnis, & Fleurence, 2003). Deterioration of the myofibrillar structure results from the action of endogenous proteolytic systems, namely the neutral calcium-activated calpains and lysosomal cathepsins. For instance, calpains may initiate the

disintegration of the Z line by a titin cleavage (Astier, Labbe, Roustan, & Benyamin, 1991), which weakens the titin/ $\alpha$ -actinin interaction and results in the release of intact  $\alpha$ -actinin from Z lines (Papa, Alvarez, Verrez-Bagnis, Fleurence, & Benyamin, 1996). Similarly, cathepsins have been reported to induce muscle softening (Yamashita & Konagaya, 1991). Furthermore, cathepsins remain active at temperatures close to cooking temperature (Geist & Crawford, 1974). For all these reasons, proteolysis during *post mortem* storage is an important factor affecting fillet texture.

Despite the importance of proteolysis on texture and quality of fish muscle, little is known about products of proteolysis during *post mortem* storage and cooking, especially small peptides (<5 kDa). Such peptides are of interest because it is in this molecular weight range that most bioactive peptides can be found (Korhonen & Pihlanto, 2003). Bioactive peptides are dietary peptides with physiological properties, such as immunostimulating or antihypertensive activity (Kitts & Weiler, 2003; Korhonen & Pihlanto,

\* Corresponding author. Tel.: +33 473 62 45 76; fax: +33 473 62 42 68.  
E-mail address: [morzel@clermont.inra.fr](mailto:morzel@clermont.inra.fr) (M. Morzel).

2003). These peptides could contribute to the nutritional value of fish.

In this context, the objective of this study was to investigate the occurrence of low molecular weight peptides (<5 kDa) *in post mortem* trout muscle, during ice storage, and to evaluate their stability during cooking. It combined quantitative (amino acid analysis) and qualitative approaches (mass spectrometry).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Fish and experimental procedure

Six rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (mean weight  $215 \pm 18$  g) were obtained from a local fish farm (Moulin de Pagnat, Saint-Saturnin, France). After four days of starvation, fish were killed by a blow on the head, eviscerated and immediately put in a plastic film on ice. Muscle samples were taken from the white dorsal muscle 30 min to 1 h 30 after death (T0), and after seven days of ice storage (T7). Part of the flesh collected at T7 was cooked under vacuum for 5 min at 70 °C in a water bath (T7c). After processing, all muscle samples were stored at –80 °C prior to use.

### 2.2. Peptide extraction

After thawing on ice, 2.5 g of muscle samples were homogenized in 12.5 ml of 3% perchloric acid (PCA) with 100 µl of 27 mM norleucine (internal standard), using an Ultra-Turrax homogenizer (15,000 rpm twice for 15 s separated by 15 s on ice). The homogenate was then centrifuged at 10,000g for 20 min at 4 °C. The supernatant was submitted to an ultra-filtration with a 5 kDa cut off (Vivaspin 15, VIVASCIENCE, Hanover, Germany) at 2,000 g for 2 h at 4 °C. Extract aliquots (500 µl) were stored at –20 °C prior to analysis.

### 2.3. Nitrogen content and amino acids analysis

Total nitrogen content was determined by the Kjeldahl method on muscle and extracts. For free amino acids (FAAs) analysis, 400 µl of extract were applied to 2 ml of AG-50 resin, 100–200 mesh, in the H<sup>+</sup> form (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), followed by deionised water wash. The amino acids were then eluted with 10 ml of 4 N NH<sub>4</sub>OH. Eluate was evaporated overnight under vacuum and resuspended in 400 µl of 0.1 M lithium buffer (pH 2.2). For total amino acids (TAAs) analysis, 400 µl of extract were hydrolyzed in 6 N HCl at 110 °C for 24 h. Hydrolysate was evaporated and the dry residue was resuspended in 400 µl of 0.1 M lithium buffer (pH 2.2). Samples were stored at –20 °C prior to analysis. Amino acids were analyzed by ion-exchange chromatography on a HPLC System (BioTek Kontron, Rotkreuz, Switzerland), using postcolumn derivatisation with ninhydrin. The peptidic amino acids (PAAs) fraction was calculated by difference

between TAAs and FAAs. Cysteine, methionine, and tyrosine, which are severely affected by acid hydrolysis, were not considered. Furthermore, during hydrolysis, asparagine and glutamine are converted to aspartic acid and glutamic acid, respectively. The peptidic concentrations of aspartic acid and glutamic acid were therefore calculated as follows:

$$[\text{Asp}]_{\text{PAA}} = [\text{Asp}]_{\text{TAA}} - ([\text{Asp}]_{\text{FAA}} + [\text{Asn}]_{\text{FAA}})$$

$$[\text{Glu}]_{\text{PAA}} = [\text{Glu}]_{\text{TAA}} - ([\text{Glu}]_{\text{FAA}} + [\text{Gln}]_{\text{FAA}})$$

### 2.4. Glutathione and anserine determination

Total glutathione (oxidized and reduced forms) content was assayed using the enzymatic recycling procedure described by Robinson, Rounds, Hong, Jacobs, and Wilmore (1992). Anserine content was quantified by RP-HPLC, using precolumn derivatisation with *O*-phthaldehyde reagent (column: C18-HDO 250 × 4.6 mm, 5 µm; Uptisphere, Interchim), adapted from the method of Maynard, Boissonneault, Chow, and Bruckner (2001).

### 2.5. Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) – time-of-flight (ToF) mass spectrometry (MS) analysis

Extracts (200 µl) were applied on C18 membrane (Vivapure MALDI-Prep, VIVASCIENCE, Hanover, Germany) according to the manufacturer's protocol, in order to remove PCA. Samples were eluted with 5 µl of 50% acetonitrile (ACN)/0.1% trifluoroacetic acid (TFA). An aliquot (0.9 µl) of each eluate was spotted on the plate with an equal volume of a matrix solution (CHCA:  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid), at 10 mg/ml, prepared in 50% ACN/0.1% TFA. The mixture was allowed to dry before analysis. Positive ions ( $M + H^+$ ) spectra were recorded in both the reflectron mode and linear mode of MALDI-ToF MS (Voyager DE-Pro, Per-Septive BioSystems, Framingham, MA, USA) using Voyager software for data collection and analysis. The MS was calibrated with a standard peptide solution (Proteomix, LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, France). The signal  $m/z$  was measured. The conversion of  $m/z$  into Dalton is obtained by subtracting the mass of H<sup>+</sup> (1.008) from  $m/z$ . Compounds from 0 to 5000 Da were listed.

### 2.6. Nano-electrospray-ionisation-MS/MS (nano-ESI-MS/MS) analysis

The nano-ESI-MS/MS analysis was carried out on a mass spectrometer LCQ Ion Trap equipped with a nano-electrospray source (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA). Extracts (200 µl) were applied on to C18 membrane (Vivapure MALDI-Prep, VIVASCIENCE, Hanover, Germany). Samples were eluted with 15 µl of 65% ACN/1% formic acid. The nanoelectrospray capillaries (Protana, Odense, Denmark) were loaded with 3 µl of resulting sample. Ionisation was performed with a liquid junction and a



non-coated capillary probe (New Objective, Cambridge, USA). Data acquisition was performed in a manual mode and the collision-induced dissociation (CID) of selected precursor ions was performed using 30% to 40% relative collision energy. The MS/MS data were searched against NCBI databases with the search engine SEQUEST (LCQ-Deca software package).

### 2.7. Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE)

Frozen muscle samples (0.1 g) were homogenized in 1 ml of extraction buffer (8 M urea, 5 mM Pefabloc<sup>®</sup>-SC, 4% w/v CHAPS in 40 mM Tris-base) in an Eppendorf tube containing a glass bead in a Retsch agitator for 1 h at 4 °C. The extracts were centrifuged at 10,000g for 1 h at 10 °C and the clear supernatant was collected. Protein concentration was determined by the method of Bradford (1976). SDS–PAGE was performed according to the method of Laemmli (1970), using an 11% polyacrylamide gel and 30 µg of protein were loaded per well.

### 2.8. Statistical analysis

A Student paired *t*-test was used to compare individual PAA concentration with zero. Only PAA concentrations significantly different from zero ( $P < 0.05$ ) have been considered. The significance of the difference between fresh and stored muscle, and between uncooked and cooked muscle, was analysed using Student paired *t*-test.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Fresh muscle

After slaughter, protein concentration ( $N \times 6.25$ ) in white dorsal muscle represented 20.1% of muscle weight. This value is in agreement with the observations of Venugopal and Shahidi (1996), and Gokoglu, Yerlikaya, and Cengiz (2004) in raw rainbow trout. Nitrogen content in acid extract was about 2.6 mg of N/g of wet muscle, accounting for 8% of muscle total nitrogen. Nitrogen, measured from amino acids (FAAs + PAAs), accounted for 55% of total nitrogen in extracts, of which 62% is PAA nitrogen. Non-protein nitrogen compounds, present in fish muscle, such as creatine, creatinine, guanidine compounds, trimethylamine oxide, purines, and also not measured free and peptidic amino acids, could constitute the remaining nitrogen fraction.

In fresh muscle, free amino acid pattern (Table 1) was consistent with previously reported data for white muscle of rainbow trout (Kaushik & Luquet, 1979; Yokoyama & Nakazoe, 1991); glycine, alanine, taurine and histidine being, on a molar basis, the most abundant free amino acids. Few amino acids were evidenced as peptidic amino acids (Table 2). The two predominant peptidic amino acids in extracts, 1-methyl-histidine and  $\beta$ -alanine, correspond to

the constitutive amino acids of anserine ( $\beta$ -Ala-1-methyl-His). The difference between 1-methyl-histidine and  $\beta$ -alanine concentrations was explained by a loss of  $\beta$ -alanine during hydrolysis, verified by an analysis of total amino acids in extract after addition of a known amount of anserine. A loss of  $\beta$ -alanine during acid hydrolysis of balenine ( $\beta$ -Ala-3-methyl-his) has also been evidenced by Aristoy, Soler, and Toldrá (2004). The presence of anserine was confirmed by a specific assay at a level matching the concentration of peptidic 1-methyl-histidine. Anserine concentration in the present study was in agreement with previously reported data for white muscle of rainbow trout (Abe, 1983; Abe, Bobson, Hoeger, & Parkhouse, 1985; Kaushik & Luquet, 1979). The third most abundant peptidic amino acid was glycine. Such a high concentration is difficult to explain with regard to the concentration of the other peptidic amino acids: glycine accounted for 89% of non-anserine PAAs. It suggests the presence of polyglycine peptides in the extract. Some of the peptidic glycine came from glutathione ( $\gamma$ -Glu–Cys–Gly), another endogenous peptide naturally found in muscles, but glutathione-derived glycine accounted for only 4% of peptidic glycine. Total glutathione concentration in the present study (Table 3) was twice that observed in muscle of rainbow trout by Passi et al. (2004). This difference of glutathione concentration could be due to differences in fish husbandry and oxidative status. The fourth most abundant peptidic amino acid in the fresh muscle was glutamic acid; its concentration was in agreement with the observed glutathione concentration.

Extracts were analysed by MALDI-ToF and detected compounds found in at least three animals out of six are listed in Table 4. The MS analysis of fresh muscle extracts revealed the presence of 22 compounds with a mass <4000 Da. These compounds were then analysed by nano-ESI-MS/MS. However, because of the scarcity of records on fish proteins in databases, no compound present in the extract was clearly identified. The internal standard (norleucine, 131 Da) was detected, but it was not possible to evidence the presence of anserine (240 Da) and glutathione (reduced form, 307.3 Da; oxidized form, 612.6 Da). These peptides were probably lost during the process of PCA removal, a step essential in sample preparation for a satisfactory crystallisation for MALDI-ToF analysis. It might lead to some compounds loss, and therefore the list was not exhaustive. Few works have provided identification of peptides in fish muscle. Kohama et al. (1988) have isolated and identified an octopeptide (952 Da), with anti-hypertensive property, in acid extract of tuna muscle. This peptide was not evidenced in the present study on trout muscle extract.

### 3.2. Effect of ice storage

Total nitrogen content of acid muscle extract was not affected by ice storage (data not shown). The pool of most free amino acids slightly increased during storage, probably

Table 1

Free amino acids (FAAs) concentration ( $\mu\text{mol/g}$  of wet muscle) in trout muscle extracts at T0 (fresh muscle), T7 (after seven days of ice storage) and T7c (cooked after seven days of ice storage)

FAAs	Treatments			Effects <sup>a</sup>	
	T0	T7	T7c	Storage	Cooking
Phosphoserine	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	NS	NS
Taurine	1.51 ± 0.25	6.20 ± 0.41	4.16 ± 0.37	***	**
Aspartic acid	ND	ND	ND	–	–
Threonine	0.48 ± 0.05	0.60 ± 0.03	0.56 ± 0.04	*	NS
Serine	0.71 ± 0.05	0.96 ± 0.07	0.82 ± 0.03	***	*
Asparagine	0.07 ± 0.04	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.01	NS	NS
Glutamic acid	0.02 ± 0.01	0.15 ± 0.03	0.11 ± 0.01	**	NS
Glutamine	0.06 ± 0.03	ND	ND	–	–
Glycine	25.6 ± 0.99	15.0 ± 0.86	20.5 ± 1.47	***	*
Alanine	3.04 ± 0.37	3.69 ± 0.43	3.15 ± 0.31	*	*
Citrulline	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.01	NS	NS
Valine	0.33 ± 0.02	0.50 ± 0.02	0.45 ± 0.00	***	**
Cystine	0.02 ± 0.00	ND	ND	–	–
Methionine	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	**	NS
Isoleucine	0.17 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.21 ± 0.01	**	NS
Leucine	0.26 ± 0.02	0.40 ± 0.02	0.34 ± 0.01	***	**
Tyrosine	0.04 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.07 ± 0.00	***	**
Phenylalanine	0.07 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.00	***	NS
Histidine	1.46 ± 0.31	0.76 ± 0.14	1.10 ± 0.28	**	NS
Ornithine	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	**	*
Lysine	0.25 ± 0.04	0.39 ± 0.03	0.37 ± 0.03	**	NS
Arginine	0.07 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	**	NS
Hydroxyproline	0.23 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.21 ± 0.02	NS	NS
Proline	0.18 ± 0.05	0.30 ± 0.05	0.28 ± 0.03	**	NS
$\beta$ -Alanine	0.28 ± 0.09	1.87 ± 0.14	2.08 ± 0.16	***	NS
1-Methyl-histidine	0.08 ± 0.01	1.74 ± 0.12	1.82 ± 0.29	***	NS
Total	34.96 ± 1.59	33.24 ± 1.38	36.57 ± 1.96	NS	NS

Values are shown as means ± standard error ( $n = 6$ ). ND, not detectable.

<sup>a</sup> NS, non-significant.

\*  $P < 0.05$ .

\*\*  $P < 0.01$ .

\*\*\*  $P < 0.001$ .

Table 2

Peptidic amino acids (PAAs) concentration ( $\mu\text{mol/g}$  of wet muscle) in trout muscle extracts at T0 (fresh muscle), T7 (after seven days of ice storage) and T7c (cooked after seven days of ice storage)

PAAs	Treatments			Effects <sup>a</sup>	
	T0	T7	T7c	Storage	Cooking
Phosphoserine	0.10 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01	NS	NS
Aspartic acid	0.13 ± 0.02	0.18 ± 0.03	0.25 ± 0.02	NS	NS
Glutamic acid	0.42 ± 0.05	1.06 ± 0.06	0.98 ± 0.06	***	NS
Glycine	8.18 ± 0.79	7.16 ± 0.36	7.26 ± 0.37	NS	NS
Valine	ND	ND	0.03 ± 0.01	–	–
Leucine	0.02 ± 0.01	ND	0.04 ± 0.01	–	–
Histidine	0.26 ± 0.08	0.26 ± 0.04	0.20 ± 0.03	NS	NS
Lysine	0.12 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.08 ± 0.01	NS	NS
$\beta$ -Alanine	9.71 ± 1.09	10.53 ± 0.86	9.05 ± 1.15	NS	NS
1-Methyl-histidine	14.7 ± 0.85	14.6 ± 1.24	13.2 ± 1.10	NS	NS
Total	33.60 ± 2.29	34.01 ± 2.10	31.28 ± 2.45	NS	NS

Values are shown as means ± standard error ( $n = 6$ ). ND, not detectable.

<sup>a</sup> NS, non-significant.

\*\*\*  $P < 0.001$ .

as a result of muscle autolysis (Table 1). For an unknown reason, taurine concentration was fourfold greater after seven days of ice storage. Conversely, a large decrease in

glycine and histidine was observed. Such a decrease in glycine concentration was previously reported by Ruiz-Capillas and Moral (2003) in white muscle of tuna stored in



1570

C. Bauchart et al. / Food Chemistry 100 (2007) 1566–1572

Table 3

Total glutathione and anserine concentrations ( $\mu\text{mol/g}$  of wet muscle) in trout muscle extracts at T0 (fresh muscle), T7 (after seven days of ice storage) and T7c (cooked after seven days of ice storage)

	Treatments			Effects <sup>a</sup>	
	T0	T7	T7c	Storage	Cooking
Glutathione	$0.31 \pm 0.02$	$0.34 \pm 0.01$	$0.30 \pm 0.02$	NS	*
Anserine	$15.3 \pm 0.84$	$15.0 \pm 0.76$	$13.0 \pm 0.59$	NS	*

Values are shown as means  $\pm$  standard error ( $n = 6$ ).

<sup>a</sup> NS, non-significant.

\*  $P < 0.05$ .

Table 4

MS analysis by MALDI-ToF of trout muscle extracts at T0 (fresh muscle), T7 (after seven days of ice storage) and T7c (cooked after seven days of ice storage)

T0	T7	T7c
132	132	303
135	378	972
162	457	1101
457	843	1230
972	972	1544
989	989	1932
1101	1056	2588
1208	1101	3385
1230	1230	3644
1304	1360	3731
1666	1666	3798
1697	2801	3885
1714	3201	4295
1759	3259	4733
1783	3731	4804
1794	3885	4820
2011		
2570		
2596		
2743		
3731		
3885		

Mass of detected compounds (Da) found in at least three of the six animals. Da,  $m/z - 1.008$ .

ice. Ice storage had no effect on glutathione concentration in acid extract (Table 3). Although it was not possible to detect a significant decrease in anserine (Table 3) or in its peptidic components (Table 2) during ice storage, concentrations of free  $\beta$ -alanine and 1-methylhistidine in extracts slightly increased (Table 1). Similar observations were reported by Ruiz-Capillas and Moral (2001) in hake (*Merluccius merluccius* L.) muscle after five days of ice storage. In their study, the progressive loss of anserine during storage (up to 35 days) was attributed to anserinase activity, and the authors proposed that anserine and its degradation compounds could be used as quality control indices for chilled hake.

A long time of storage (seven days) was chosen so as to favour peptide occurrence. Indeed, a sharp increase in TCA-soluble peptides was observed in seabass muscle after six days at 4 °C (Masniyom, Benjakul, & Vissanguan,

2004). In our study, no large increase in peptidic amino acid concentrations was evidenced after seven days of ice storage (Table 2). Only peptidic glutamic acid was significantly increased. In beef and pork muscles, Claeys, De Smet, Balcaen, Raes, and Demeyer (2004) observed an increase in peptide concentrations in the 3–17 kDa molecular weight range during 14 days of *post mortem* ageing. In lamb muscle, an increase of small peptides (<2.4 kDa) was also observed during 21 days of meat ageing (Sylvestre, Feidt, & Brun-Bellut, 2001). The difference between our results and those in seabass and mammalian muscles may be explained by the muscle composition and the technological parameters (time and temperature of storage) specific to the various species.

The sensitivity of MS analysis allowed distinction of some differences of patterns between T0 and T7, mainly a disappearance of compounds between 1700 and 2800 Da and the appearance of compounds between 2800 and 3700 Da (Table 4). Regarding peptidic composition of fresh and stored muscle, it is noteworthy that nine of the compounds detected by MS in the fresh muscle extract were still present after seven days of ice storage. The disappearance of smaller compounds argues in favour of moderate peptide degradation, in line with the slight increase in free amino acid concentration in extracts. The appearance of larger compounds suggests that *post mortem* proteolysis occurred but was limited and did not produce high amounts of low molecular weight peptides (<5 kDa) in trout muscle during ice storage. The stability of the electrophoretic protein pattern (Fig. 1) confirmed that little proteolysis occurred in trout muscle, in accordance with the

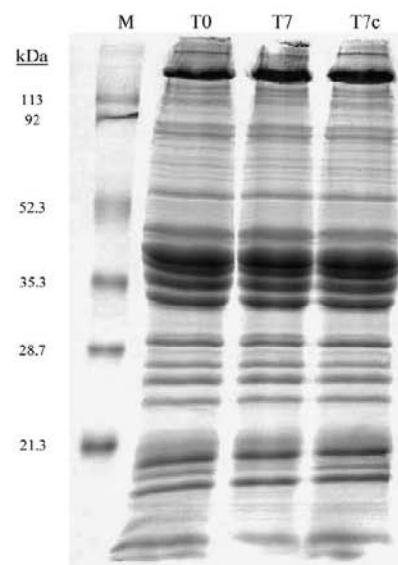


Fig. 1. SDS-PAGE gel electrophoresis of total proteins extracted from trout muscle at T0 (fresh muscle), T7 (after seven days of storage) and T7c (cooked after seven days of storage). M, molecular weight markers.

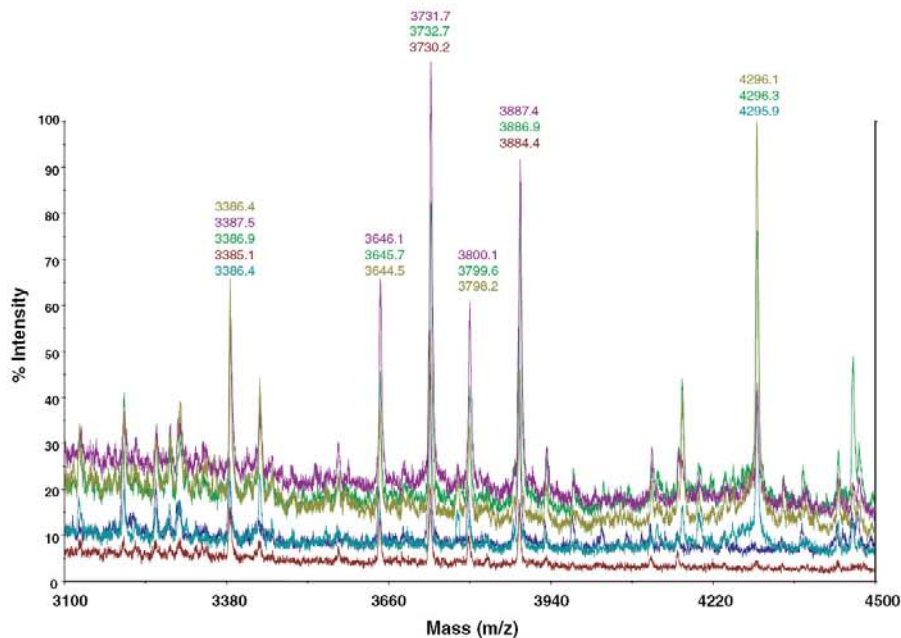


Fig. 2. MS/MALDI-ToF analysis spectra of cooked muscle extracts of six animals (example of a zone between 3100 and 4500  $m/z$ ).

result observed in rainbow trout muscle after 14 days of *post mortem* storage at 0 °C (Tsuchiya, Kita, & Seki, 1992). This finding is somewhat similar to those found in sea bass (Verrez-Bagnis, Ladrat, Morzel, Noel, & Fleurence, 2001) and cod muscle (Kjærsgård & Jessen, 2003) where authors described little protein degradation.

### 3.3. Effect of cooking

Cooking had little impact on free amino acid concentration in muscle extract. The bulk of free amino acids tended to decrease, but glycine and histidine concentrations significantly increased (Table 1). Anserine and glutathione concentrations were lower after cooking (about 12% of decrease) (Table 3). As for free amino acids, this variation could probably be explained by a loss in the cooking juice, since anserine was shown to be stable during heat treatments (Aristoy et al., 2004). During cooking, no significant hydrolysis of trout muscle proteins seemed to occur, based on electrophoresis results (Fig. 1) and peptidic amino acid concentration (Table 2). However, MS analysis evidenced the appearance of compounds with a mass above 4000 Da. These new compounds could be peptides that came from hydrolysed muscle proteins. Five compounds initially found in the fresh muscle were still present after cooking. Molecular weights of these compounds were 972, 1101, 1230, 3731 and 3885 Da. Moreover, it should be noted that the highly reproducible peaks pattern (Fig. 2) indicates that sites of proteolysis (whether of an enzymatic or chemical nature) are highly specific.

### 4. Conclusion

Fresh muscle of rainbow trout contained two major endogenous peptides, anserine and glutathione, the concentrations of which were almost unaffected by the seven days of ice storage and the cooking conditions applied in the present work. These processes generated low molecular weight peptides (<5 kDa), but in very low concentrations. Furthermore, protein electrophoretic patterns were very stable. Together, these results suggest that *post mortem* proteolysis was present but limited and produced few low molecular weight peptides. Overall, mass spectra of acid extracts were extremely reproducible between animals. The present study evidenced compounds that were initially present in trout muscle and were stable during storage and cooking, and other compounds that appeared (protein degradation) or disappeared (peptidolysis) throughout fish processing. The next step will be to identify these molecules.

### References

- Abe, H. (1983). Distribution of free L-histidine and related dipeptides in the muscle of fresh-water fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 76B, 35–39.
- Abe, H., Bobson, G. P., Hoeger, U., & Parkhouse, W. S. (1985). Role of histidine-related compounds to intracellular buffering in fish skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, 249, R449–R454.
- Aristoy, M.-C., Soler, C., & Toldrà, F. (2004). A simple fast and reliable methodology for the analysis of histidine dipeptides markers of the presence of animal origin proteins in feeds for ruminants. *Food Chemistry*, 84, 485–491.

- Astier, C., Labbe, J. P., Roustan, C., & Benyamin, Y. (1991). Sarcomeric disorganization in post-mortem fish muscles. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 100, 459–465.
- Botta, J. R. (1994). Freshness quality of seafoods: A review. In F. Shahidi & J. R. Botta (Eds.), *Seafoods: Chemistry, processing technology and quality* (pp. 140–167). London: Blackie Academic and Professional.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Bremner, H. A. (1992). Fish flesh structure and the role of collagen – its postmortem aspects and implications for fish processing. In H. H. Huss, M. Jacobsen, & J. Liston (Eds.), *Quality assurance in the fish industry* (pp. 39–62). Amsterdam: Elsevier.
- Clays, E., De Smet, S., Balcaen, A., Raes, K., & Demeyer, D. (2004). Quantification of fresh meat peptides by SDS–PAGE hi relation to ageing time and taste intensity. *Meat Science*, 67, 281–288.
- Geist, G. M., & Crawford, D. L. (1974). Muscle cathepsins in three species of Pacific sole. *Journal of Food Science*, 39, 548–551.
- Gokoglu, N., Yerlikaya, P., & Cengiz, E. (2004). Effects of cooking methods on the proximate composition and mineral contents of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Chemistry*, 84, 19–22.
- Kaushik, S., & Luquet, P. (1979). Influence of dietary amino acids patterns on the free amino acids contents of blood and muscle of rainbow trout (*Salmo Gairderii* R.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 64B, 175–180.
- Kitts, D., & Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1309–1323.
- Kjærsgård, I., & Jessen, F. (2003). Proteome analysis post-mortem changes in cod (*Gadus morhua*) muscle proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3985–3991.
- Kohama, Y., Matsumoto, S., Oka, H., Teramoto, T., Okabe, M., & Mimura, T. (1988). Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 155, 332–337.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides – opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1297–1308.
- Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., & Fleurence, J. (2003). In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects of cathepsins B, D and L. *Food Chemistry*, 81, 517–525.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Masniyom, P., Benjakul, S., & Vissanguan, W. (2004). ATPase activity, surface hydrophobicity, sulfhydryl content and protein degradation in refrigerated seabass muscle in modified atmosphere packaging. *Journal of Food Chemistry*, 28, 43–60.
- Maynard, L. M., Boissonneault, G. A., Chow, C. K., & Bruckner, G. G. (2001). High levels of dietary carnosine are associated with increased concentrations of carnosine and histidine in rat soleus muscle. *Journal of Nutrition*, 131(2), 287–290.
- Papa, I., Alvarez, C., Verrez-Bagnis, V., Fleurence, J., & Benyamin, Y. (1996). Post mortem release of fish white muscle alpha-actinin as a marker of disorganisation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72, 63–70.
- Passi, S., Ricci, R., Cataudella, S., Ferrante, I., DeSimone, F., & Rastrelli, L. (2004). Fatty acid pattern, oxidation product development, and antioxidant loss in muscle tissue of rainbow trout and *Dicentrarchus labrax* during growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2587–2592.
- Robinson, M., Rounds, J., Hong, R., Jacobs, D., & Wilmore, D. (1992). Glutathione deficiency increases organ dysfunction after hemorrhagic shock. *Surgery*, 112, 140–147.
- Ruiz-Capillas, C., & Moral, A. (2001). Changes in free amino acids during chilled storage of hake (*Merluccius merluccius* L.) in controlled atmospheres and their use as a quality control index. *European Food Research Technology*, 212, 302–307.
- Ruiz-Capillas, C., & Moral, A. (2003). Free amino acids and biogenic amines in red and white muscle of tuna stored in controlled atmospheres. *Amino Acids*, 26(2), 125–132.
- Sato, K., Ando, M., Kubota, S., Origasa, K., Kawase, H., Toyohara, H., et al. (1997). Involvement of type V collagen in softening of fish muscle during short-term chilled storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 343–348.
- Sikorski, Z. E., Kolakowska, A., & Burt, J. R. (1990). In Z. E. Sikorski (Ed.), *Postharvest biochemical and microbial changes* (pp. 55–75). Florida: Boca Raton, CRC Press Inc.
- Sylvestre, M. N., Feidt, C., & Brun-Bellut, J. (2001). Post-mortem evolution of non-protein nitrogen and its peptide composition in growing lamb muscles. *Meat Science*, 58, 363–369.
- Tsuchiya, H., Kita, S., & Seki, N. (1992). Postmortem changes in  $\alpha$ -actinin and connectin in carp and rainbow trout muscles. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 793–798.
- Venugopal, V., & Shahidi, F. (1996). Structure and composition of fish muscle. *Food Review International*, 12, 175–197.
- Verrez-Bagnis, V., Ladrat, C., Morzel, M., Noel, J., & Fleurence, J. (2001). Protein changes in post mortem sea bass (*Dicentrarchus labrax*) muscle monitored by one- and two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 22, 1539–1544.
- Yamashita, M., & Konagaya, S. (1991). Hydrolytic action of salmon cathepsin B and L to muscle structural proteins in respect of muscle softening. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57(10), 1917–1922.
- Yokoyama, M., & Nakazoe, J.-I. (1991). Effects of dietary protein levels on free amino acid and glutathione contents in the tissues of rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 99A, 203–206.

---

Publication n°2

**Small peptides (<5 kDa) found in ready-to-eat beef meat**

Caroline Bauchart <sup>a, b</sup>, Didier Rémond <sup>b</sup>, Christophe Chambon <sup>a</sup>,  
Philippe Patureau Mirand <sup>b</sup>, Isabelle Savary-Auzeloux <sup>c</sup>, Christelle Reynès <sup>d</sup>,  
Martine Morzel <sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Qualité des Produits Animaux*, <sup>b</sup> *UMR 1019 Unité de Nutrition Humaine*,

<sup>c</sup> *Unité de Recherches sur les Herbivores*,

*Institut National de la Recherche Agronomique*,

*Centre de Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France.*

<sup>d</sup> *Laboratoire de Physique Moléculaire et Structurale, Faculté de Pharmacie,*  
*34060 Montpellier, France.*

***Meat Science* (2006) 74 (4), 658-666.**

---



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Meat Science 74 (2006) 658–666

MEAT  
SCIENCE[www.elsevier.com/locate/meatsci](http://www.elsevier.com/locate/meatsci)

## Small peptides (<5 kDa) found in ready-to-eat beef meat

C. Bauchart <sup>a,b</sup>, D. Rémond <sup>b</sup>, C. Chambon <sup>a</sup>, P. Patureau Mirand <sup>b</sup>, I. Savary-Auzeloux <sup>c</sup>,  
C. Reynès <sup>d</sup>, M. Morzel <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Qualité des Produits Animaux, Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Theix, 63122 Saint Genès, Champanelle, France*

<sup>b</sup> *Unité de Nutrition Humaine, Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Theix, 63122 Saint Genès, Champanelle, France*

<sup>c</sup> *Unité de Recherches sur les Herbivores, Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Theix, 63122 Saint Genès, Champanelle, France*

<sup>d</sup> *Laboratoire de Physique Moléculaire et Structurale, Faculté de Pharmacie, 34060 Montpellier, France*

Received 10 April 2006; received in revised form 22 May 2006; accepted 22 May 2006

### Abstract

Dietary proteins can have biological properties, many attributed to bioactive peptides (2–50 amino acids). Since little is known about peptides in meat, we investigated the *postmortem* occurrence of low molecular weight peptides (<5 kDa) in bovine *Pectoralis profundus* muscle, after 14 days storage at 4 °C and vacuum cooking for 90 min at 75 °C. The study combined quantitative (amino acid analysis) and qualitative approaches (mass spectrometry). Eighty-nine percent of peptidic amino acids in fresh muscle corresponded to carnosine, anserine and glutathione. Levels of these compounds were lower in cooked meat compared to fresh muscle. Concomitantly, numerous larger compounds, most probably peptides, were generated in a very reproducible manner during ageing and even more during cooking of meat. Seven peptides (fragments of troponin T, nebulin, procollagen and cypher proteins) were identified in cooked meat extracts.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Bovine muscle; Peptides; Meat ageing; Cooking; Mass spectrometry

### 1. Introduction

The primary criteria used to assess the value of dietary protein have traditionally been amino acid composition and digestibility. Recently, it has been proposed that new parameters such as the rate of protein digestion (Dangin, Boirie, Guillet, & Beaufrère, 2002) or the potential of food to provide biologically active peptides (Kitts & Weiler, 2003) should also be considered. Peptides derived from food may indeed have diverse biological activities of interest for human health: antihypertensive, antithrombotic, opioid, immunomodulatory, antimicrobial, and antioxidant activities (Kitts & Weiler, 2003; Korhonen & Pihlanto, 2003). These peptides are present in the raw materials or are generated during food processing and pro-

tein hydrolysis by digestive enzymes. They are generally low molecular weight peptides (<5 kDa). The potential of milk to release biologically active peptides has been widely studied (Clare & Swaisgood, 2000), but less is known about other protein-rich foods such as meat.

Proteolytic degradation of muscle, which occurs *postmortem* as part of the meat ageing process, results in the production of protein fragments (Etherington, 1991). Polypeptide fragments may be further degraded by peptidyl peptidases and aminopeptidases which will lead to the production of smaller peptides and the release of individual amino acids (Mullen et al., 2000). However, few studies have described small peptides in aged and cooked meat (Purchas, Rutherford, Pearce, Vather, & Wilkinson, 2004). In this context, the objective of this study was to investigate the occurrence of low molecular weight peptides (<5 kDa) in bovine *Pectoralis profundus* muscle, during meat ageing and cooking. It combined quantitative (amino acid analysis) and qualitative approaches (mass spectrometry).

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 73 62 45 76; fax: +33 4 73 62 42 68.  
E-mail address: [morzel@clermont.inra.fr](mailto:morzel@clermont.inra.fr) (M. Morzel).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and sampling

Six 15-month-old Charolais bovine young bulls (*Bos taurus*) were used. Approximately 30 min after slaughter, a slab of *Pectoralis profundus* (PP) muscle (about 100 g) was removed from the right side of each carcass. Five grams of muscle were immediately stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  (T0). The slab was vacuum-packed into polyethylene-polyamide bags, placed for 24 h in water at  $15^{\circ}\text{C}$  and subsequently stored at  $4^{\circ}\text{C}$  until 14 days *postmortem*. Five grams were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  (T14). The remaining meat was vacuum-packed and cooked for 90 min at  $75^{\circ}\text{C}$  in a water bath (T14c). Cooking loss ( $35.5 \pm 3.3\%$ ) was determined by weighing samples before and after heating. Cooked meat was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

### 2.2. SDS-PAGE of muscle and meat total proteins

Frozen muscle samples (0.1 g) were homogenized in 1 mL of extraction buffer (8 M urea, 5 mM Pefabloc<sup>®</sup>-SC, 4% w/v CHAPS in 40 mM Tris-base) in an Eppendorf tube containing a glass bead in a Retsch agitator for 1 h at  $4^{\circ}\text{C}$ . The extracts were centrifuged at  $10,000g$  for 1 h at  $10^{\circ}\text{C}$  and the clear supernatant was collected. Protein concentration was determined by the method of Bradford (Bradford, 1976). SDS-PAGE was performed according to the method of Laemmli (Laemmli, 1970) using an 11% polyacrylamide gel and  $30\ \mu\text{g}$  of protein were loaded per well.

### 2.3. Peptide extraction

After at least 1 h of thawing on ice, 2.5 g of samples were homogenized in 12.5 mL of 3% perchloric acid (PCA) using an ultra-turrax homogenizer (15,000 rpm for 20 s followed by 20 s on ice and then a further 20 s at 15,000 rpm). Internal standards were added during homogenization: norleucine to a final concentration of  $180\ \mu\text{M}$  for amino acid analysis, or homocarnosine to a final concentration of  $0.83\ \text{mM}$  for carnosine and anserine measurements. The homogenate was centrifuged at  $10,000g$  for 20 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was submitted to ultra-filtration with a 5 kDa cut off (Vivaspin 15, VIVASCIENCE, Hanover, Germany) at  $2000g$  at  $4^{\circ}\text{C}$ . Aliquots of acid extracts were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis.

### 2.4. Compositional analysis

Total nitrogen content was determined by the Kjeldahl method on muscle and extracts. Carnosine and anserine content was quantified by RP-HPLC using precolumn derivatization with *O*-phthaldehyde reagent (column: C18-HDO  $250 \times 4.6\ \text{mm}$ ,  $5\ \mu\text{m}$ ; Uptisphere, Interchim),

adapted from the method of Maynard, Boissonneault, Chow, and Bruckner (2001). Total glutathione (oxidized and reduced forms) content was assayed using the enzymatic recycling procedure described by Robinson, Rounds, Hong, Jacobs, and Wilmore (1992). Free amino acids (FAAs) and total amino acids (TAAs) analysis were performed according to Bauchart, Chambon, Patureau Mirand, Savary-Auzeloux, and Rémond (in press). The peptidic amino acids (PAAs) fraction was calculated by difference between TAAs and FAAs.

### 2.5. Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)-time-of-flight (ToF) mass spectrometry (MS) analysis

Extracts ( $200\ \mu\text{L}$ ) were applied on C18 membrane (Vivapure MALDI-Prep, VIVASCIENCE, Hanover, Germany) following the manufacturer's protocol, in order to remove PCA. Samples were eluted with  $5\ \mu\text{L}$  of 50% acetonitrile (ACN)/0.1% trifluoroacetic acid (TFA). An aliquot ( $0.9\ \mu\text{L}$ ) of each eluate was spotted on the plate with an equal volume of a matrix solution (CHCA:  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid) at  $5\ \text{mg/mL}$  prepared in 50% ACN/0.1% TFA. The mixture was allowed to dry before analysis. Positive ion ( $M + H^+$ ) spectra were acquired in the linear mode of MALDI-ToF MS (Voyager DE-Pro, PerSeptive BioSystems, Framingham, MA, USA) using Voyager software for data collection and analysis. Data were calibrated with a standard peptide solution (Proteomix, LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, France). The  $m/z$  signal was recorded between 800 and 5000. Such conditions are those generally used to preferentially detect peptides.

### 2.6. Nano-LC-ion trap MS/MS analysis

HPLC was performed with an ultimate LC system combined with Famos autosampler and Switchos II micro-column switching for preconcentration (LC Packings, Amsterdam, The Netherlands). The samples were loaded on the column PEPMAP C18,  $5\ \mu\text{m}$ ,  $75\ \mu\text{m}$  ID, 15 cm (LC Packings) using a preconcentration step in a microprecolumn cartridge ( $300\ \mu\text{m}$  ID, 1 mm). Samples of  $6\ \mu\text{L}$  were loaded on the precolumn at  $30\ \mu\text{L/min}$ . After 3 min, the precolumn was connected with the separating column and the gradient was started at  $200\ \text{nL/min}$ . The buffers were 95%  $\text{H}_2\text{O}$ , 5% acetonitrile, 0.5% HCOOH (A) and 95% acetonitrile, 5%  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.5% HCOOH (B). A linear gradient from 10% to 90% B for 45 min was applied. For ion trap MS, a LCQ deca with a nano electrospray interface (Termofinnigan, Les Ulis, France) was used. Ionization (2 kV ionization potential) was performed with a liquid junction and a non-coated capillary probe (New Objective, Cambridge, USA). Peptide ions were analyzed by the data-dependent "triple play" method: (i) full MS scan ( $m/z$  400–2000), (ii) zoomscan (scan of the major ion with bigger resolution), and (iii) MS/MS of this ion. Identification of peptides was per-



formed with Bioworks 3.1, using the query settings “no enzyme” and “possible oxidized methionine”, within the nr protein database restricted to *mammalia* entries (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Identifications of discharged peptides was considered successful when Xcorr was above 2.0 and visual inspection proved a satisfactory correlation between experimental and theoretical MS/MS spectra.

### 2.7. Statistical analyses

A Student *t*-test was used to compare individual PAA concentration with zero. For nitrogen, PAA, carnosine, anserine and glutathione determinations, the significance of the difference between fresh and stored muscle, and between uncooked and cooked meat, was analyzed using Student paired *t*-test.

A statistical procedure was designed to determine whether peaks, at similar *m/z* but originating from different spectra, were likely to correspond to the same compound. All spectra were gathered on a single *super vector* and average-link hierarchical clustering (Prados et al., 2004) was applied. A threshold value was subsequently used to define the maximum distance that can separate neighbour peaks while still considering them as resulting from the same substance. This threshold depends on mass accuracy of the technique, thereby taking into account heterogeneity along the abscissa axis. In the present case, if the difference between the average positions of two groups of neighbour peaks is less than 0.05% of their global average position, the two groups are considered the

same. Otherwise, they are considered as arising from two distinct peptides. For one sampling time (T0, T14, and T14c), only the peaks gathered in a group consisting of data originating from the six animals were considered. A similar procedure was subsequently applied to determine which groups of peaks corresponded to the same compound, across sampling times.

## 3. Results

### 3.1. Protein evolution during meat ageing and cooking

SDS-PAGE profiles of total proteins in muscle and meat (Fig. 1) showed a decrease in intensity of bands corresponding to intact desmin (apparent MW 52.3 kDa) and troponin T (apparent MW 31.5 kDa) and the appearance of an approximately 30 kDa troponin T fragment, in aged and in cooked meat. In cooked meat specifically, faint bands at apparent MW of 92.0 and 72.9 kDa appeared, and a band at 39.0 kDa disappeared.

### 3.2. Nitrogen content

At T0, protein concentration ( $N \times 6.25$ ) represented 21.7% of muscle weight. Nitrogen content in acid extracts was on average  $2.6 \pm 0.1$  mg/g of wet muscle, accounting for 7.5% of total nitrogen in the tissue material. There was no significant difference in nitrogen concentration between T0, T14, and T14c extracts. Nitrogen corresponding to TAA accounted for 72% of total nitrogen in extracts, of which 61% was PAA nitrogen.

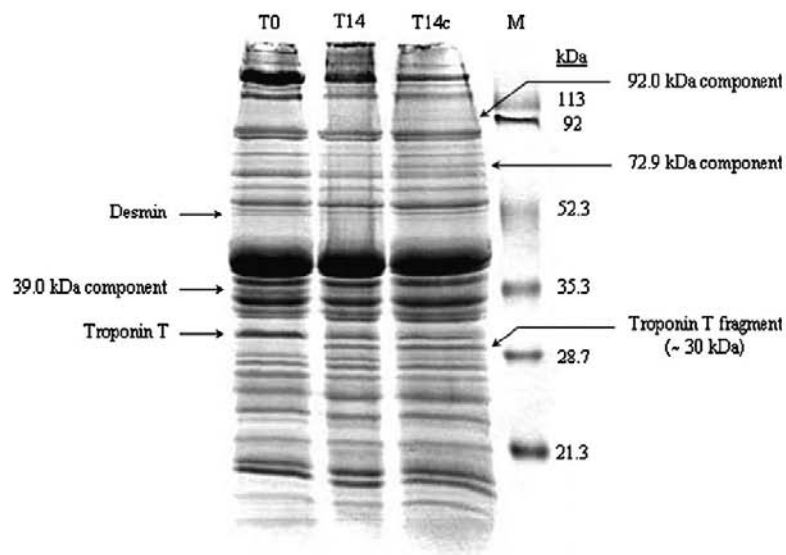


Fig. 1. SDS-PAGE gel electrophoresis of total proteins extracted from PP bovine muscle at T0 (fresh muscle), T14 (after 14 days of *postmortem* storage), and T14c (cooked after 14 days of *postmortem* storage). M: Molecular weight standards.

Table 1

Carnosine, anserine and total glutathione concentration ( $\mu\text{mol/g}$  of sample) in PP bovine muscle extracts at T0 (fresh muscle), T14 (after 14 days of *postmortem* storage), and T14c (cooked after 14 days of *postmortem* storage)

	Treatments			Effects <sup>a</sup>	
	T0	T14	T14c	Storage	Cooking
Carnosine	22.43 $\pm$ 1.02	22.73 $\pm$ 0.83	18.52 $\pm$ 0.59	NS	***
Anserine	4.29 $\pm$ 0.45	3.92 $\pm$ 0.37	3.26 $\pm$ 0.28	NS	**
Glutathione	0.89 $\pm$ 0.05	0.70 $\pm$ 0.04	0.44 $\pm$ 0.03	**	***

Values are shown as mean  $\pm$  standard error ( $n = 6$ ).

<sup>a</sup> NS: non-significant; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

### 3.3. Carnosine, anserine, and glutathione concentrations

Concentrations of carnosine, anserine, and glutathione are shown in Table 1. Meat ageing had no effect on carnosine and anserine concentrations whereas a significant decrease ( $-21\%$ ) in glutathione concentration was observed. Concentrations of the three peptides significantly decreased after cooking and were 82.6%, 76.0%, and 49.4%, respectively, of their initial levels in fresh muscle.

### 3.4. Amino acids analysis

The overall PAA concentration (Table 2) remained stable between T0, T14, and T14c. However, the evolution of individual PAAs differed: the concentration of three abundant amino acids (histidine,  $\beta$ -alanine and 1-methyl-histidine) decreased with ageing or cooking while all other PAAs remained similar or their concentrations increased after

meat ageing and/or cooking. Thus, if PAAs originating from carnosine ( $\beta$ -Ala-His), anserine ( $\beta$ -Ala-1-methyl-His) and glutathione ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) are omitted, ambiguous PAAs significantly increased with meat ageing and cooking.

Concentrations of peptidic  $\beta$ -alanine, histidine and 1-methyl-histidine in tissues were lower than expected when compared to the direct determination of carnosine and anserine. Recovery after acid hydrolysis of the constitutive amino acids of carnosine was checked, adding known amounts of carnosine to an extract hydrolysis. A 99% recovery was observed for histidine, with a constant loss of  $\beta$ -alanine. Such a loss of  $\beta$ -alanine was previously observed during acid hydrolysis of anserine in fish muscle (Bauchart et al., in press). It explains the difference between  $\beta$ -alanine and the sum of histidine and 1-methyl-histidine concentrations. However, the discrepancy between direct determination of carnosine and anserine, and peptidic histidine and 1-methyl-histidine concentration, respectively,

Table 2

Peptidic amino acids (PAAs) concentration ( $\mu\text{mol/g}$  of sample) in PP bovine muscle extracts at T0 (fresh muscle), T14 (after 14 days of *postmortem* storage), and T14c (cooked after 14 days of *postmortem* storage)

PAAs	Treatments			Effects <sup>a</sup>	
	T0	T14	T14c	Storage	Cooking
Aspartic acid	ND	0.34 $\pm$ 0.07	ND	–	–
Threonine	0.28 $\pm$ 0.08	0.37 $\pm$ 0.08	0.64 $\pm$ 0.06	NS	*
Serine	ND	0.26 $\pm$ 0.09	0.56 $\pm$ 0.08	–	**
Glutamic acid	0.71 $\pm$ 0.23	1.18 $\pm$ 0.28	2.66 $\pm$ 0.16	NS	**
Glycine	3.50 $\pm$ 0.07	6.72 $\pm$ 0.36	6.68 $\pm$ 0.19	***	NS
Alanine	0.31 $\pm$ 0.09	0.66 $\pm$ 0.21	0.88 $\pm$ 0.11	NS	NS
Valine	ND	0.30 $\pm$ 0.10	0.58 $\pm$ 0.10	–	**
Isoleucine	ND	0.09 $\pm$ 0.03	0.22 $\pm$ 0.03	–	**
Leucine	ND	0.13 $\pm$ 0.03	0.35 $\pm$ 0.05	–	**
Phenylalanine	ND	ND	0.14 $\pm$ 0.03	–	–
Histidine	17.48 $\pm$ 0.64	16.77 $\pm$ 0.90	14.87 $\pm$ 0.75	NS	*
Lysine	0.32 $\pm$ 0.09	0.33 $\pm$ 0.05	0.81 $\pm$ 0.11	NS	**
Arginine	ND	0.18 $\pm$ 0.04	0.36 $\pm$ 0.06	–	*
Proline	0.22 $\pm$ 0.05	0.46 $\pm$ 0.10	0.92 $\pm$ 0.11	NS	**
$\beta$ -alanine	15.11 $\pm$ 0.92	14.43 $\pm$ 0.69	12.42 $\pm$ 0.73	NS	*
1-methyl-histidine	3.01 $\pm$ 0.28	2.53 $\pm$ 0.27	2.17 $\pm$ 0.24	*	NS
Total	40.95 $\pm$ 1.55	44.64 $\pm$ 2.40	44.67 $\pm$ 1.36	NS	NS
Sub-total <sup>b</sup>	3.75 $\pm$ 0.33	9.62 $\pm$ 1.30	13.92 $\pm$ 0.90	***	**

Only PAA concentrations significantly different from zero ( $P < 0.05$ ) are reported.

Values are shown as means  $\pm$  standard error ( $n = 6$ ).

<sup>a</sup> NS: non-significant; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . ND: Not detectable.

<sup>b</sup> Total concentration of PAAs excluding PAAs corresponding to carnosine, anserine, and glutathione.

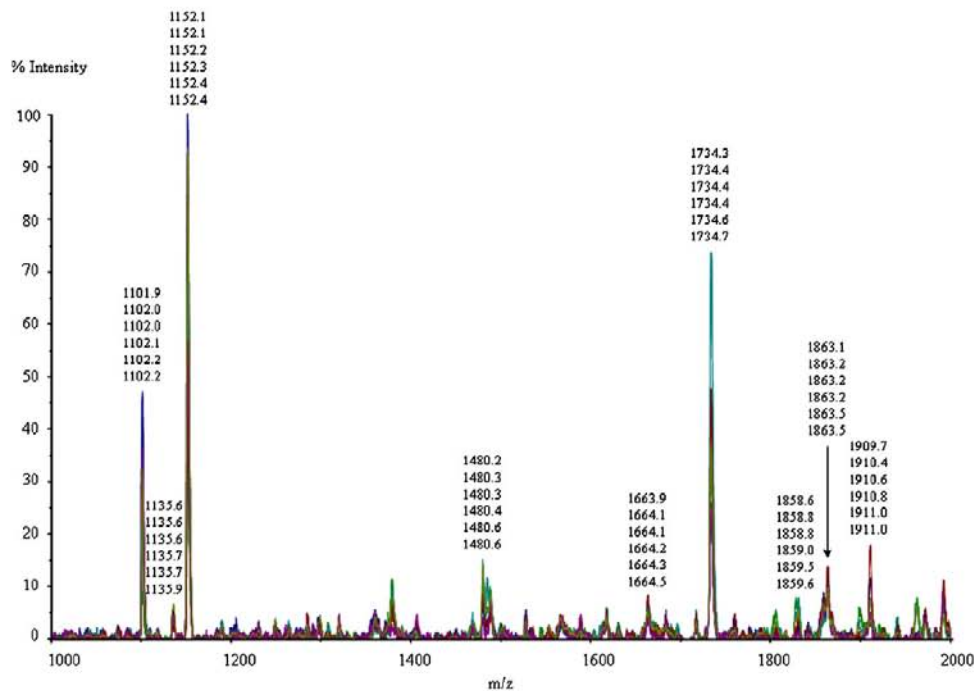


Fig. 2. MALDI-ToF MS analysis spectra of muscle extracts of six animals at T14 (example of a zone between 1000 and 2000 m/z).

Table 3

List of compounds (m/z 800–5000) detected by MALDI-ToF in PP bovine muscle extracts at T0 (fresh muscle), T14 (after 14 days of *postmortem* storage) and T14c (cooked after 14 days of *postmortem* storage) found in six animals

T0	T14	T14c			
844.0	976.0	1525.3	2495.0	3070.3	3813.8
868.7	1102.1	1566.2	2519.8	3077.3	3844.4
922.3	1135.7	1735.0	2534.5	3102.7	3864.9
928.0	1152.3	1863.5	2590.9	3116.4	3909.5
973.2	1480.4	1993.1	2603.1	3129.8	3965.5
1101.9	1664.2	2041.6	2632.2	3150.0	4025.0
1230.6	1734.4	2101.6	2655.5	3229.8	4047.7
	1859.1	2114.1	2698.5	3238.5	4071.0
	1863.3	2143.5	2709.6	3304.6	4157.4
	1910.6	2185.8	2729.3	3347.6	4189.6
	1992.5	2204.4	2771.1	3391.1	4314.8
	2041.0	2219.5	2797.8	3408.9	4403.2
	2099.6	2269.3	2816.3	3433.7	4422.1
	2112.6	2278.5	2822.7	3470.2	4472.3
	2120.8	2288.1	2841.6	3492.2	4493.6
	2332.5	2326.4	2845.4	3505.7	4813.5
	2454.0	2334.7	2866.0	3546.5	4855.5
	3546.4	2357.6	2888.7	3591.6	
		2373.9	2913.8	3601.6	
		2407.1	2942.3	3617.3	
		2421.8	2952.0	3637.8	
		2449.1	2972.5	3665.1	
		2454.0	2982.3	3696.0	
		2463.0	3010.9	3710.5	
		2468.1	3032.2	3746.7	

remains unexplained. Nevertheless, whatever the analysis method, the effect of ageing and cooking on carnosine and anserine concentrations was similar.

### 3.5. Peptide patterns evidenced by MALDI-ToF

MALDI-ToF MS analysis revealed that peak patterns were extremely reproducible between animals, as illustrated in Fig. 2. The three extracts differed largely by the number of peptides detected and their mass (Table 3). Seven, 18 and 92 peptides were detected at T0, T14, and T14c, respectively. The smaller peptides ( $m/z \leq 973.2$ ) initially present in muscle were lost after meat ageing. Similarly, the smaller peptides ( $m/z \leq 1664.2$ ) present in aged meat were absent in cooked meat. Extracts were in contrast enriched in larger peptides following meat ageing and even more drastically following cooking. Only one compound (average  $m/z$  1102.0) found at T0 was still present at T14, while six compounds (average  $m/z$  1734.7, 1863.4, 1992.8, 2041.3, 2454.0, and 3546.5) were found both at T14 and T14c.

### 3.6. Identification of peptides

A nano-HPLC-MS/MS analysis performed on T14c extracts allowed identification of the seven peptides, listed in Table 4. Fig. 3 shows an example of a MS–MS spectrum.



Table 4  
List of peptides identified by nano-HPLC-MS/MS in PP bovine muscle cooked after 14 days of *postmortem* storage (T14c)

Protein fragment	m/z (M + H <sup>+</sup> )	Sequence	Accession number of the parent protein
Troponin T (23–38)	1734.9	APPPPAEVPEVHEEVH	gi 21038992
Troponin T (25–38)	1566.7	PPPAEVPEVHEEVH	gi 21038992
Nebulin (1036–1048)	1326.6	IPITAAKASRNIA	gi 1205990
Procollagen type I $\alpha 2$ (1101–1118)	1661.8	PGPPGPPGVSGGGYDFGF	gi 6680980
Procollagen type IV $\alpha 2$ (1099–1117)	1904.1	GLKGERGITGIPGLKGFFG	gi 36031080
Cypher protein (303–319)	1735.9	EHAPVCTSQATTPLLPA	gi 83288256
Cypher protein (132–251)	2157.2	LPIKDLTVDSASPVYQAVIK	gi 73587220

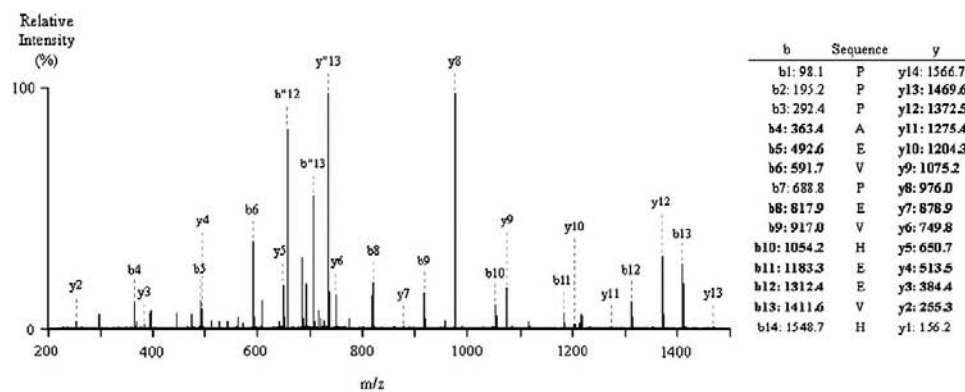


Fig. 3. MS/MS spectrum of troponin T fragment (m/z 1566.7). Double charged ions  $y$  or  $b$  are noted  $y''$  or  $b''$ .

Two peptides (fragments of troponin T at m/z 1566.7 and 1734.9) had been previously detected by MALDI-ToF.

#### 4. Discussion

Many authors have studied the production of small peptides by enzymatic hydrolysis of raw material, including muscle. For instance, ACE inhibitory peptides have been studied in hydrolyzed pork and chicken meat (Vercruyse, Van Camp, & Smaghe, 2005). In contrast, few studies have dealt with the small peptides present in ready-to-eat meat. Our quantitative results on nitrogen and PAA indicated that the overall peptide concentration in acid extracts remained stable after meat ageing and cooking, but significant variations in most individual PAA concentrations showed that the composition of the peptidic fraction was affected by such processing steps. We therefore not only specifically studied peptides widely described as endogenous to mammalian muscle (carnosine, anserine and glutathione), but also peptides generated by the processing steps themselves. It must be remembered that all concentrations are based on sample (fresh muscle, aged meat, or cooked meat) weight. Cooking juice was not analyzed.

Carnosine ( $\beta$ -Ala-His) and anserine ( $\beta$ -Ala-l-methyl-His) are the major dipeptides naturally present in several mammalian tissues including skeletal muscle (Boldyrev & Severin, 1990). These dipeptides have been extensively

studied because of their physiological effects, such as a buffering activity (Abe, 2000) or antioxidant properties (Boldyrev & Severin, 1990; Chan & Decker, 1994). Concentrations of histidine-containing dipeptides in aged meat (estimated from peptidic amino acid analysis) are in the range of those previously reported for beef (Aristoy & Toldra, 2004; Chan & Decker, 1994). Little information is available on the effect of processing on carnosine and anserine concentrations in beef muscles. *Intra vitam*, carnosine and anserine breakdown is catalyzed by an aminoacyl-histidine dipeptidase (EC 3.4.13.3) which is widely distributed in many tissues, especially liver, kidney and blood plasma, but not in skeletal muscle (Boldyrev & Severin, 1990). This is consistent with our results, showing a good stability of these dipeptides during meat ageing. After cooking, the lower concentrations of carnosine and anserine could be attributed to losses in the cooking juice. A moderate loss of carnosine was previously described during cooking of beef *semitendinosus* muscle (Purchas et al., 2004), but mechanisms remained unclear.

Glutathione ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) is another endogenous peptide found in the skeletal muscle of most vertebrates, known to have antioxidant activity (Chan & Decker, 1994). Little information is available on glutathione concentrations in beef muscle, and on the effect of meat ageing and cooking. In the present study, the decrease in glutathione concentration during meat storage could be due to its

higher binding with proteins or to its conjugation through glutathione-S-transferase activity, thereby decreasing its extractability. Total glutathione concentration also decreased during cooking (–37%), as previously reported by Wierzbicka, Hagen, and Tones (1989). It is not possible here to determine whether this disappearance was mainly related to a loss of glutathione in the cooking juice, or to the formation of glutathione adducts.

Apart from carnosine, anserine and glutathione, both quantitative and qualitative analyses showed very few small peptides at T0, in accordance with the results of Claeys, De Smet, Balcaen, Raes, and Demeyer (2004) in beef and pork muscles and Feidt, Brun-Bellut, and Dransfield (1998) in lamb muscle. Among compounds detected by MALDI-ToF at T0, only one was still present in aged meat but not in cooked meat indicating that meat ageing and cooking induced peptidolysis.

Concentrations of the bioactive compounds carnosine, anserine and glutathione were lower in cooked meat compared to fresh muscle, probably largely through losses in the cooking juice. However, as emphasized by Purchas et al. (2004), dietary levels that would be required to be beneficial to human health have never been clearly defined. The present study showed that, even when cooked under severe conditions, beef remains a substantial source of carnosine and anserine.

We subsequently focused on peptides generated by processing. It has been established that protein degradation and polypeptide production occur during meat ageing. Thus, degradation of specific myofibrillar and cytoskeletal proteins is widely accepted, for example of titin and nebulin (Huff-Lonergan, Parrish, & Robson, 1995), desmin (Koochmarai, Whipple, Kretchmar, Crouse, & Mersmann, 1991), and troponin T (Ho, Stromer, & Robson, 1994). In our study, SDS-PAGE profiles of total muscle and meat proteins confirmed such changes. Such modifications were expected to be accompanied by peptide release (Mullen et al., 2000). For example, Claeys et al. (2004) observed an increase in peptide concentration in the 3–17 kDa molecular weight range in both pork and beef muscles during 14 days of *postmortem* ageing. In lamb muscle, an increase of small peptides (<2.4 kDa) was also observed during 21 days of meat ageing (Sylvestre, Feidt, & Brun-Bellut, 2001). In our study, a limited number of small peptides ( $m/z$  976.0–3546.4) were reproducibly generated during meat ageing. The large increase of glycine in the peptidic form between T0 and T14 suggests that glycine-rich peptides were preferentially generated. Nevertheless, the most pronounced generation of peptides was observed after cooking. Cooking, and the concomitant protein denaturation caused, induces drastic changes in meat structure, such as myofibril fragmentation, gel formation of sarcoplasmic proteins or shrinkage and solubilization of the connective tissue (Cheng & Parrish, 1976; Palka, 2003). It has also been reported to generate additional peptides, particularly at high cooking temperatures (Spanier, Mcmillin, & Miller, 1990). In our study, the drastic cooking conditions

were favorable for the generation of small peptides. The underlying mechanism is unknown: enzymatic cleavage as suggested by Spanier et al. (1990), fragmentation induced by chemical modifications of amino acids (Stadtman, 1990) or direct hydrolysis in the mild acidic conditions prevailing in aged meat. In any case, cleavage sites were extremely specific as indicated by the reproducibility of the MALDI-ToF spectra.

Success in the identification of peptides was relatively limited, and most of the identified peptides were not in the list of peptides detected in the six animals by MALDI-ToF. This phenomenon has previously been observed in other studies using the two techniques (Person et al., 2003), generating ions specific to the mode of ionization. The few identified peptides corresponded to proteins from connective tissue (procollagen types I and IV) and other structural proteins (troponin T, nebulin, and cypher protein 3).

Collagen, the major connective tissue protein, contains a high amount of proline and glycine residues and is therefore very stable during meat ageing unless it is extended beyond 2 weeks (Nishimura, Liu, Hattori, & Takahashi, 1998). However, collagen is denatured during heat treatment (Rochdi, Bonnet, & Kopp, 1985) and prolonged heating of meat above 70 °C, as applied in the present study, has been reported to encourage collagen peptide bond breakage (Sims & Bailey, 1992). We confirmed the presence of collagen fragments after cooking.

Regarding the three other proteins, they are all targets of *postmortem* proteolysis. Cypher proteins, localized at the Z-line and binding  $\alpha$ -actinin (Zhou, Ruiz-Lozano, Martone, & Chen, 1999), have recently been reported to be affected by *postmortem* storage in pig meat (Morzel et al., 2004). No data is available on the effect of heat treatment on such proteins, but their cleavage would be consistent with the previous reports of fragmentation of myofibrils at the Z-disks after heating of bovine muscle at 70 °C (Sylvestre et al., 2001). Nebulin also is described as a substrate for calpain during refrigerated *postmortem* storage of meat (Taylor, Geesink, Thompson, Koochmarai, & Goll, 1995) and degradation of this protein at high pressure at 60 °C has been reported (Locker & Wild, 1984). Because the main purpose of the present study was to characterize peptides in ready-to-eat meat, identifications were performed only on T14c samples. We therefore can not prove that peptides originating from nebulin and cypher proteins were already present after meat ageing, or were generated by the heat treatment. This information, in contrast, is available for troponin T. The larger fragment APPPPAEVPEVHEEVH, produced by proteolytic removal of the glutamic acid-rich N-terminal region of the protein (Muroya, Nakajima, & Chikuni, 2003), has been proposed as an indicator of the progress of meat ageing (Okumura, Yamada, & Nishimura, 2003). In the present study, both fragments found in cooked meat were also detected by MALDI-ToF in aged meat (only in four animals for the fragment at  $m/z$  1566.2), indicating clearly



that these peptides were stable during cooking. It is likely that the high proportion of proline residues contributed to this heat stability.

Characterization of small peptides in cooked beef meat was a first step in the assessment of specific aspects of the nutritional value of meat, namely the supply of bioactive peptides. Next steps will be the characterization of meat derived peptides in the small intestine of the consumer, and the assessment of their bioavailability.

## References

- Abe, H. (2000). Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituents in vertebrate muscle. *Biochemistry-Moscow*, *65*, 757–765.
- Aristoy, M. C., & Toldra, F. (2004). Histidine dipeptides HPLC-based test for the detection of mammalian origin proteins in feeds for ruminants. *Meat Science*, *67*, 211–217.
- Bauchart, C., Chambon, C., Patureau Mirand, P., Savary-Auzeloux, I., Rémond, D., & Morzel M. (in press). Peptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle subjected to ice storage and cooking. *Food Chemistry*.
- Boldyrev, A. A., & Severin, S. E. (1990). The histidine-containing dipeptides, carnosine and anserine: distribution, properties and biological significance. *Advances in Enzyme Regulation*, *30*, 175–194.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248–254.
- Chan, K. M., & Decker, E. A. (1994). Endogenous skeletal muscle antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *34*, 403–426.
- Cheng, C. S., & Parrish, F. C. Jr., (1976). Scanning electron microscopy of bovine muscle: effect of heating on ultrastructure. *Journal of Food Science*, *41*, 1449–1454.
- Claeys, E., De Smet, S., Balcaen, A., Raes, K., & Demeyer, D. (2004). Quantification of fresh meat peptides by SDS-PAGE in relation to ageing time and taste intensity. *Meat Science*, *67*, 281–288.
- Clare, D. A., & Swaisgood, H. E. (2000). Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of Dairy Science*, *83*, 1187–1195.
- Dangin, M., Boirie, Y., Guillet, C., & Beaufrère, B. (2002). Influence of the protein digestion rate on protein turnover in young and elderly subjects. *Journal of Nutrition*, *132*, 3228S–3233S.
- Etherington, D. J. (1991). Enzymes in meat industry. In G. A. Tucker & L. F. Woods (Eds.), *Enzymes in food processing* (pp. 128). London: Blackie.
- Feidt, C., Brun-Bellut, J., & Dransfield, E. (1998). Liberation of peptides during meat storage and their interaction with proteinase activity. *Meat Science*, *49*, 223–231.
- Ho, C. Y., Stromer, M. H., & Robson, R. M. (1994). Identification of the 30-kDa polypeptide in *post-mortem* skeletal-muscle as a degradation product of troponin-T. *Biochimie*, *76*, 369–375.
- Huff-Lonergan, E., Parrish, F. C., & Robson, R. M. (1995). Effects of postmortem aging time, animal age, and sex on degradation of Titin and Nebulin in bovine longissimus muscle. *Journal of Animal Science*, *73*, 1064–1073.
- Kitts, D. D., & Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, *9*, 1309–1323.
- Koohmaraie, M., Whipple, G., Kretchmar, D. H., Crouse, J. D., & Mersmann, H. J. (1991). Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *Journal of Animal Science*, *69*, 617–624.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides – opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, *9*, 1297–1308.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680–685.
- Locker, R. H., & Wild, D. J. C. (1984). The fate of the large proteins of the myofibril during tenderising treatments. *Meat Science*, *11*, 89–108.
- Maynard, L. M., Boissonneault, G. A., Chow, C. K., & Bruckner, G. G. (2001). High Levels of dietary carnosine are associated with increased concentrations of carnosine and histidine in rat soleus muscle. *Journal of Nutrition*, *131*, 287–290.
- Morzel, M., Chambon, C., Hamelin, M., Sante-Lhoutellier, V., Sayd, T., & Monin, G. (2004). Proteome changes during pork meat ageing following use of two different pre-slaughter handling procedures. *Meat Science*, *67*, 689–696.
- Mullen, A. M., Stoeva, S., Laib, K., Gruebler, G., Voelter, W., & Troy, D. J. (2000). Preliminary analysis of amino acids at various locations along the M-Longissimus dorsi in aged beef. *Food Chemistry*, *69*, 461–465.
- Muroya, S., Nakajima, I., & Chikuni, K. (2003). Amino acid sequences of multiple fast and slow troponin T isoforms expressed in adult bovine skeletal muscles. *Journal of Animal Science*, *81*, 1185–1192.
- Nishimura, T., Liu, A., Hattori, A., & Takahashi, A. (1998). Changes in mechanical strength of intramuscular connective tissue during postmortem aging of beef. *Journal of Animal Science*, *76*, 528–532.
- Okumura, T., Yamada, R., & Nishimura, T. (2003). Survey of conditioning indicators for pork loins: changes in myofibrils, proteins and peptides during postmortem conditioning of vacuum-packed pork loins for 30 days. *Meat Science*, *64*, 467–473.
- Palka, K. (2003). The Influence of post-mortem ageing and roasting on the microstructure, texture and collagen solubility of bovine semitendinosus muscle. *Meat Science*, *64*, 191–198.
- Person, M. D., Lo, H. H., Towndrow, K. M., Jia, Z., Monks, T. J., & Lau, S. S. (2003). Comparative identification of prostanoid inducible proteins by LC-ESI-MS/MS and MALDI-TOF mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, *16*, 757–767.
- Prados, J., Kalousis, A., Sanchez, J.-C., Allard, L., Carrette, O., & Hilario, M. (2004). Mining mass spectra for diagnosis and biomarker discovery of cerebral accidents. *Proteomics*, *4*, 2320–2332.
- Purchas, R. W., Rutherford, S. M., Pearce, P. D., Vather, R., & Wilkinson, B. H. P. (2004). Cooking temperature effects on the forms of iron and levels of several other compounds in beef semitendinosus muscle. *Meat Science*, *68*, 201–207.
- Robinson, M. K., Rounds, J. D., Hong, R. W., Jacobs, D. O., & Wilmore, D. W. (1992). Glutathione deficiency increases organ dysfunction after hemorrhagic shock. *Surgery*, *112*, 140–147.
- Rochdi, A., Bonnet, M., & Kopp, J. (1985). Dénaturation du collagène musculaire au cours du chauffage: Incidence de la restriction des fibres sur la concentration et le degré de dénaturation. *Sciences Des Aliments*, *5*, 293–298.
- Sims, T. J., & Bailey, A. J. (1992). Structural aspects of cooked meat. In D. E. Johnston, M. K. Knight, & D. A. Ledward (Eds.), *The chemistry of muscle based foods* (pp. 106–127). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Spanier, A. M., Mcmillin, K. W., & Miller, J. A. (1990). Enzyme activity levels in beef: effect of postmortem aging and end-point cooking temperature. *Journal of Food Science*, *55*, 318–322.
- Stadman, E. R. (1990). Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biology and Medicine*, *9*, 315–325.
- Sylvestre, M. N., Feidt, C., & Brun-Bellut, J. (2001). Post-mortem evolution of non-protein nitrogen and its peptide composition in growing lamb muscles. *Meat Science*, *58*, 363–369.
- Taylor, R. G., Geesink, G. H., Thompson, V. F., Koohmaraie, M., & Goll, D. E. (1995). Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? *Journal of Animal Science*, *73*, 1351–1367.
- Vercurryse, L., Van Camp, J., & Smagge, G. (2005). Ace inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle



- protein: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8106–8115.
- Wierzbicka, G. T., Hagen, T. M., & Tones, D. P. (1989). Glutathione in food. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2, 327–337.
- Zhou, Q., Ruiz-Lozano, P., Martone, M. E., & Chen, J. (1999). Cypher, a striated muscle-Restricted PDZ and LIM domain-containing protein, binds to alpha-actinin-2 and protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 19807–19813.

## **Discussion générale**

L'analyse de la fraction peptidique de la chair de truite et de la viande bovine a révélé des différences marquées dans la composition des peptides présents dans le muscle frais et dans l'évolution de cette composition au cours des périodes de conservation/maturation et cuisson.

En ce qui concerne les peptides endogènes majoritaires (dipeptides de l'histidine, glutathion), nous avons confirmé et quantifié la présence d'ansérine et de glutathion dans la chair de truite et celle de carnosine, d'ansérine et de glutathion dans la viande bovine. Ces peptides représentent une part importante des peptides dans le muscle frais (en rapport molaire, environ 45% chez la truite et 67% chez le bœuf des acides aminés peptidiques). Bien que pour les deux espèces les teneurs diminuent pendant la cuisson (diminution attribuée au moins en partie à une perte dans le jus de cuisson), les deux aliments caractérisés se sont révélés des sources importantes de dipeptides de l'histidine et de glutathion. Du point de vue nutritionnel, cela prend toute son importance en raison des activités biologiques attribuées à ces peptides (*cf paragraphes I.2.1.1. et I.2.2.1.*) et au regard des études démontrant que l'apport alimentaire en dipeptides de l'histidine conditionne la concentration dans les organes cibles tels que le muscle et le foie (Chan et Decker, 1994 ; Chan et al., 1994 ; Harris et al., 2006).

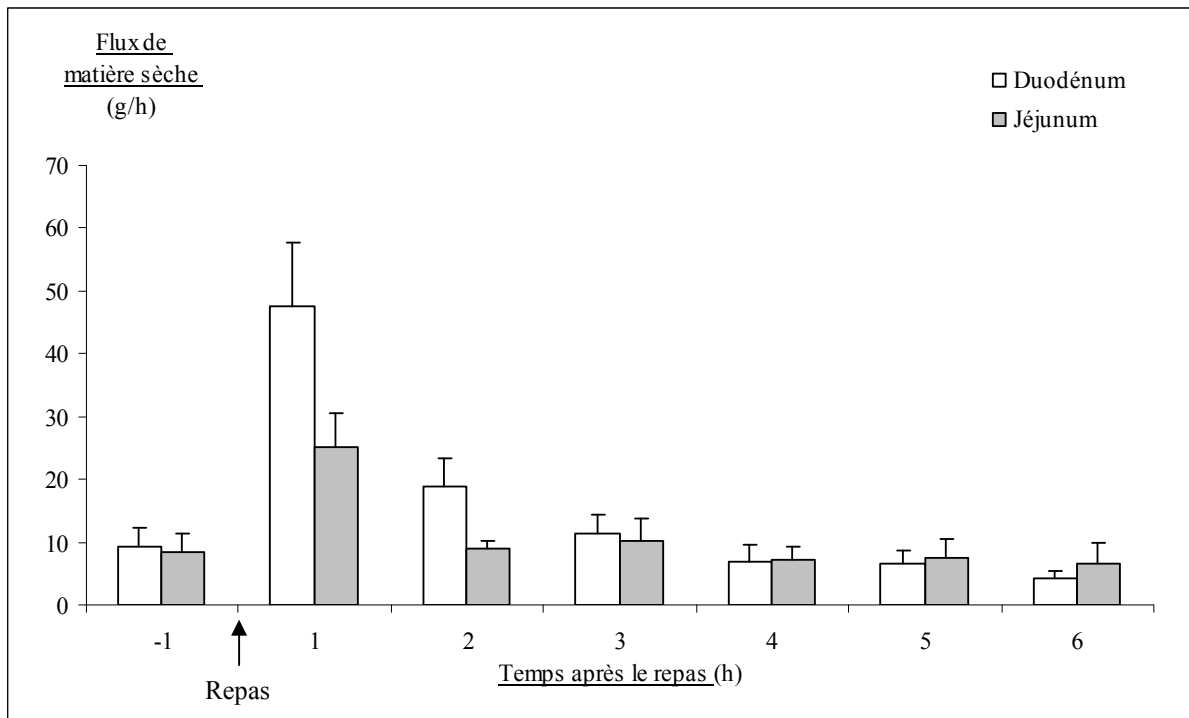
Concernant les autres peptides générés lors de la transformation technologique des produits, nous avons mis en évidence de grandes différences entre les deux espèces, avec très peu de peptides générés dans la chair de truite au contraire de la viande de bœuf. Ces différences sont sans doute étroitement liées aux traitements technologiques utilisés. En effet, l'évolution *post mortem* du muscle de poisson, et surtout la protéolyse conduisant à une altération des structures musculaires, n'est généralement pas favorable à la qualité sensorielle et technologique du produit (Delbarre-Ladrat et al., 2006). Ceci contraste avec les mammifères et particulièrement le bœuf où la protéolyse enzymatique est nécessaire pour l'attendrissement de la viande (Sentandreu et al., 2002). Ainsi, les pratiques professionnelles (température et durée de conservation) des filières concernées, dont nous sommes inspirés dans ce travail, sont spécifiquement adaptées, afin de limiter la protéolyse dans le poisson et de la favoriser de manière contrôlée chez le bœuf. Nos résultats apportent une confirmation que la génération de petits peptides dépend également de ces conditions de conservation. De plus, la cuisson de l'aliment est également génératrice de fragments protéiques, principalement par protéolyse de nature chimique. A

nouveau, nous nous sommes inspirés de pratiques culinaires classiques (cuisson courte pour le poisson, prolongée à forte température pour une pièce de bœuf riche en collagène). Nous avons ainsi montré que des conditions de cuisson sévères, utilisées ici pour la viande de bœuf, favorisent fortement la production de peptides de petite taille. En résumé, les conditions de conservation/maturation et de cuisson de la chair de truite et la viande bovine sont particulièrement importantes dans les phénomènes protéolytiques impliqués et par conséquent dans la génération de peptides.

L'identification des peptides n'a pas donné de résultats chez la truite, probablement en raison de la faible quantité de peptides dans les extraits. Dans la viande de bœuf cuite en revanche, les fragments protéiques identifiés ont confirmé des cibles de protéolyse *post mortem* bien connues comme la troponine T et la nébuline (Ho et al., 1996, Taylor et al., 1995) ou plus récemment décrites comme les protéines cypher (Morzel et al., 2004). Nous avons confirmé aussi l'apparition de fragments de collagène sous l'effet de la cuisson.

À ces peptides de l'aliment prêt à être ingéré, qu'ils soient préformés ou qu'ils résultent de la conservation ou de la cuisson, les processus digestifs vont ajouter de façon progressive ceux qui proviennent des sécrétions endogènes et de la digestion des protéines alimentaires. Le devenir ou l'impact de tous ces peptides peut donc être très différent selon leur origine, qui conditionne leur nature, leur exposition et leur sensibilité aux peptidases et aux processus d'absorption. Le prolongement de cette partie du travail a donc été d'étudier les peptides générés au cours de la digestion chez le porc après un repas composé soit de chair de truite soit de viande de bœuf.

**Figure 42** : Moyenne du flux de matière sèche de contenus duodénaux et jéjunaux de porcs (n = 4) avant et après l'ingestion de cinq aliments différents (chair de truite cuite, viandes bovines cuites (pectoral profond, faux-filet, paleron), ou aliment sans protéines).



Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM.

### **III. ETUDE DES PEPTIDES D'ORIGINE ALIMENTAIRE GÉNÉRÉS PAR LA DIGESTION DES PROTÉINES DE LA TRUITE ET DE LA VIANDE BOVINE**

#### **Introduction**

La recherche dans les contenus intestinaux de peptides d'origine alimentaire, générés *in vivo* par la digestion gastro-intestinale, n'a été que rarement entreprise. Les seules études sur ce sujet ont été réalisées avec des produits laitiers (lait, yaourt) ou des protéines ou peptides du lait (caséine, CMP). Des exorphines ( $\beta$ -casomorphines) (Svedberg et al., 1985 ; Meisel, 1986), des caséinophosphopeptides (CPPs) (Chabance et al., 1998 ; Meisel et al., 2003), des peptides issus de caséines  $\kappa$  ou  $\alpha_{S1}$  (Chabance et al., 1998 ; Fosset et al., 2002) et des fragments de CMP (Fosset et al., 2002) ont été détectés dans différentes parties du tractus gastro-intestinal chez l'homme ou l'animal (porc ou rat).

Dans ce contexte, l'objectif de cette deuxième partie de la thèse était d'étudier *in vivo* la libération de peptides par l'hydrolyse digestive d'aliment issus de chair animale (poisson, viande). Pour cela, nous avons utilisé comme animal modèle le porc en croissance, équipé chirurgicalement de deux canules digestives permettant de collecter les digesta dans le duodénum (à la sortie de l'estomac) et dans le jéjunum moyen, site majeur de l'absorption intestinale des peptides. L'utilisation d'un repas sans protéines, constitué d'un mélange d'acides aminés représentatifs de la viande, nous a permis d'identifier les peptides d'origine endogène présents dans la lumière digestive. La quantité d'aliment a été calculée de façon à apporter 40 g de protéines par repas. Une fraction de chaque repas (10%) a été marquée avec de l'Ytterbium-acétate, de façon à suivre le transit digestif de l'aliment.

Nous avons cherché à isoler et caractériser les principaux peptides apparaissant dans les contenus digestifs chez le porc suite à l'ingestion de filet de truite (*cf publication n°3*) et de pectoral profond (*cf publication n°4*), aliments cuits que nous avons précédemment étudiés. Deux autres viandes ont été également testées : le faux-filet et le paleron. Ces viandes étaient cuites dans les conditions où elles sont habituellement consommées (grillage pour le faux-filet, braisage pour le paleron). Elles ont été choisies en raison de leur différence de teneur en collagène (4,6 g et 13,2 g de collagène pour 100 g de protéines, respectivement).

**Tableau 19** : Liste des peptides d'origine alimentaire identifiés par nano-LC-ion trap MS/MS dans les contenus intestinaux de porcs équipés de deux canules, duodénale et jéjunale, collectés pendant les 3 premières heures après l'ingestion de chair de truite cuite. Les peptides listés ont été identifiés dans au moins 3 animaux sur 4 à l'aide de la base de données nr de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) restreintes aux espèces *Oncorhynchus* et *Salmo*. Les séquences bioactives contenues dans chaque peptide identifié sont reportées.

Protéine parent	Position du fragment	Séquence du fragment	m/z (M+H <sup>+</sup> )	Séquences bioactives	Activité biologique
<b>Duodénum</b>					
Actine	328-339	KIKIIPPERKY	1455,91	KY <sup>b</sup>	Antihypertensive
	96-106	LRVAPEEHPTL	1261,70	VAP <sup>a</sup>	Antihypertensive
	269-278	IGMESAGIHE	1043,48	-	-
	171-178	YALPHAIM	915,48	YALPHA <sup>a,b</sup> , ALPHA <sup>a,b</sup>	Antihypertensive
Créatine kinase	195-204	LFDKPVSPLL	1128,67	VSP <sup>a,b</sup> , LF <sup>a,b</sup>	Antihypertensive
GA3PDH	245-254	TVRLEKPASY	1163,64	RL <sup>a</sup>	Antihypertensive
	232-241	FRVPTPNVSV	1115,62	-	-
Myosine, chaîne lourde	835-842	YFKIKPLL	1021,65	IKP <sup>a,b</sup>	Antihypertensive
	109-115	YNLKERY	985,51	RY <sup>a,b</sup>	Antihypertensive
Myosine, chaîne légère 2	106-115	FKVLDPDATGF	1209,62	-	-
Myosine, chaîne légère 3	153-160	FVKHVLSV	928,56	-	-
<b>Jejunum</b>					
Actine	241-252	SYELPDGQVITI	1334,68	-	-
	31-41	AVFPSIVGRPR	1198,71	IVGRPR <sup>b</sup> , GRP <sup>a,b</sup> , VF <sup>a,b</sup> ,FP <sup>a</sup> , PR <sup>a</sup> ,RP <sup>c</sup>	Antihypertensive
	21-30	AGFAGDDAPR	976,45	PR <sup>a</sup>	Antihypertensive
	34-41	PSIVGRPR	881,53	IVGRPR <sup>b</sup> , GRP <sup>a,b</sup> ,PR <sup>a</sup> , RP <sup>c</sup>	Antihypertensive
Créatine kinase	195-203	LFDKPVSPLL	1015,58	VSP <sup>a,b</sup> , LF <sup>a,b</sup>	Antihypertensive
GA3PDH	232-241	FRVPTPNVSV	1115,62	-	-
Myosine, chaîne lourde	1488-1497	NSYEEALDHL	1190,53	HL <sup>a</sup>	Antioxydante

Références : <sup>a</sup> Base de données BioPep (Dziuba et al., 1999), <sup>b</sup> Vercruyssen et al. (2005), <sup>c</sup> Sentandreu et Toldrà (2007).

## **Principaux résultats**

Quel que soit l'aliment étudié (poisson, pectoral profond, faux-filet, paleron et aliment sans protéines), les trois-quarts de la matière sèche collectée au niveau du duodénum et du jéjunum pendant les 6 h de période post-prandiale ont été obtenus au cours des 3 premières heures suivant le repas (**Figure 42**).

### **- Peptides observés de façon répétable après ingestion de truite** (*cf publication n°3*)

L'analyse par nano-HPLC-ESI-IT MS/MS de la fraction peptidique des contenus digestifs collectés pendant les 3 premières heures après l'ingestion de filet de truite, a permis d'identifier 17 peptides (< 2 kDa) présents dans au moins 3 animaux sur 4 (**Tableau 19**). Onze et 7 peptides ont été identifiés dans les contenus duodénaux et jéjunaux, respectivement. Les peptides identifiés provenaient de 6 protéines différentes : l'actine, la myosine (chaîne lourde, chaîne légère 2 et chaîne légère 3), la GA3PDH et la créatine kinase. Un seul peptide était commun aux deux types de contenus digestifs, correspondant au fragment 232-241 de la GA3PDH (FRVPTPNVSV, 1115,62 m/z). Une des particularités de ces séquences peptidiques est qu'elles possédaient une forte proportion de résidus proline, représentant environ 12% et 14% de l'ensemble des résidus de toutes les séquences peptidiques identifiées de façon répétable au niveau du duodénum et du jéjunum, respectivement. Des séquences bioactives, principalement à activité antihypertensive, ont été trouvées à l'intérieur des peptides identifiés (**Tableau 19**). Ce sont principalement de courtes séquences formées de 2 à 3 acides aminés, avec pour exception 3 fragments de 5 à 6 acides aminés issus d'actine (ALPHA, YALPHA et IVGRPR).

### **- Peptides observés de façon répétable après ingestion de pectoral profond** (*cf publication n°4*)

Parmi les peptides identifiés par nano-HPLC-ESI-IT MS/MS dans les contenus digestifs recueillis pendant les 3 premières heures après ingestion de pectoral profond cuit, 11 d'entre eux, d'une taille inférieure à 2 kDa, étaient présents dans 3 animaux sur 4 au niveau duodéal et 6 au niveau jéjunal (**Tableau 20**). Ils étaient issus de 5 protéines différentes : l'actine, la myosine (polypeptide 4), la GA3PDH, la créatine kinase et la myoglobine. Deux peptides étaient présents à la fois au niveau du duodénum et du jéjunum. Il s'agit des fragments 31-41 d'actine (AVFPSIVGRPR, 1198,71 m/z) et 231-240 de la GA3PDH (FRVPTPNVSV, 1115,62 m/z). Comme dans l'étude précédente, les

**Tableau 20** : Liste des peptides d'origine alimentaire identifiés par nano-LC-ion trap MS/MS dans les contenus intestinaux de porcs équipés de deux canules, duodénales et jéjunales, collectés pendant les 3 premières heures après l'ingestion de viande bovine cuite (pectoral profond). Les peptides listés ont été identifiés dans au moins 3 animaux sur 4 à l'aide de la base de données nr de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) restreintes à l'espèce *Bos taurus*. Les séquences bioactives contenues dans chaque peptide identifié sont reportées.

Protéine parent	Position du fragment	Séquence du fragment	m/z (M+H <sup>+</sup> )	Séquences bioactives	Activité biologique
<b>Duodénum</b>					
Actine	96-106	LRVAPEEHPTL	1261,70	VAP <sup>a</sup>	Antihypertensive
	181-191	DLAGRDLTDYL	1251,62	YL <sup>a,b</sup>	Antihypertensive
	31-41	AVFPSIVGRPR	1198,71	YL <sup>a,b</sup>	Opioïde
				IVGRPR <sup>b</sup> , GRP <sup>a,b</sup> , VF <sup>a</sup> , b	Antihypertensive
	171-180	YALPHAIMRL	1184,66	FP <sup>a</sup> , PR <sup>a</sup> , RP <sup>c</sup> YALPHA <sup>a,b</sup> , ALPHA <sup>a,b</sup> , RL <sup>a</sup>	Antihypertensive
	96-105	LRVAPEEHPT	1148,61	VAP <sup>a</sup>	Antihypertensive
24-33	AGDDAPRAVF	1018,50	PR <sup>a</sup> , VF <sup>a</sup>	Antihypertensive	
171-178	YALPHAIM	915,48	YALPHA <sup>a,b</sup> , ALPHA <sup>a,b</sup>	Antihypertensive	
Créatine kinase	193-202	LFDKPVSPLL	1128,67	VSP <sup>a,b</sup> , LF <sup>a,b</sup>	Antihypertensive
GA3PDH	231-240	FRVPTPNVSV	1115,62	-	-
Myoglobine	147-154	YKVLGFHG	920,50	-	-
Myosine, polypeptide 4	326-333	YFKIKPLL	1021,65	IKP <sup>a,b</sup>	Antihypertensive
<b>Jejunum</b>					
Actine	31-41	AVFPSIVGRPR	1198,71	IVGRPR <sup>b</sup> , GRP <sup>a,b</sup> , VF <sup>a,b</sup> , FP <sup>a</sup> , PR <sup>a</sup> , RP <sup>c</sup>	Antihypertensive
	32-41	VFPSIVGRPR	1127,67	IVGRPR <sup>b</sup> , GRP <sup>a,b</sup> , VF <sup>a,b</sup> , FP <sup>a</sup> , PR <sup>a</sup> , RP <sup>c</sup>	Antihypertensive
	21-30	AGFAGDDAPR	976,45	PR <sup>a</sup>	Antihypertensive
Créatine kinase	193-201	LFDKPVSP	1015,58	VSP <sup>a,b</sup> , LF <sup>a,b</sup>	Antihypertensive
	194-201	FDKPVSP	902,50	VSP <sup>a,b</sup>	Antihypertensive
GA3PDH	231-240	FRVPTPNVSV	1115,62	-	-

Références : <sup>a</sup> Base de données BioPep (Dziuba et al., 1999), <sup>b</sup> Vercruyse et al. (2005), <sup>c</sup> Sentandreu et Toldrá (2007).



séquences peptidiques identifiées dans les contenus digestifs étaient particulièrement riches en résidus proline représentant 13% et 16% de l'ensemble des résidus de toutes les séquences peptidiques identifiées chez 3 animaux sur 4, au niveau du duodénum et du jéjunum, respectivement. De courtes séquences bioactives de 2 à 3 acides aminés, à l'exception des fragments d'actine ALPHA, YALPHA et IVGRPR, sont présentes dans les peptides identifiés avec un effet antihypertensif principalement (**Tableau 20**).

#### **- Peptides observés de façon répétable après ingestion de faux filet ou paleron**

L'analyse par nano-HPLC-ESI-IT MS/MS de la fraction peptidique des contenus digestifs collectés pendant les 3 premières heures après l'ingestion de faux-filet grillé (**Tableau 21**) et de paleron braisé (**Tableau 22**) a permis d'identifier des peptides d'une taille < 2 kDa, présents dans au moins 3 animaux sur 4. Il s'agissait principalement des fragments issus d'actine, de fructose-1,6-bisphosphate aldolase, de GA3PDH et de myoglobine avec le faux-filet, et des fragments issus d'actine, de créatine kinase, de GA3PDH et de myoglobine avec le paleron. Comme précédemment, la présence de résidus proline était fréquente dans les séquences identifiées. Des séquences potentiellement bioactives, identiques à celles déjà trouvées dans les peptides identifiés dans les études précédentes avec la chair de truite et le pectoral profond, sont présentes à l'intérieur de certains peptides. Seules deux nouvelles séquences bioactives ont été trouvées : il s'agit des séquences PG, à activité antithrombotique, présente dans le fragment 19-31 de la fructose-1,6-bisphosphate aldolase avec le faux-filet, et LH, à activité antioxydante, présente dans le fragment 111-124 de la myoglobine avec le paleron.

### **Résultats complémentaires**

Outre les peptides détectés et identifiés de façon répétable, de très nombreux autres peptides apparaissant de façon plus aléatoire (59 dans le duodénum et 79 dans le jéjunum) ont été identifiés dans une gamme de tailles variant de 756 à 2239 m/z (**Annexe 2**). Ils proviennent principalement de l'actine et de la myosine. Il faut noter que parmi les 45 peptides différents issus de la myosine détectés dans les contenus duodénaux et jéjunaux, 5 étaient observés de façon répétable alors qu'il y en avait 17 sur 65 pour l'actine.

Ces travaux sur les peptides originaires des protéines alimentaires apparus au cours de la digestion ont aussi nécessité de les distinguer des peptides endogènes. Un grand nombre a été identifié, soit à l'état post-absorptif, soit après un repas sans protéines, que ce

**Tableau 21** : Liste des peptides d'origine alimentaire identifiés par nano-LC-ion trap MS/MS dans les contenus intestinaux de porcs équipés de deux canules, duodénale et jéjunale, collectés pendant les 3 premières heures après l'ingestion de viande bovine cuite (faux-filet). Les peptides listés ont été identifiés dans au moins 3 animaux sur 4 à l'aide de la base de données nr de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) restreintes à l'espèce *Bos taurus*. Les séquences bioactives contenues dans chaque peptide identifié sont reportées.

Protéine parent	Position du fragment	Séquence du fragment	m/z (M+H <sup>+</sup> )	Séquences bioactives	Activité biologique
<b>Duodénum</b>					
Actine	96-106	LRVAPEEHPTL	1261,70	VAP <sup>a</sup>	Antihypertensive
	171-178	YALPHAIM	915,48	YALPHA <sup>a,b</sup> , ALPHA <sup>a,b</sup>	Antihypertensive
Fructose-1,6-bisphosphate aldolase	19-31	IAHRIVAPGKGIL	1344,85	VAP <sup>a</sup> PG <sup>a</sup>	Antihypertensive Antithrombotique
GA3PDH	231-240	FRVPTPNVSV	1115,62	-	-
Myoglobine	147-154	YKVLGFHG	920,50	-	-
<b>Jejunum</b>					
Actine	31-41	AVFPSIVGRPR	1198,71	IVGRPR <sup>b</sup> , GRP <sup>a,b</sup> , VF <sup>a,b</sup> ,FP <sup>a</sup> , PR <sup>a</sup> ,RP <sup>c</sup>	Antihypertensive
GA3PDH	231-240	FRVPTPNVSV	1115,62	-	-

Références : <sup>a</sup> Base de données BioPep (Dziuba et al., 1999), <sup>b</sup> Vercruyse et al. (2005), <sup>c</sup> Sentandreu et Toldrá (2007).

soit au niveau duodéal ou au niveau jéjunal. La plupart d'entre eux ont une origine salivaire ou proviennent des sécrétions stomacales ou pancréatiques et sont particulièrement riches en proline (**Annexe 3**).

**Tableau 22** : Liste des peptides d'origine alimentaire identifiés par nano-LC-ion trap MS/MS dans les contenus intestinaux de porcs équipés de deux canules, duodénale et jéjunale, collectés pendant les 3 premières heures après l'ingestion de viande bovine cuite (paleron). Les peptides listés ont été identifiés dans au moins 3 animaux sur 4 à l'aide de la base de données nr de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) restreintes à l'espèce *Bos taurus*. Les séquences bioactives contenues dans chaque peptide identifié sont reportées.

Protéine parent	Position du fragment	Séquence du fragment	m/z (M+H <sup>+</sup> )	Séquences bioactives	Activité biologique
<b>Duodénum</b>					
Actine	96-106	LRVAPEEHPTL	1261,70	VAP <sup>a</sup>	Antihypertensive
	97-106	RVAPPEEHPTL	1148,61	VAP <sup>a</sup>	Antihypertensive
	24-33	AGDDAPRAVF	1018,50	PR <sup>a</sup> , VF <sup>a</sup>	Antihypertensive
	171-178	YALPHAIM	915,48	YALPHA <sup>a,b</sup> , ALPHA <sup>a,b</sup>	Antihypertensive
Myoglobine	111-124	AIIHVLHAKHPSDF	1584,87	LH <sup>a</sup>	Antioxydante
	147-154	YKVLGFHG	920,50	-	-
<b>Jejunum</b>					
Actine	31-41	AVFPSIVGRPR	1198,71	IVGRPR <sup>b</sup> , GRP <sup>a,b</sup> , VF <sup>a</sup> , b FP <sup>a</sup> , PR <sup>a</sup> , RP <sup>c</sup>	Antihypertensive
	32-41	VFPSIVGRPR	1127,67	IVGRPR <sup>b</sup> , GRP <sup>a,b</sup> , VF <sup>a,b</sup> , FP <sup>a</sup> , PR <sup>a</sup> , RP <sup>c</sup>	Antihypertensive
	33-41	FPSIVGRPR	1028,60	IVGRPR <sup>b</sup> , GRP <sup>a,b</sup> , FP <sup>a</sup> , PR <sup>a</sup> , RP <sup>c</sup>	Antihypertensive
	33-40	FPSIVGRP	872,50	GRP <sup>a,b</sup> , FP <sup>a</sup> , RP <sup>c</sup>	Antihypertensive
Créatine kinase	193-201	LFDKPV SPL	1015,58	VSP <sup>a,b</sup> , LF <sup>a,b</sup>	Antihypertensive
	194-201	FDKPV SPL	902,50	VSP <sup>a,b</sup>	Antihypertensive
GA3PDH	231-240	FRVPTPNVSV	1115,62	-	-

Références : <sup>a</sup> Base de données BioPep (Dziuba et al., 1999), <sup>b</sup> Vercruyse et al. (2005), <sup>c</sup> Sentandreu et Toldrá (2007).

---

**Publication n°3**

**Peptides containing bioactive sequences  
released during digestion of cooked trout flesh in pigs**

Caroline Bauchart <sup>a, b</sup>, Didier Rémond <sup>b</sup>, Christophe Chambon <sup>a</sup>,  
Philippe Patureau Mirand <sup>b</sup>, Christelle Reynès <sup>c</sup>, Caroline Buffière <sup>b</sup>, Martine Morzel <sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Qualité des Produits Animaux*, <sup>b</sup> *UMR 1019 Unité de Nutrition Humaine*,

*Institut National de la Recherche Agronomique*,

*Centre de Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France.*

<sup>c</sup> *Laboratoire de Physique Moléculaire et Structurale, Faculté de Pharmacie,*  
*34060 Montpellier, France.*

***Journal of Agricultural and Food Chemistry (soumis)***

---

**Peptides containing bioactive sequences  
released during digestion of cooked trout flesh in pigs**

Caroline Bauchart,<sup>a, b</sup> Didier Rémond,<sup>b, \*</sup> Christophe Chambon,<sup>a</sup>  
Philippe Patureau Mirand,<sup>b</sup> Christelle Reynès,<sup>c</sup> Caroline Buffière,<sup>b</sup> and Martine Morzel,<sup>a</sup>

<sup>a</sup> INRA, Unité Qualité des Produits Animaux, Centre INRA de Clermont-Ferrand – Theix, F-63122 Theix, France.

<sup>b</sup> INRA, UMR 1019, Centre INRA de Clermont-Ferrand – Theix, F-63122 Theix, France; CRNH Auvergne, F-63001 France.

<sup>c</sup> Laboratoire de Physique Moléculaire et Structurale, Faculté de Pharmacie, 34060 Montpellier, France.

\* Corresponding author. Tel.: +33(0)4-73-62-40-74; fax: +33(0)4-73-62-47-55; e-mail: remond@clermont.inra.fr.

**ABSTRACT**

The release of peptides in the duodenum and jejunum of pigs during digestion of cooked trout was investigated, using mass spectrometry analyses (MALDI-ToF and nano-LC-ESI-ion trap MS/MS). Mainly short peptides (<2 kDa) were generated. They were detected in majority within the first 3 hours of digestion. The peptidic composition of digesta varied according to the intestine level: peptides identified in duodenum digesta were characteristic of the result of protein digestion by pepsin, while peptides in jejunum digesta appeared as a mixture of peptides generated earlier and fully or partly resistant to digestive hydrolysis, and peptides generated by trypsin and chymotrypsin. In total, 17 proline-rich peptides derived from major abundant muscle proteins were identified. Twelve of them contained bioactive sequences, corresponding mostly to an ACE inhibitory activity.

**KEYWORDS: Peptides; trout proteins; pig; digestion; mass spectrometry**

## INTRODUCTION

The role of proteins as physiologically active components in the diet is being increasingly acknowledged, among others reasons because they may represent a source of bioactive peptides. Bioactive peptides have been defined as specific protein fragments that have, in addition to their nutritional value, a positive impact on body functions and could ultimately influence health. Once liberated in the body, they may act for example as antihypertensive, antithrombotic, opioid, immunomodulator, antimicrobial, and antioxidant peptides (1, 2). Many bioactive peptides reveal multifunctional properties (3). Such peptides, varying in size from 2 to 50 amino acid residues, are inactive within the sequence of the parent protein and can be released during gastrointestinal digestion, food processing or by fermentation process (2).

While studies on the generation of bioactive peptides from foods have focused primarily on milk, muscle proteins are another valuable source of potentially bioactive peptides (4). For instance, various angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor peptides have been isolated from fish muscle protein hydrolysates such as sardine, bonito, tuna and salmon, exerting an antihypertensive activity *in vitro* and/or *in vivo* after oral or intravenously administration to spontaneously hypertensive rats (5). Recently, it was reported that fish protein hydrolysates, obtained by controlled enzymatic hydrolysis of muscle proteins displayed a significant antiproliferative activity in human cancer cell lines *in vitro* (6) and the oral administration of a fermented fish protein concentrate to mice enhanced gut associated non-specific immunity (7). However, to our knowledge, no study has been performed *in vivo* in order to determine if bioactive peptides can be released by the gastrointestinal digestion of fish muscle food.

In a previous study (8), we have evidenced the presence of low molecular weight, yet unidentified, peptides in ready-to-eat rainbow trout flesh. The present study aimed at characterising and identifying peptides in intestinal contents, after ingestion of cooked rainbow trout flesh, using pig as an animal model. Complementary approaches of mass spectrometry analysis by MALDI-ToF and nano-LC-ESI-ion trap MS/MS were developed.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals.** The study involved four 3-month-old female pigs ( $40.5 \pm 5.2$  kg). Three weeks before the experimentation, pigs were surgically fitted with a T-shaped cannula (silicone rubber; 12 mm i.d., 17 mm o.d.) in the duodenum (10 cm downstream from the pylorus) and the mid-jejunum (about 4 m downstream from the pylorus), and a catheter

(polyvinyl chloride; 1.1 mm i.d., 1.9 mm o.d.) in the cava vein. Surgical procedures and post-surgical care were conducted in accordance with national legislation on the care and use of laboratory animals. Pigs were housed in individually pens (1 x 1.5 m) in a ventilated room with controlled temperature (19 to 23 °C). They were given 800 g/d of a concentrate food (Porcyprima, SANDERS Centre Auvergne, Aigueperse, France) distributed in two equal portions at 8.00 and 16.00, and had free access to water.

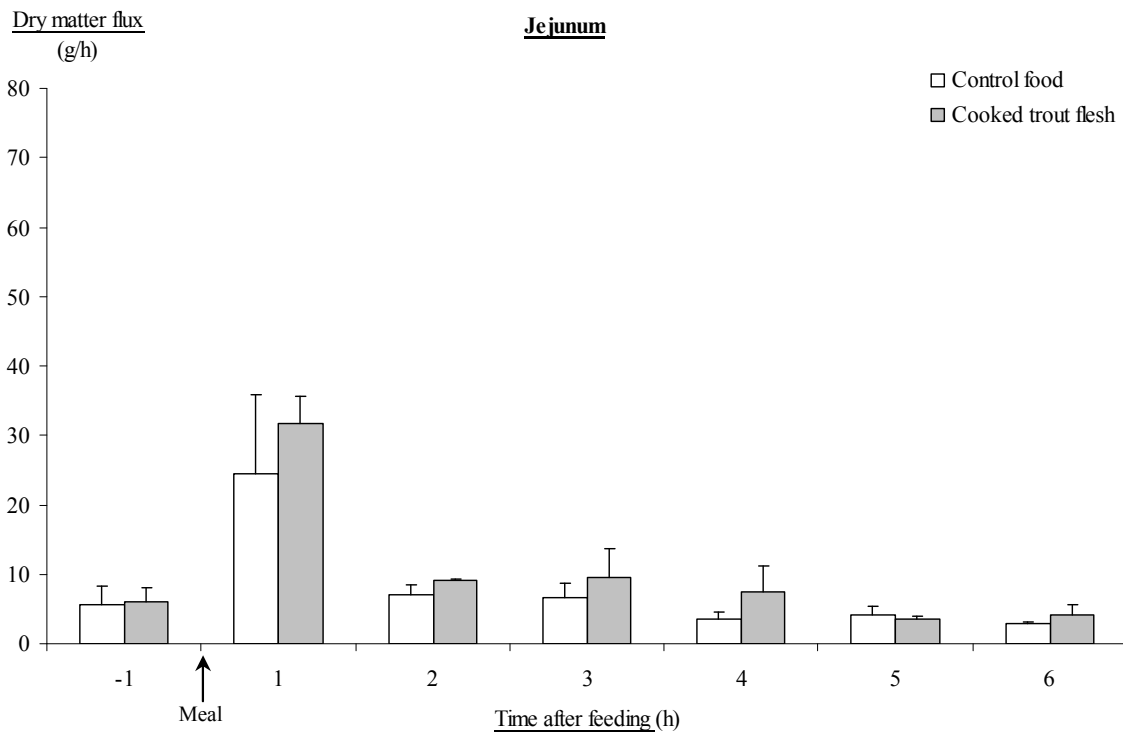
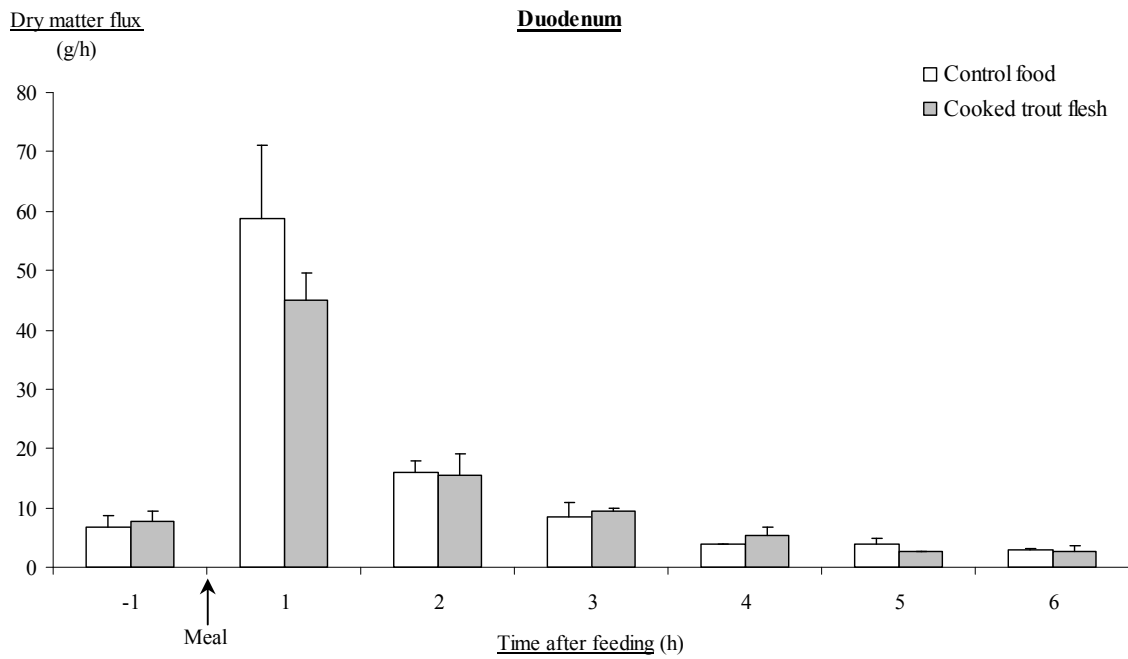
**Test meals.** White dorsal fillets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were collected after seven days of *post mortem* ice storage. Flesh was cooked under vacuum for 5 min at 70 °C in a water bath, and stored frozen until use. A control protein-free food mixture was made of 47% free amino acids (in proportion close to the amino acid composition of muscle), 23% wheat starch, 12% lard and 18% water. Each test meal provided 40 g of crude protein, and was exclusively made of either cooked fish or the control food mixture.

**Experimental procedures.** Both foods were tested on each animal. Test meals were separated by at least two days. Duodenum and jejunum digesta sampling were performed on two distinct test meals. The test meal was given at 9.00, i.e. after a fasting period of at least 16 h. Digesta were continuously collected from 8.00 to 15.00 in cold plastic bottles replaced each hour. Water intake was restricted to 250 mL/h. To prevent dehydration, 1 L of Ringer-lactate solution was intravenously infused at a rate of 150 mL/h throughout the sampling session.

Hourly collected digesta were immediately homogenised in a Waring Blender (twice 5 s at high speed, separated by 5 s). A first fraction of the homogenate (about 10 g) was used for dry matter determination (24 h at 104 °C). A second fraction (about 100 g) was treated with perchloric acid (PCA) at 170 mM (final concentration). After vigorous shaking, samples were kept on ice 15 min, and then centrifuged at 10,000g for 20 min at 4 °C. For the post-prandial period, fractions of supernatants (2% of hourly collected digesta) were pooled to yield two samples per animal: a first pool representative of the three first hours (**PP1**), and a second one representative of the three last hours (**PP2**). Post-absorptive (**PA**: sample collected before the meal), PP1 and PP2 supernatants were filtered through 5000 Da cut-off filters (Vivaspin 15, VIVASCIENCE, Hanover, Germany) at 2,000g for 8 to 15 h at 4 °C. Filtrates were stored at -80 °C until analysis.

**Mass spectrometry analysis.** Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)-time-of-flight (ToF) analysis and nano-LC-ESI-ion trap MS/MS analysis were performed as previously described by Bauchart et al. (9) with slight modifications





**Figure 1.** Dry matter flux of duodenum and jejunum digesta in pigs before and after ingestion of control protein-free food and cooked trout flesh.

Data are means ( $n = 4$ )  $\pm$  standard error.

described as follows. Filtrates were spotted directly onto the MALDI plate without prior treatment. Identification of peptides analysed by nano-LC-ESI-ion trap MS/MS was performed within the nr database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) restricted to selected fish entries (*Oncorhynchus* and *Salmo* species).

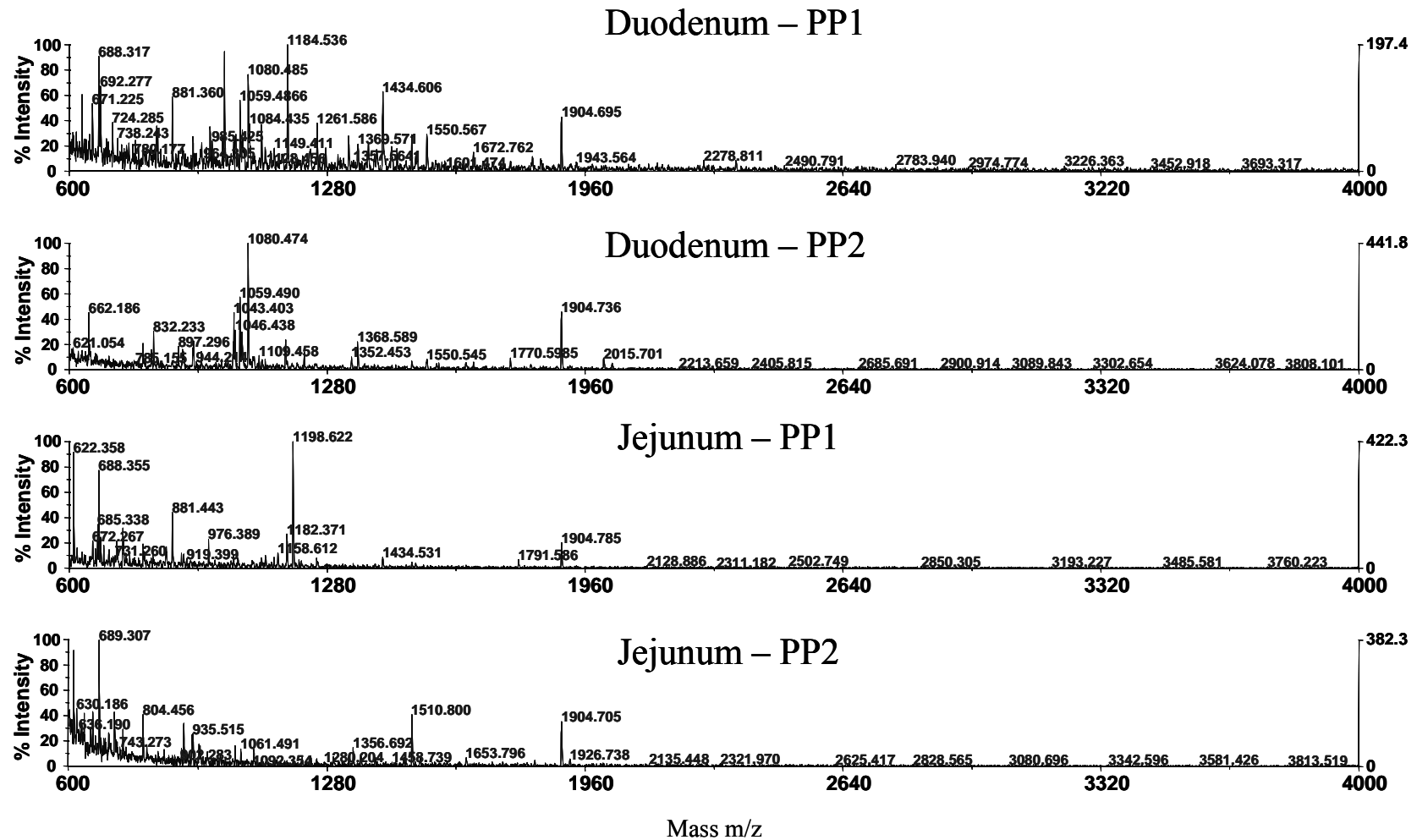
**Statistical analyses.** A statistical procedure was applied to MALDI-ToF data to determine whether peaks, at close  $m/z$  but originating from different spectra, were likely to correspond to the same compound (9). For one sampling time (PA, PP1, PP2), only the peaks gathered in a group consisting of data originating from at least 3 animals were considered. A similar procedure was subsequently applied to determine which groups of peaks corresponded to the same compound, across sampling times.

## RESULTS

**Intestinal transit.** Dry matter flux kinetics (**Figure 1**) showed that, regardless of the food ingested, about 90 and 75% of the total dry matter collected in the whole post-prandial period were collected during PP1, for duodenum and jejunum, respectively.

**Masses of peptides evidenced by MALDI-ToF.** Representative spectra corresponding to four digesta (PP1 and PP2, duodenum and jejunum) collected after ingestion of cooked trout flesh are presented in **Figure 2**. The list of peptides present in digesta of at least 3 pigs is presented in **Table 1**. Compounds detected in the intestinal contents of the post-absorptive period and after a protein-free control meal were removed from the list, ensuring that listed peptides are of an alimentary origin, as opposed to endogenous. Peptides, all with masses below 1520 Da, were most numerous in the first three hours following the meal (PP1), both in duodenum (14 vs 2) or jejunum (12 vs 0). Seven of them were common to PP1 duodenum and jejunum digesta.

**Peptide identification by nano-LC-ESI-ion trap MS/MS.** In total, 17 different peptides present in digesta of at least 3 pigs were identified (**Table 2**), out of which 5 (theoretical  $m/z$  881.53, 976.45, 1115.62, 1198.71 and 1261.69) had been previously detected in PP1 by MALDI-ToF. Eleven and 7 peptides were identified in duodenum and jejunum PP1 digesta, respectively. One peptide was common to both sampling sites. Identified peptides originated from 6 proteins: actin, myosin (heavy, light 2 and light 3 chains), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GA3PDH) and creatine kinase. Overall, a particularity of the sequences was the high proportion of proline, accounting for approximately 12% (13/107) and 14% (10/70) of all residues in peptides identified at the duodenum and jejunum level, respectively.



**Figure 2.** Representative MALDI-ToF spectra of duodenum and jejunum digesta collected from one pig during the 3 first hours (PP1) and the 3 subsequent hours (PP2) after ingestion of cooked trout fles

**Bioactive sequences within the identified peptides.** Using the BioPep database (10) and by comparison with sequences either reviewed in Vercruyse et al. (5) or evaluated more recently (11), bioactive sequences were found within 12 of the identified peptides (**Table 3**). They were mainly short sequences of 2 or 3 residues, with the exception of sequences ALPHA, YALPHA and IVGRPR, all contained in actin fragments.

## DISCUSSION

In digestive contents of pigs who had a meal constituted exclusively of cooked trout flesh, we have identified 17 peptides issued from fish muscle proteins. Among these, 12 contained one or several sequences previously reported to exert a biological activity.

Digestive events proceeded rapidly after the meal: dry matter flux showed that most of the ingested food had reached the jejunum level within 3 hours following the meal and the vast majority of food-derived peptides evidenced by MALDI-ToF was detected in the PP1 period. Very few peptides were repeatedly detected in the PP2 period, suggesting that peptides earlier generated by digestion were rapidly further processed by transformation or absorption. This is particularly true in the jejunum (no peptide listed in the PP2 period) where all pancreatic proteases may have intervened and where absorptive events are significant. Even in duodenum samples, reflecting mostly the result of the gastric proteases activity, only 2 peptides were listed. Overall, this indicates that peptides that would be generated by digestion of cooked trout would remain within the anterior intestine for a limited time only, which oriented our decision to perform identification of peptides in PP1 digesta.

A noteworthy characteristic of the detected peptides is their homogeneity in size, with an upper limit of 1520 Da. In previous works on peptides in muscle foods (9, 8) and using similar methods, ions at  $m/z$  up to 5000 were detected. Therefore, excluding the hypothesis of a technical limitation, we can confidently propose that in the molecular weight range 0-5 kDa, peptides generated by digestion of cooked trout that accumulate in the intestinal lumen were relatively short. Data on the size of peptides generated *in vivo* during digestion of proteins by gastric or intestinal enzymes are scarce. In humans, several peptides of 6 to 12 amino acids were identified in stomach and in duodenum after ingestion of milk or yogurt (12). This peptide length corresponds well to sizes we observed. Concerning *in vitro* studies, treatment of lamb meat by either pepsin or pancreatin evidenced that fragments separated by SDS-PAGE progressively accumulated as digestion proceeded (13) but the lower molecular weight of peptides that can be observed in these

**Table 1.** List of compounds (m/z 600 to 5000) detected by MALDI-ToF in pig duodenum and jejunum digesta, collected during the 3 first hours (PP1) and the 3 subsequent hours (PP2) after ingestion of cooked trout flesh. Listed compounds had an alimentary origin and were found in at least three of the four animals.

<b>Duodenum</b>		<b>Jejunum</b>	
<b>PP1</b>	<b>PP2</b>	<b>PP1</b>	<b>PP2</b>
629.29	881.47	622.33	-
671.30	1042.82	684.35	
685.37		685.37	
688.35		692.33	
692.33		881.47	
881.47		976.50	
1018.45		1115.89	
1115.89		1148.44	
1148.44		1158.59	
1182.44		1182.44	
1184.41		1198.75	
1261.70		1434.17	
1434.17			
1520.77			

conditions is 8 kDa. In another study focusing on bonito muscle treated by artificial gastric juice (14), all proteins were converted into peptides (<10 kDa) after 5 min and the corresponding band on SDS-PAGE faded drastically after 10 min, suggesting further cleavage. Some peptides were identified in samples collected after 1 h of artificial digestion and again, their lengths (8 to 15 amino acids) were consistent with sizes we observed *in vivo*. In both studies where identification of peptides is available (12, 14), the analytical procedure involved separation of compounds by RP-HPLC, which might create somehow a bias in the size of separated and identified peptides. Nevertheless, our present results corroborate that, in the molecular weight range 0-5 kDa, mainly short peptides are promptly released by digestive proteolytic enzymes and detectable in hydrolysates.

All identified peptides were fragments of abundant structural (actin, myosins) or sarcoplasmic (GA3PDH, creatine kinase) muscle proteins. This is in agreement with the *in vitro* demonstration that enzymes of the digestive tract can generate peptides from myosin and more generally from water-insoluble (mainly myofibrillar) proteins of pork meat (15), or from GA3PDH of bonito muscle (14).

More specifically, the peptides we have identified in duodenum are characteristic of peptides obtained after a pepsin hydrolysis: out of 11 available sequences, 9 possess an N-terminal residue Y, F, I, V, A or L and 9 possess a C-terminal residue F, M, L, E or Y, i.e. the most frequent amino acids in such positions after digestion by pepsin (16).

Along the course of digestion from the duodenum to the jejunum level, some peptides (m/z 685.37, 692.33, 881.47, 1115.89, 1148.44, 1182.44, 1434.17 observed by MALDI-ToF) resisted entirely proteolytic cleavage. Two were identified as fragments of actin f(34-41) and GA3PDH f(232-241). In addition, creatine kinase f(192-203) was probably issued directly from the fragment f(195-204) found in duodenum. When examining the list of peptides present in jejunum digesta of at least 2 pigs (data not shown), 12 peptides were specifically found in jejunum. Five peptides had a leucine residue at the C-terminal position, which is a characteristic of a cleavage by porcine chymotrypsin C (17) and 3 had a lysine or arginine C-terminal residue which corresponds to the specificity of trypsin digestion (18).

Overall, the detected or identified peptides were probably among the most resistant to digestive proteolytic events. This is supported by the high proportion of proline in their sequences, well above the average abundance in fish muscle proteins (19), proline-rich peptides being more resistant to digestive hydrolysis (20-22).

**Table 2.** List of peptides identified by nano-LC-ion trap MS/MS in duodenum and jejunum digesta extracts collected in pigs over the 3 hours (PP1) following ingestion of cooked trout flesh. Listed of identified peptides were found in at least 3 of the 4 animals.

Protein fragment	m/z (M+H <sup>+</sup> )	Sequence	Accession number of the parent protein	Organism
<b>Duodenum</b>				
Creatine kinase f(195-204)	1128.67	LFDKPVSPLL	gi 64315	Oncorhynchus mykiss
Fast myotomal actin f(328-339)	1455.91	KIKIIPPERKY	gi 10953948	Salmo salar
Fast myotomal actin f(96-106)	1261.70	LRVAPEEHPTL	gi 10953948	Salmo salar
Fast myotomal actin f(269-278)	1043.48	IGMESAGIHE	gi 10953948	Salmo salar
Fast myotomal actin f(171-178)	915.48	YALPHAIM	gi 10953948	Salmo salar
GA3PDH f(245-254)	1163.64	TVRLEKPASY	gi 15010816	Oncorhynchus mykiss
GA3PDH f(232-241)	1115.62	FRVPTPNVSV	gi 15010816	Oncorhynchus mykiss
Myosin heavy chain f(835-842)	1021.65	YFKIKPLL	gi 21623523	Oncorhynchus keta
Myosin heavy chain f(109-115)	985.51	YNLKERY	gi 21623523	Oncorhynchus keta
Myosin light chain 2 f(106-115)	1209.62	FKVLDPDATGF	gi 7960275	Oncorhynchus kisutch
Myosin light chain 3 f(153-160)	928.56	FVKHVLVS	gi 14335431	Oncorhynchus mykiss
<b>Jejunum</b>				
Creatine kinase f(195-203)	1015.58	LFDKPVSPL	gi 64315	Oncorhynchus mykiss
Fast myotomal actin f(241-252)	1334.68	SYELPDGQVITI	gi 10953948	Salmo salar
Fast myotomal actin f(31-41)	1198.71	AVFPSIVGRPR	gi 10953948	Salmo salar
Fast myotomal actin f(34-41)	881.53	PSIVGRPR	gi 10953948	Salmo salar
Fast myotomal actin f(21-30)	976.45	AGFAGDDAPR	gi 10953948	Salmo salar
GA3PDH f(232-241)	1115.62	FRVPTPNVSV	gi 15010816	Oncorhynchus mykiss
Myosin heavy chain f(1488-1497)	1190.53	NSYEEALDHL	gi 21623523	Oncorhynchus keta

Many bioactive sequences found within peptides in digesta corresponded to a hypertensive (ACE inhibitory) activity. This finding supports a previous suggestion that ACE inhibitory peptides may be generated in the gastrointestinal tract after ingestion of muscle foods (16). However, to exert their function in the organism, ACE inhibitory peptides must reach the blood stream, which would require further hydrolysis of identified peptides by pancreatic enzymes or by various intracellular peptidases in enterocytes. Here again, their high proportion of proline could constitute a protection against total hydrolysis into free amino acids. A perspective of this work is therefore to evaluate the appearance of food-derived peptides in plasma after ingestion of fish.



**Table 3.** Sequences, contained within peptides identified in PP1 digesta, which were reported to have a positive impact on body functions (antihypertensive or antioxidative).

Protein fragment sequence	Bioactive sequence	Biological activity
Creatine kinase f(195-204) LFDKPVSPLL	VSP <sup>a, c</sup> LF <sup>a, c</sup>	Antihypertensive
Creatine kinase f(195-203) LFDKPVSPLL	VSP <sup>a, c</sup> LF <sup>a, c</sup>	Antihypertensive
Fast myotomal actin f(328-339) KIKIIPPERKY	KY <sup>c</sup>	Antihypertensive
Fast myotomal actin f(96-106) LRVAPEEHPTL	VAP <sup>a</sup>	Antihypertensive
Fast myotomal actin f(31-41) AVFPSIVGRPR	IVGRPR <sup>c</sup> GRP <sup>a, c</sup> VF <sup>a, c</sup> FP <sup>a</sup> PR <sup>a</sup> RP <sup>b</sup>	Antihypertensive
Fast myotomal actin f(34-41) PSIVGRPR	IVGRPR <sup>c</sup> GRP <sup>a, c</sup> PR <sup>a</sup> RP <sup>b</sup>	Antihypertensive
Fast myotomal actin f(21-30) AGFAGDDAPR	PR <sup>a</sup>	Antihypertensive
Fast myotomal actin f(171-178) YALPHAIM	YALPHA <sup>a, c</sup> ALPHA <sup>a, c</sup>	Antihypertensive
GA3PDH f(245-254) TVRLEKPASY	RL <sup>a</sup>	Antihypertensive
Myosin heavy chain f(1488-1497) NSYEEALDHL	HL <sup>a</sup>	Antioxidative
Myosin heavy chain f(109-115) YNLKERY	RY <sup>a, c</sup>	Antihypertensive
Myosin heavy chain f(835-842) YFKIKPLL	IKP <sup>a, c</sup>	Antihypertensive

References: <sup>a</sup> BioPep database (10), <sup>b</sup> Sentandreu et al. (11), <sup>c</sup> Vercruysse et al. (5).

**LITERATURE CITED**

- (1) Kitts, D. D.; Weiler, K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 1309-1323.
- (2) Korhonen, H.; Pihlanto, A. Food-derived bioactive peptides - opportunities for designing future foods. *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 1297-1308.
- (3) Meisel, H.; Fitzgerald, R. J. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 1289-1295.
- (4) Arihara, K. Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Sci.* **2006**, *74*, 219-229.
- (5) Vercruyse, L.; Van Camp, J.; Smagghe, G. Ace inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: a review. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8106-8115.
- (6) Picot, L.; Bordenave, S.; Didelot, S.; Fruitier-Arnaudin, I.; Sannier, F.; Thorkelsson, G.; Bergé, J. P.; Guérard, F.; Chabeaud, A.; Piot, J. M. Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Proc. Biochem.* **2006**, *41*, 1217-1222.
- (7) Duarte, J.; Vinderola, G.; Ritz, B.; Perdigon, G.; Matar, C. Immunomodulating capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation. *Immunobiology* **2006**, *211*, 341-350.
- (8) Bauchart, C.; Chambon, C.; Patureau Mirand, P.; Savary-Auzeloux, I.; Rémond, D.; Morzel, M. Peptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle subjected to ice storage and cooking. *Food Chem.* **2007**, *100*, 1566-1572.
- (9) Bauchart, C.; Rémond, D.; Chambon, C.; Patureau Mirand, P.; Savary-Auzeloux, I.; Reynès, C.; Morzel, M. Small peptides (<5 kDa) found in ready-to-eat beef meat. *Meat Sci.* **2006**, *74*, 658-666.
- (10) Dziuba, J.; Minkiewicz, P.; Nalecz, D.; Iwaniak, A. Database of biologically active peptide sequences. *Nahrung-Food* **1999**, *43*, 190-195.
- (11) Sentandreu, M. A.; Toldrá, F. Evaluation of ACE inhibitory activity of dipeptides generated by the action of porcine muscle dipeptidyl peptidases. *Food Chem.* **2006**, *In Press*.
- (12) Chabance, B.; Marteau, P.; Rambaud, J. C.; Migliore-Samour, D.; Boynard, M.; Perrotin, P.; Guillet, R.; Jolles, P.; Fiat, A. M. Casein peptide release and passage to

- the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie* **1998**, *80*, 155-165.
- (13) Restani, P.; Restelli, A. R.; Capuano, A.; Galli, C. L. Digestibility of technologically treated lamb meat evaluated by an in vitro multienzymatic method. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 989-993.
- (14) Hasan, F.; Kitagawa, M.; Kumada, Y.; Hashimoto, N.; Shiiba, M.; Katoh, S.; Terashima, M. Production kinetics of ACE inhibitory peptides from bonito meat in artificial gastric juices. *Process. Biochem.* **2006**, *41*, 505-511.
- (15) Arihara, K.; Nakashima, Y.; Mukai, T.; Ishikawa, S.; Itoh, M. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Sci.* **2001**, *57*, 319-324.
- (16) Kageyama, T. Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development. *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 288-306.
- (17) Folk, J. E.; Schirmer, E. W. Chymotrypsin C – I. Isolation of the zymogen and the active enzyme: preliminary structure and specificity studies. *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 181-192.
- (18) Gray, G. M.; Cooper, H. L. Protein digestion and absorption. *Gastroenterology* **1971**, *61*, 535-544.
- (19) Sosulski, F. W.; Imafidon, G. I. Amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors for animal and plant foods. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 1351-1356.
- (20) Hausch, F.; Shan, L.; Santiago, N. A.; Gray, G. M.; Khosla, C. Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2002**, *283*, G996-G1003.
- (21) Kaspari, A.; Diefenthal, T.; Grosche, G.; Schierhorn, A.; Demuth, H. U. Substrates containing phosphorylated residues adjacent to proline decrease the cleavage by proline-specific peptidases. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1293*, 147-153.
- (22) Vanhoof, G.; Goosens, F.; De Meester, I.; Hendriks, D.; Scharpé, S. Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J.* **1995**, *9*, 736-744.

---

**Publication n°4**

**Specific peptides are reproducibly released in digestive contents  
during digestion of cooked beef meat in pigs**

Caroline Bauchart <sup>a,b</sup>, Martine Morzel <sup>b</sup>, Christophe Chambon <sup>b</sup>,  
Philippe Patureau Mirand <sup>a</sup>, Christelle Reynès <sup>c</sup>, Caroline Buffière <sup>a</sup>, Didier Rémond <sup>a</sup>

<sup>a</sup> *UMR 1019 Unité de Nutrition Humaine, <sup>b</sup>Qualité des Produits Animaux,*

*Institut National de la Recherche Agronomique,*

*Centre de Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France.*

<sup>c</sup> *Laboratoire de Physique Moléculaire et Structurale, Faculté de Pharmacie,  
34060 Montpellier, France.*

***British Journal of Nutrition (soumis)***

---

**Specific peptides are reproducibly released in digestive contents  
during digestion of cooked beef meat in pigs**

Caroline Bauchart<sup>1,2</sup>, Martine Morzel<sup>2</sup>, Christophe Chambon<sup>2</sup>,  
Philippe Patureau Mirand<sup>1</sup>, Christelle Reynès<sup>3</sup>, Caroline Buffière<sup>1</sup>, Didier Rémond<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR 1019, Unité de Nutrition Humaine, Centre INRA de Clermont-Ferrand – Theix, F-63122 Theix, France.

<sup>2</sup> INRA, Unité Qualité des Produits Animaux, Centre INRA de Clermont-Ferrand – Theix, F-63122 Theix, France.

<sup>3</sup> Laboratoire de Physique Moléculaire et Structurale, Faculté de Pharmacie, F-34060 Montpellier, France.

\* Corresponding author. Tel.: +33(0)4-73-62-40-74; fax: +33(0)4-73-62-47-55; E-mail address: dremond@clermont.inra.fr.

*Running Title* : MEAT-DERIVED PEPTIDES IN INTESTINAL DIGESTA

*Keywords*: Peptides; meat; digestion; mass spectrometry; pigs

**Abstract**

Characterisation and identification of peptides (800 to 5000 Da) generated by intestinal digestion of cooked meat were performed using mass spectrometry analyses (MALDI-ToF and nano-LC-ESI-ion trap MS/MS). Four pigs fitted with cannula in duodenum and jejunum were used. They received a test meal exclusively made of cooked *Pectoralis profundus* beef meat. A protein-free meal was used to identify peptides of endogenous origin. Most of the peptides reproducibly detected in digesta were evidenced in the three first hours after the meal. In the duodenum, 11 meat-derived peptides, characteristic of pepsin digestion, were identified. In the jejunum, 6 were identified and were characteristic of chymotrypsin and trypsin digestions. All were short peptides (<2000 Da) particularly rich in proline residues. They were fragments of structural (actin, myosin) or sarcoplasmic (creatine kinase, GAPDH and myoglobin) muscle proteins. Among 17 identified peptides in digesta, 12 of them contained bioactive sequences with an antihypertensive activity. In conclusion, the present work showed that after meat ingestion,

among the wide range of peptides produced by enzymatic digestion, some of them can be reproducibly observed in intestinal digesta.

## Introduction

Scientific interest in food-derived peptides presenting a biological activity has grown considerably in the last decade. It introduces a completely new dimension to be considered in the description of dietary protein quality. Bioactive peptides have been defined as specific protein fragments that have, in addition to their nutritional value, a positive impact on body functions or conditions and may ultimately influence health (Kitts & Weiler, 2003). These beneficial health effects may be attributed to numerous known peptide sequences exhibiting for example antihypertensive, antithrombotic, opioid, immunomodulating, antimicrobial, and antioxidant activities (Kitts & Weiler, 2003; Korhonen & Pihlanto, 2003). Most dietary proteins contain bioactive sequences, but the corresponding peptides need to be released by proteolysis (food processing or fermentation process, gastrointestinal digestion) in order to show a biological activity.

Many bioactive peptides have been identified in milk products (Clare & Swaisgood, 2000; Rutherfurd-Markwick & Moughan, 2005) and, in comparison, little information is available for meat products. Among the potential activities of peptides derived from meat proteins, angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activity has been the most extensively studied (Arihara, 2006; Vercruyse *et al.* 2005). Such ACE inhibitory peptides have been identified after *in vitro* hydrolysis of animal muscle protein. For instance, two ACE inhibitory peptides were found in thermolysin digest of porcine skeletal muscle proteins (Arihara *et al.* 2001) and were later shown to have an *in vivo* antihypertensive activity when administered orally to spontaneously hypertensive rats (Nakashima *et al.* 2002). However, there is evidence to suggest that peptides produced by *in vitro* digests yield different peptides compared to those generated *in vivo*. For example,  $\beta$ -casomorphins fragments isolated from intestinal contents following ingestion of casein (Meisel, 1986) are larger fragments than those found in *in vitro* digests. To our knowledge, the occurrence of bioactive peptides in digesta after ingestion of meat has not been investigated.

We have shown that proteolytic degradation during storage and cooking can reproducibly generate small peptides in beef *Pectoralis profundus* meat (Bauchart *et al.* 2006). The present study aimed at characterising and identifying small peptides (<5 kDa) generated by intestinal digestion of such meat, using pigs as an animal model for human.

This was performed by means of mass spectrometry (MALDI-ToF and nano-LC-ESI-ion trap MS/MS analyses).

## Materials and methods

### *Animals*

The study involved four 3-month-old female pigs ( $40.5 \pm 5.2$  kg). Three weeks before the experimentation, pigs were surgically fitted with a T-shaped cannula (silicone rubber; 12 mm i.d., 17 mm o.d.) in the duodenum (10 cm downstream from the pylorus) and the mid-jejunum (about 4 m downstream from the pylorus), and a catheter (polyvinyl chloride; 1.1 mm i.d., 1.9 mm o.d.) in the cava vein. Surgical procedures and post-surgical care were conducted in accordance with national legislation on the care and use of laboratory animals. Pigs were housed in individually pens (1 x 1.5 m) in a ventilated room with controlled temperature (19 to 23 °C). They were given 800 g/d of a concentrate food (Porcyprima, SANDERS Centre Auvergne, Aigueperse, France) distributed in two equal portions at 8.00 and 16.00, and had free access to water.

### *Test meals*

A slab of *Pectoralis profundus* muscle was taken from 15-month-old Charolais young bulls 30 min after slaughter, and aged 14 days under vacuum at 4 °C. The meat was then cooked under vacuum for 90 min at 75 °C in a water bath and stored at -20 °C. Before use, meat was thawed at 4 °C for 16 h.

A protein-free food was made of 47% free amino acids (in proportion close to the amino acid composition of muscle), 23% wheat starch, 12% fat and 18% water. Each test meal provided 40 g of crude protein and was exclusively made of either cooked PP or the control food mixture. It was offered for 15 min and was always consumed entirely within that time.

### *Experimental procedures*

Both foods were tested on each animal. Test meals were separated by at least two days. Duodenum and jejunum digesta sampling were performed on two distinct test meals. The test meal was given at 9.00. Digesta were continuously collected from 8.00 to 15.00 in cold plastic bottles replaced each hour. Water intake was restricted to 250 mL/h. To prevent dehydration, 1 L of Ringer-lactate solution was intravenously infused at a rate of 150 mL/h throughout the sampling session.

Hourly collected digesta were immediately homogenised in a Waring Blender (twice 5 s at high speed, separated by 5 s). A first fraction of the homogenate (about 10 g) was used for dry matter determination (24 h at 104 °C). A second fraction (about 100 g) was treated with perchloric acid (PCA) at 170 mM (final concentration). After vigorous shaking, samples were kept on ice 15 min, and then centrifuged at 10,000g for 20 min at 4 °C. For the post-prandial period, fractions of supernatants (2% of hourly collected digesta) were pooled to yield two samples per animal: a first pool representative of the three first hours (**PP1**), and a second one representative of the three last hours (**PP2**). Post-absorptive (**PA**: sample collected before the meal), PP1 and PP2 supernatants were filtered through 5000 Da cut-off filters (Vivaspin 15, VIVASCIENCE, Hanover, Germany) at 2,000g for 8 to 15 h at 4 °C. Filtrates were stored at -80 °C until analysis.

#### *Analytical methods*

Chromatographic analysis of peptides in extracts was carried out using a HPLC System (Kontron Instruments). Separation was done in a NUCLEODUR<sup>®</sup> C18 Pyramid (110 Å; 4.6 x 250 mm) with 5 µm particles (MACHEREY-NAGEL) at 30 °C in a column oven and at a flow rate of 0.9 mL/min. The gradient was performed using two solvents (**A**: 0.1% trifluoroacetic acid or TFA in water, **B**: 0.1% TFA in 100% acetonitrile or ACN) and formed as follows: 0% B up to 5 min, 0-60% B in 5-35 min and 60-100% B in 35-38 min. Detection was done at 220 nm.

Carnosine concentration in extracts was determined by RP-HPLC using precolumn derivatisation with O-phthaldehyde reagent (Bauchart *et al.* 2006).

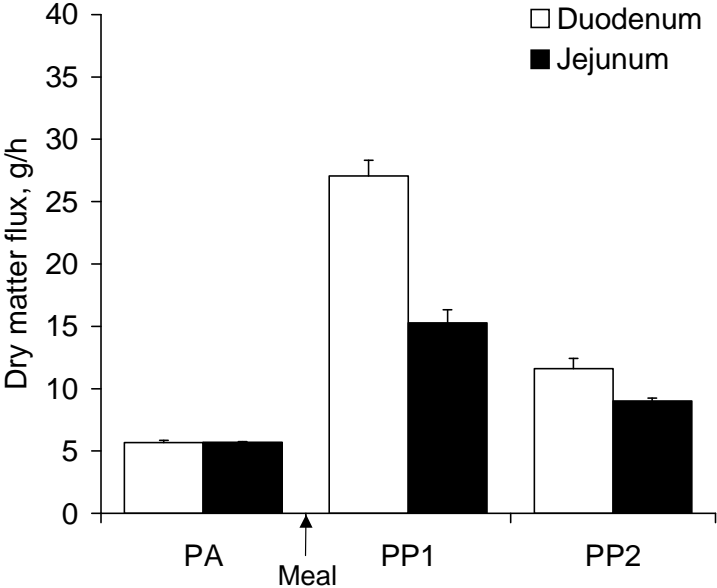
Matrix-assisted laser desorption ionisation (MALDI)-time-of-flight (ToF) analysis and nano-LC-ESI-ion trap MS/MS analysis were performed as previously described by Bauchart *et al.* (2006). For MALDI-ToF analysis, masses were recorded in the m/z range 800 to 5000. m/z below 800 may not be reliably monitored by MALDI-ToF because of interference by matrix-generated peaks.

#### *Statistical analyses*

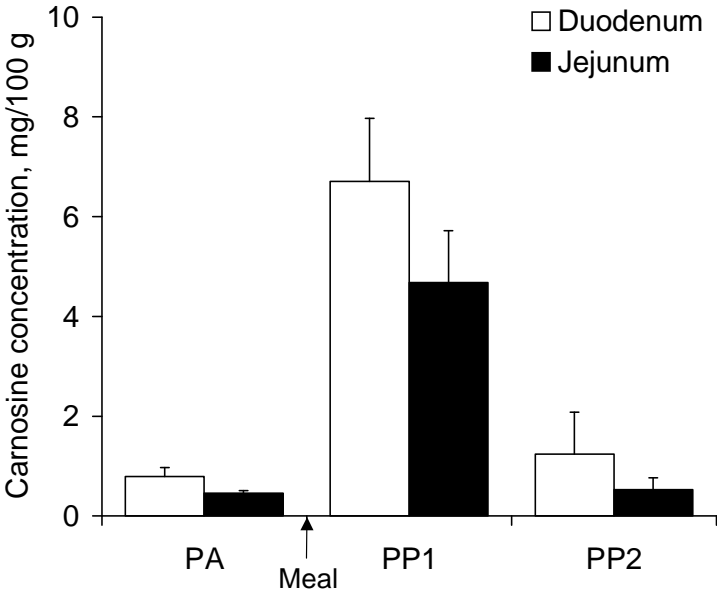
A statistical procedure was applied to MALDI-ToF data to determine whether peaks, at close m/z but originating from different spectra, were likely to correspond to the same compound (Bauchart *et al.* 2006). For one sampling time (PA, PP1, PP2), only the peaks gathered in a group consisting of data originating from at least 3 animals were



**Fig. 1.** Dry matter flux in duodenum and jejunum of pigs before (PA) and after ingestion of cooked *Pectoralis profundus*. PP1 = 0-3 h postfeeding; PP2 = 3-6 h postfeeding. Data are means (n = 4) ± SEM.



**Fig. 2.** Carnosine concentration in duodenum and jejunum of pigs before (PA) and after ingestion of cooked *Pectoralis profundus*. PP1 = 0-3 h postfeeding; PP2 = 3-6 h postfeeding. Data are means (n = 4) ± SEM.



considered. A similar procedure was subsequently applied to determine which groups of peaks corresponded to the same compound, across sampling times.

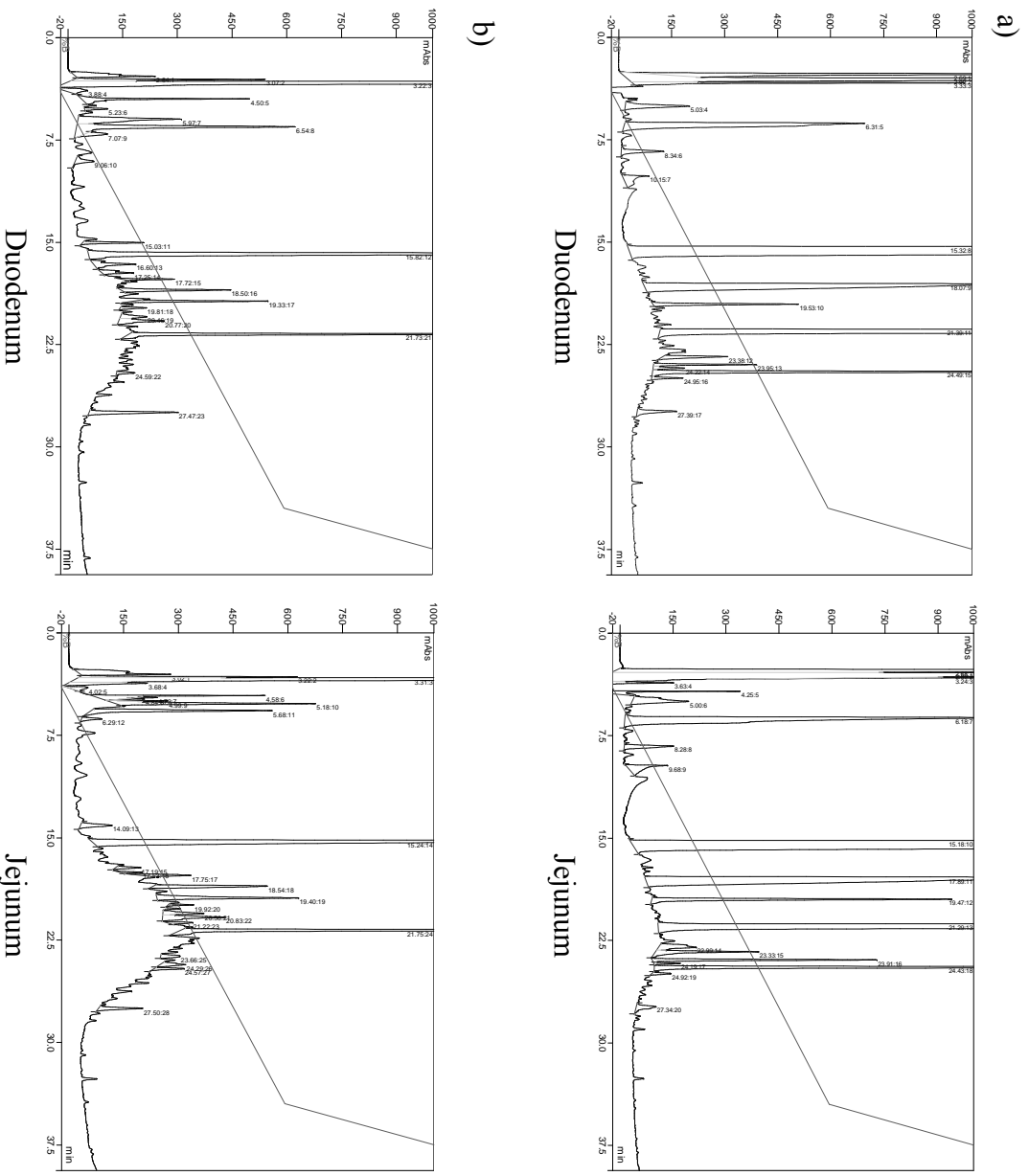
## Results

Kinetics of dry matter flux in pig intestine after cooked meat ingestion (Fig. 1) showed that about 70 and 60% of the total dry matter collected in the whole post-prandial period were collected in the three first hours after feeding (PP1), for duodenum and jejunum, respectively. Significant amounts of carnosine were detected in duodenum and jejunum digesta after meat meal. Carnosine concentration in digesta followed a pattern similar to DM flux (Fig. 2).

As illustrated in Figure 3a, with data obtained in one pig, the RP-HPLC analysis of digesta extracts collected after ingestion of the protein-free food revealed the presence of numerous endogenous peptides. Similar chromatographic profiles were observed for duodenum and jejunum, with characteristic peaks, such as peaks detected at about 5.0, 6.2, 8.3, 9.9, 15.3, 18.0, 19.5, 21.3, 23.4, 23.9, 24.2, 24.5, 24.9 and 27.4 min. After meat ingestion (Fig. 3b) these peaks remained present and intense, but it was also observed a global increase in absorbance at 220 nm across the retention times 15 to 25 min, indicative of a large amount of peptide bonds. This increase was more prominent for digesta collected in jejunum than for those collected in duodenum. Overall, this suggests that meat digestion released a wide of variety peptides (<5 kDa), each in rather small amounts.

Although peptides up to 5000 Da should be extracted by the procedure we used (PCA precipitation of proteins and ultrafiltration), MALDI-ToF analysis evidenced very few compounds between 2000 and 5000 m/z in the digesta (Fig 4). The number of detected compounds was greater in duodenum than in jejunum samples in PP1, but comparable in duodenum and jejunum samples in PP2. On average 40 and 65% of the compounds detected after cooked PP ingestion were already present after the protein-free meal for duodenum and jejunum, respectively. Masses of peptides detected by MALDI-ToF in at least 3 of the 4 pigs (later called “reproducibly” detected) in PP1 digesta extracts after ingestion meat are listed in Table 1. All endogenous compounds, i.e. detected in the intestinal contents of the post-absorptive period or after a protein-free control meal, were removed from the list in order to keep only peptides of an alimentary origin. Compounds reproducibly detected in PP1 were more numerous in duodenum than in jejunum (9 vs 5). Two compounds (m/z 1115.68 and 1198.71) were common to duodenum and jejunum digesta. Only one peptide (m/z 1018.50) was reproducibly detected by MALDI-ToF in

**Fig. 3.** RP-HPLC chromatograms of digesta extracts collected in one pig over the 3 first hours following ingestion of control protein-free food (a) and cooked *Pectoralis profundus* (b).



duodenum digesta and none in jejunum digesta, in the second 3-h period (PP2) after ingestion of meat.

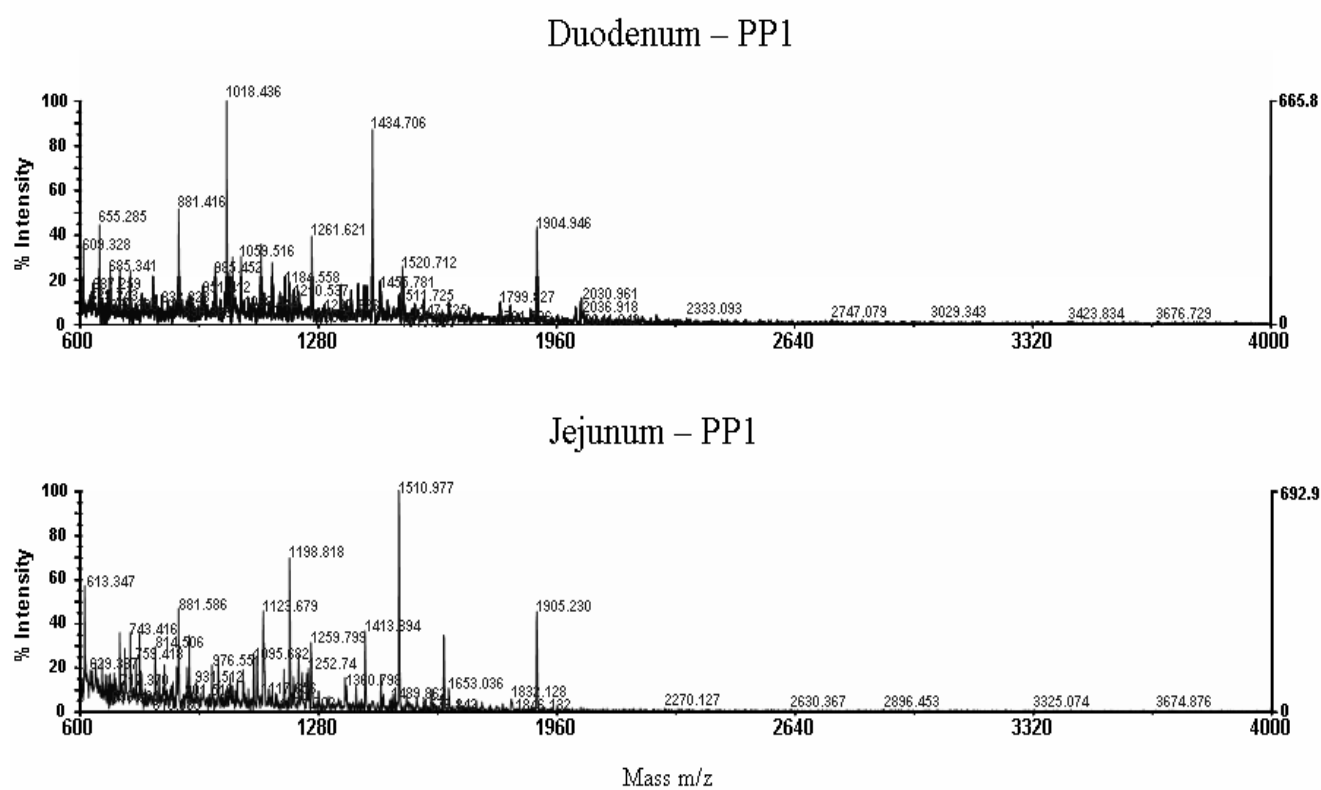
Meat-derived peptides reproducibly evidenced by nano-LC-ESI-ion trap MS/MS analysis in digesta extracts collected over PP1 are listed in Table 2. The identified peptides came from 5 proteins: actin, myosin (heavy polypeptide 4), creatine kinase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GA3PDH), and myoglobin. Overall, a particularity of the sequences was the high proportion of proline, accounting for approximately 13.1% (14/107) and 15.5% (9/58) of all residues in peptides identified at the duodenum and jejunum level, respectively. After the protein-free meal (data not shown) several fragments of pepsin A precursor, trypsin precursor, pancreatic  $\alpha$ -amylase precursor and salivary proline-rich protein were identified in duodenum digesta. The same fragments of trypsin precursor (f(87-95) IKLSSPATL and f(86-95) LIKLSSPATL) and proline-rich protein (f(424-437) ARPLPGPPPPGPPP) were evidenced in duodenum and jejunum digesta. Furthermore, the jejunum content was characterised by the presence of many more fragments of salivary basic proline-rich proteins.

A research of potential biological activity of identified peptides was carried out with the BioPep database (Dziuba *et al.* 1999) and by comparison with sequences either reviewed in Vercruyse *et al.* (2005) and Sentandreu & Toldrá (2006). No biological activity corresponded to the entire identified peptide sequences. However, some potential biological activity sequences were found within 12 of the identified peptide sequences (Table 3). They were mainly short sequences of 2 or 3 residues, except for the sequences IVGRPR, YALPHA and ALPHA, all contained in actin fragments. The most commonly found potential biological activity was an antihypertensive effect.

## Discussion

To our knowledge, this study is the first one intending to characterise and identify peptides that are reproducibly generated by *in vivo* gastroduodenal digestion of meat. The present study focused on peptides ranging from 800 to 5000 Da. The lower limit was dictated by technical consideration, the upper limit was chosen in relation to the generally reported size of bioactive peptides. MALDI-ToF analysis and nano-LC-ESI-ion trap MS/MS analysis were complementary approaches. The first one was essentially used to screen the peptide content of samples and the second one to reveal the identity of the peptides. Some peptides were only detected by one of the two mass spectrometry analyses. These discrepancies of detected compounds between these two mass spectrometry analysis

**Fig. 4.** Representative MALDI-ToF spectra of duodenum and jejunum digesta collected from one pig during the 3 first hours (PP1) after ingestion of cooked *Pectoralis profundus*.



**Table 1.** List of compounds detected by MALDI-ToF in pig duodenum and jejunum digesta, during the three first hours after ingestion of cooked *Pectoralis profundus*. Listed compounds has an alimentary origin and were found in at least three of the four animals.

Duodenum	Jejunum
1018.50	976.45
1035.34	1115.68
1115.62	1158.59
1148.61	1182.44
1184.66	1198.71
1198.71	
1261.70	
1434.17	
1520.77	

methods have already been observed (Person *et al.* 2003; Bauchart *et al.*, 2006, 2007) and can be attributed to the specific ionisation modes of the two techniques.

The kinetics of duodenal dry matter flux and duodenal carnosine concentration illustrates the rapidity of gastric emptying after the meat meal. Furthermore, only one peptide was reproducibly detected in digesta 3 to 6 h postfeeding. For these reasons, peptide identification was limited to samples collected in the three first hours following the meal. The use of a protein-free meal allowed to evaluate endogenous secretion contribution and thus to study specifically meat derived compounds.

No peptide previously identified in cooked *Pectoralis profundus* (Bauchart *et al.* 2006), except carnosine, was found in digesta, and only two peptides detected in duodenum digesta were still present in jejunum digesta. These observations clearly indicate that gastrointestinal digestion brought about great changes in dietary proteins and peptides leading to the generation of new peptides differing according to intestinal site. In the present study, most of identified peptides in duodenum digesta, resulting from gastric digestion, were characteristic of pepsin hydrolysis (Kageyama, 2002): out of 11 identified peptides, 9 possessed a Y, F, L, or D residue at their N-terminal end and 7 peptides possessed a M, F, or L residue at their C-terminal end. In the luminal phase of the small intestine, products of peptic degradation are further cleaved by the pancreatic proteases (trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase A and B) at more alkaline pH. In the present study, 2 peptides among 6 identified peptides in jejunum digesta possessed a leucine residue at the C-terminal end, characteristic of porcine chymotrypsin C hydrolysis (Folk & Schirmer, 1965), and 3 had an arginine residue at the C-terminal end, characteristic of trypsin hydrolysis (Gray & Cooper, 1971).

All compounds reproducibly detected in digesta by MALDI-ToF MS analysis were at m/z lower than 1520 Da, and more generally very few compounds derived from cooked *Pectoralis profundus* were found between 1520 and 5000 Da. This contrasts with the compounds evidenced in the same cooked meat (Bauchart *et al.* 2006), for which masses went up to 5000 Da. It suggests that dietary largest peptides (in contrast with carnosine) do not escape stomach degradation and that the first steps of protein intestinal digestion are fast enough to prevent accumulation of intermediary degradation products. The larger number of reproducibly generated peptides in duodenum digesta compared to jejunum digesta results most probably from a more homogenous digestion process in duodenum, brought about mainly by one enzyme. In jejunum, the chromatographic profiles suggest that more peptides are produced but with a higher composition diversity.

**Table 2.** List of peptides identified by nano-LC-ion trap MS/MS in duodenum and jejunum digesta extracts collected in pigs over the 3 first hours (PP1) following ingestion of cooked *Pectoralis profundus*. Listed peptides had an alimentary origin and were found in at least 3 of the 4 animals.

m/z (M+H <sup>+</sup> )	Sequence	Protein fragment	Accession number of the parent protein
<b>Duodenum</b>			
915.48	YALPHAIM	Actin alpha 1, skeletal muscle f(171-178)	gi 27819614
920.50	YKVLGFHG	Myoglobin f(147-154)	gi 73586735
1018.50	AGDDAPRAVF	Actin alpha 1, skeletal muscle f(24-33)	gi 27819614
1021.65	YFKIKPLL	Myosin, heavy polypeptide 4 f(326-333)	gi 76643989
1115.62	FRVPTPNVSV	GA3PDH f(231-240)	gi 77404273
1128.67	LFDKPVSPLL	Creatine kinase f(193-202)	gi 60097925
1148.61	LRVAPEEHPT	Actin alpha 1, skeletal muscle f(96-105)	gi 27819614
1184.66	YALPHAIMRL	Actin alpha 1, skeletal muscle f(171-180)	gi 27819614
1198.71	AVFPSIVGRPR	Actin alpha 1, skeletal muscle f(31-41)	gi 27819614
1251.62	DLAGRDLTDYL	Actin alpha 1, skeletal muscle f(181-191)	gi 27819614
1261.70	LRVAPEEHPTL	Actin alpha 1, skeletal muscle f(96-106)	gi 27819614
<b>Jejunum</b>			
902.50	FDKPV SPL	Creatine kinase f(194-201)	gi 60097925
976.45	AGFAGDDAPR	Actin alpha 1, skeletal muscle f(21-30)	gi 27819614
1015.58	LFDKPV SPL	Creatine kinase f(193-201)	gi 60097925
1115.62	FRVPTPNVSV	GA3PDH f(231-240)	gi 77404273
1127.67	VFPSIVGRPR	Actin alpha 1, skeletal muscle f(32-41)	gi 27819614
1198.71	AVFPSIVGRPR	Actin alpha 1, skeletal muscle f(31-41)	gi 27819614

Proline-containing peptides were reported to be generally resistant to degradation by digestive enzymes (Hausch *et al.* 2002; Kaspari *et al.* 1996; Vanhoof *et al.* 1995). Accordingly, most of the peptides identified in the present study, whether of an endogenous or dietary origin, were particularly rich in proline residues. Furthermore, 3 peptides of endogenous origin e.g. trypsin precursor f(87-95) IKLSSPATL, f(86-95) LIKLSSPATL, and proline-rich protein f(424-437) ARPLPGPPPPGPPP, and 2 peptides of dietary origin e.g. GA3PDH f(231-240) FRVPTPNVSV and actin alpha 1 f(181-191) AVFPSIVGRPR, evidenced at the duodenum were still present at the jejunum.

All meat-derived identified peptides came from structural (actin, myosin) or sarcoplasmic (creatine kinase, GA3PDH and myoglobin) muscle proteins, in agreement with our recent study on characterisation of peptide generated by cooked trout flesh digestion (Bauchart *et al.* 2007). Moreover, there is some similarity between the peptides identified in digesta after ingestion of cooked trout flesh or cooked bovine *Pectoralis profundus*: 5/11 and 4/6 peptides identified in the present study in duodenum and jejunum digesta, respectively, had been previously detected in digesta after ingestion of cooked trout flesh. In duodenum digesta, peptides common to the two types of muscle-foods were fragments of actin alpha 1 f(96-106) and f(171-178), myosin heavy polypeptide 4 f(326-333), GA3PDH f(231-240) and creatine kinase f(193-202). In jejunum digesta, they were 2 fragments of actin alpha 1 f(21-30, 31-41), fragments of GA3PDH f(231-240) and of creatine kinase f(193-201). This suggests that, whatever the origin of the animal muscle is, protein digestion occurs with some similarities in terms of peptides release.

Most of bioactive sequences found within detected peptides in digesta corresponded to antihypertensive activity. In thermolysin digest of porcine skeletal muscle, Arihara *et al.* (2001) evidenced two myosin heavy chain fragments named myopentapeptides A and B (MNPPK and ITTNP) with ACE inhibitory activity. Katayama *et al.* (2003) isolated an ACE inhibitory peptide (RMLGQTPTK) from porcine troponin C hydrolysed with pepsin. Antihypertensive peptides were also identified in thermolysin hydrolysate of chicken muscle proteins (Fujita *et al.* 2000). More recently, Jang & Lee (2005) purified an ACE inhibitory peptide (VLAQYK) from the hydrolysate of sarcoplasmic protein extracts from beef rump by using the combination of thermolysin and proteinases A. None of these fragments were identified in the digesta in the present study. Nevertheless, out of 15 identified peptides, 11 contained sequences with potential bioactivity. These sequences might be released by peptidases associated to the brush border membrane of the enterocytes or to intracellular peptidases (Vermeirssen *et al.* 2004). Then to exert their



**Table 3.** Sequences, contained within peptides identified in digesta, which were reported to have a positive impact on body functions.

Protein fragment sequence	Bioactive sequence <sup>*</sup>	Biological activity
<b>Actin alpha 1, skeletal muscle</b>		
f(21-30) AGFAGDDAPR	PR <sup>a</sup>	Antihypertensive
f(31-41) AVFPSIVGRPR	IVGRPR <sup>c</sup>	Antihypertensive
f(32-41) VFPSIVGRPR	GRP <sup>a, c</sup>	
	VF <sup>a, c</sup>	
	FP <sup>a</sup>	
	PR <sup>a</sup>	
	RP <sup>b</sup>	
f(96-106) LRVAPEEHPTL	VAP <sup>a</sup>	Antihypertensive
f(96-105) LRVAPEEHPT		
f(181-191) DLAGRDLTDYL	YL <sup>a, c</sup>	Antihypertensive Opioid
f(171-180) YALPHAIMRL	YALPHA <sup>a, c</sup>	Antihypertensive
	ALPHA <sup>a, c</sup>	
	RL <sup>a</sup>	
f(171-178) YALPHAIM	YALPHA <sup>a, c</sup>	Antihypertensive
	ALPHA <sup>a, c</sup>	
<b>Creatine kinase</b>		
f(193-202) LFDKPVSPLL	VSP <sup>a</sup>	Antihypertensive
f(193-201) LFDKPVSP	LF <sup>a, c</sup>	
f(194-201) FDKPVSP	VSP <sup>a</sup>	Antihypertensive
<b>Myosin, heavy polypeptide 4</b>		
f(326-333) YFKIKPLL	IKP <sup>a, c</sup>	Antihypertensive

<sup>\*</sup> References: <sup>a</sup> BioPep database (Dziuba *et al.* 1999), <sup>b</sup> Sentandreu & Toldrá (2006), <sup>c</sup> Vercruyssen *et al.* (2005).

biological activity, ACE inhibitory peptides have to reach the blood stream. The possibility of absorption into circulatory blood system of antihypertensive dipeptide has been demonstrated in human (Matsui *et al.* 2002), and in spontaneously hypertensive rats, antihypertensive activity of peptides derived from porcine skeletal muscle myosin was observed after oral administration (Nakashima *et al.* 2002).

In conclusion, the present work showed that after meat ingestion, among the wide range of peptides produced by enzymatic digestion, some of them can be reproducibly observed in intestinal digesta. In a first step, we focused on peptide above 800 Da. Once technical difficulties inherent to identification of peptides below 800 Da are solved, a better description of the composition of the peptide fraction will be possible. Nevertheless, it must be kept in mind that, although some peptides were shown to have a local action in the intestine, biological activity of peptides are generally peripheral, thereby implying peptide absorption. Such absorption has been occasionally proven for particular peptides but this area definitely deserves further studies.

## References

- Arihara K (2006b) Functional properties of bioactive peptides derived from meat proteins. In *Advanced Technologies for Meat Processing*, pp. 245-273 [LML Nollet and F Toldrá, editors]. CRC Taylor & Francis Group.
- Arihara K, Nakashima Y, Mukai T, Ishikawa S & Itoh M (2001) Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Sci* **57**, 319-324.
- Bauchart C, Rémond D, Chambon C, Patureau Mirand P, Savary-Auzeloux I, Reynès C & Morzel M (2006) Small peptides (<5 kDa) found in ready-to-eat beef meat. *Meat Sci* **74**, 658-666.
- Bauchart C, Rémond D, Chambon C, Patureau Mirand P, Reynès C, Buffière C & Morzel M (2007) Peptides containing bioactive sequences released during digestion of cooked trout flesh in pigs. *J Agr Food Chem*, Submitted.
- Clare DA & Swaisgood HE (2000) Bioactive milk peptides: a prospectus. *J Dairy Sci* **83**, 1187-1195.
- Dziuba J, Minkiewicz P, Nalecz D & Iwaniak A (1999) Database of biologically active peptide sequences. *Nahrung-Food* **43**, 190-195.

- Folk JE & Schirmer EW (1965) Chymotrypsin C – I. Isolation of the zymogen and the active enzyme: preliminary structure and specificity studies. *J Biol Chem* **240**, 181-192.
- Fujita H, Yokowama K & Yoshikawa M (2000) Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *J Food Sci* **65**, 564-569.
- Gray GM & Cooper HL (1971) Protein digestion and absorption. *Gastroenterology* **61**, 535-544.
- Hausch F, Shan L, Santiago NA, Gray GM & Khosla C (2002) Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol* **283**, G996-G1003.
- Jang A & Lee M (2005) Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates. *Meat Sci* **69**, 653-661.
- Kageyama T (2002) Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development. *Cell Mol Life Sci* **59**, 288-306.
- Kaspari A, Diefenthal T, Grosche G, Schierhorn A & Demuth HU (1996) Substrates containing phosphorylated residues adjacent to proline decrease the cleavage by proline-specific peptidases. *Biochem Biophys Acta* **1293**, 147-153.
- Katayama K, Tomatsu M, Fuchu H, Sugiyama M, Kawahara S, Yamaguchi K, Kawamura Y & Muguruma M (2003) Purification and characterization of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from porcine troponin C. *Anim Sci J* **74**, 53-58.
- Kitts DD & Weiler K (2003) Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr Pharm Des* **9**, 1309-1323.
- Korhonen H & Pihlanto A (2003) Food-derived bioactive peptides - Opportunities for designing future foods. *Curr Pharm Des* **9**, 1297-1308.
- Matsui T, Tamaya K, Seki E, Osajima K, Matsumoto K & Kawasaki T (2002) Val-Tyr as a natural antihypertensive dipeptide can be absorbed into the human circulatory blood system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **29**, 204-208.
- Meisel H (1986). Chemical characterization and opioid activity of an exorphin isolated from in vivo digests of casein. *FEBS Lett* **196**, 223-227.
- Nakashima Y, Arihara K, Sasaki A, Mio H, Ishikawa S & Itoh M (2002) Antihypertensive activities of peptides derived from porcine skeletal muscle myosin in spontaneously hypertensive rats. *J Food Sci* **67**, 434-437.

- Person MD, Lo HH, Towndrow KM, Jia Z, Monks TJ & Lau SS (2003) Comparative identification of prostanoid inducible proteins by LC-ESI-MS/MS and MALDI-TOF mass spectrometry. *Chem Res in Toxicol* **16**, 757-767.
- Rutherford-Markwick KJ & Moughan PJ (2005) Bioactive peptides derived from food. *J AOAC Int* **88**, 955-966.
- Sentandreu MA & Toldrá F (2006) Evaluation of ACE inhibitory activity of dipeptides generated by the action of porcine muscle dipeptidyl peptidases. *Food Chem In Press*.
- Vanhoof G, Goosens F, De Meester I, Hendriks D & Scharpé S (1995) Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J* **9**, 736-744.
- Vercruyse L, Van Camp J & Smagghe G (2005) ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: a review. *J Agr Food Chem* **53**, 8106-8115.
- Vermeirssen V, Van Camp J & Verstraete W (2004) Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Br J Nutr* **92**, 357-366.

## Discussion générale

L'étude des flux de matière sèche des contenus digestifs de porc collectés pendant 6 h après l'ingestion de chair de truite cuite ou de viandes bovines a révélé une vidange gastrique rapide. En effet, la majeure partie du flux jéjunal des digesta est recueillie dans les 3 h qui suivent le repas. De plus, la plupart des peptides mis en évidence par spectrométrie de masse MALDI-ToF ont été détectés pendant ces 3 heures et très peu dans les 3 heures suivantes. C'est pourquoi nous nous sommes plus particulièrement intéressés à identifier les peptides alimentaires (< 5 kDa) dans les digesta collectés dans les 3 premières heures après le repas. Outre sa rapidité, l'efficacité de la digestion des peptides alimentaires doit être remarquée. En effet, aucun peptide précédemment détecté dans la chair de truite cuite et dans la viande bovine (pectoral profond) cuite (*cf publications n°1 et 2*) n'a été mis en évidence dans les digesta après l'ingestion de ces mêmes aliments indiquant qu'ils sont dégradés et/ou absorbés. De plus, alors que les peptides mis en évidence dans les aliments cuits (chair de truite et viande bovine de pectoral profond) avaient une masse allant jusqu'à 5 kDa, ceux détectés dans les digesta avaient une masse inférieure à 2 kDa. Enfin, les peptides détectés différaient aussi selon le site intestinal de prélèvement. Ainsi, parmi les 138 peptides différents d'origine alimentaire identifiés, quelle que soit leur fréquence, 31 seulement étaient repérés au niveau du duodénum et aussi du jéjunum. Ces peptides "stables", apparemment plus résistants, provenaient des mêmes protéines que l'ensemble des peptides identifiés (46 vs 48% sous forme d'actine et 21 vs 24% sous forme de myosine). Plus généralement, les fragments peptidiques identifiés sont issus de protéines majoritaires du muscle (actine, myosine et enzymes du métabolisme énergétique). L'abondance relative de certaines protéines du muscle ingéré peut expliquer l'identification de peptides spécifiques dans les digesta, par exemple un fragment de parvalbumine après ingestion de truite ou des fragments de myoglobine après ingestion de viandes. Il apparaît donc que la détection et l'identification des peptides est efficace en ce qui concerne les plus représentés quantitativement dans les digesta. Il est toutefois possible que de très nombreux autres peptides soient générés, y compris de façon reproductible.

Une autre limite à ces observations sur les peptides issus des protéines alimentaires est que seuls les peptides ayant une masse supérieure à 800 Da ont pu être identifiés pour le moment en raison de la méthodologie disponible. Il est donc possible que l'identification de peptides d'une taille inférieure conduise à des conclusions différentes.

Les peptides d'origine alimentaire identifiés par nano-HPLC-ESI-IT MS/MS de manière reproductible dans les contenus digestifs de porc collectés au cours des 3 premières heures après l'ingestion de chair de truite et de viandes bovines cuites (pectoral profond, faux-filet et paleron) ne représentaient que 20% des peptides identifiés. Ils étaient principalement issus de protéines structurales (actine et myosine) et sarcoplasmiques (créatine kinase, GA3PDH et fructose-1,6-bisphosphate aldolase) du muscle, ce qui est en accord avec la génération de peptides issus de myosine (chaîne lourde) de porc (Arihara et al., 2001) et de GA3PDH de thon (Hasan et al., 2006) suite à une hydrolyse *in vitro* par des enzymes digestives. Il faut noter que dans les viandes bovines, la contribution de la myosine à cette production de peptides identifiés de façon reproductible (comprise entre 0 et 6% selon les viandes) était nettement plus faible que celle de l'actine (entre 43 et 61 %) alors qu'avec la truite, elle était de 22% pour la myosine et de 44% pour l'actine. La présence beaucoup plus aléatoire des peptides issus de la myosine des viandes bovines suggère qu'ils sont plus sensibles aux phénomènes digestifs que ceux issus de l'actine. Compte tenu du protocole, il n'est pas possible de savoir si les différences avec la truite sont inhérentes à l'espèce ou à la conservation et la cuisson. Par ailleurs, les séquences peptidiques identifiées de façon reproductible étaient plus riches en résidus proline (environ 15% des résidus) que l'ensemble des séquences identifiées où ils ne représentaient que 8,6% des résidus. Or, il a été rapporté que les peptides contenant de la proline sont généralement plus résistants à l'hydrolyse digestive (Vanhoof et al., 1995 ; Kaspari et al., 1996 ; Hausch et al., 2002). Ainsi, on peut alors en conclure que la plupart des peptides mis en évidence dans les digesta de façon reproductible étaient parmi les plus résistants.

Par ailleurs, il est particulièrement intéressant de noter que 9 séquences peptidiques sur 18 identifiées de manière reproductible dans les digesta après l'ingestion de chair de truite cuite étaient exactement les mêmes que celles issues de viandes bovines cuites. Il s'agissait de fragments d'actine (96-106, 171-178, 31-41, 21-30), de créatine kinase (195-204, 195-203), de GA3PDH (232-241) et de chaîne lourde de myosine (835-842) (**Tableau 19**). Cette observation est surprenante et tout à fait inattendue compte tenu des matrices différentes que représentent la chair de truite et de la viande bovine. Ainsi, on peut alors en déduire que certains peptides sont générés de façon constante au cours de l'hydrolyse digestive, quels que soient le muscle originel et sa préparation. Seuls deux peptides issus de la myosine (NSYEEALDHL, m/z 1190,533 ; FKVLDPDATGF m/z 1209,616) et un peptide issu de la GA3PDH (TVRLEKPASY, m/z 1163,643) ont été

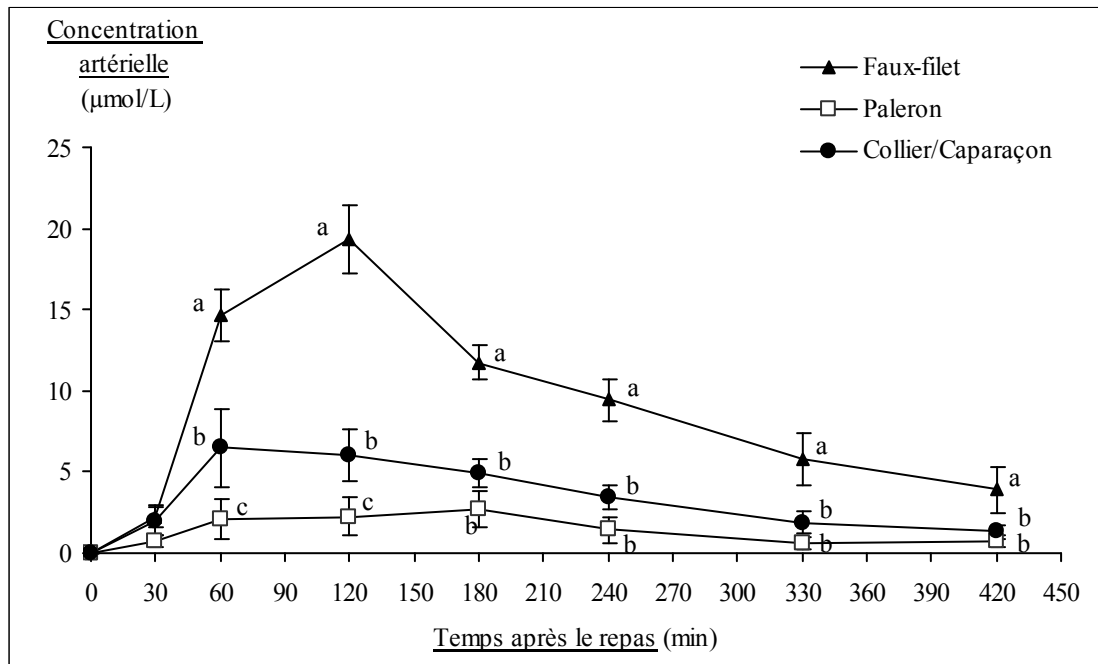
trouvés de façon reproductible dans les contenus digestifs après ingestion de truite, alors qu'ils étaient absents avec les autres aliments quel que soit le niveau de reproductibilité (**Annexe 2**).

Les séquences bioactives trouvées à l'intérieur des peptides identifiés de manière reproductible dans les digesta correspondent principalement à une activité antihypertensive (inhibiteur de l'ACE). Cet effet antihypertensif est une des activités les plus étudiées dans les aliments riches en protéines en raison de son impact physiologique important pour l'homme (Vercruyse et al., 2005 ; Arihara, 2006). De nombreux peptides à activité antihypertensive ont été identifiés *in vitro* dans des hydrolysats de protéines musculaires. Par exemple, deux peptides inhibiteurs de l'ACE, appelés myopentapeptides A et B (MNPPK et ITNP) ont été mis en évidence dans une séquence de chaîne lourde de myosine à partir d'hydrolysats de protéines de muscle de porc digérées par de la thermolysine (Arihara et al., 2001). D'autres peptides à activité antihypertensive ont été isolés à partir de la troponine C de porc hydrolysée avec de la pepsine (Katayama et al., 2003), de protéines de muscle de poulet hydrolysées par de la thermolysine (Fujita et al., 2000), et plus récemment, de protéines sarcoplasmiques de viande de bœuf digérées par de la thermolysine et de la protéinase A.

Bien que certains peptides puissent avoir un effet local au niveau de l'intestin, la plupart des peptides bioactifs ont une action périphérique et doivent être absorbés intacts pour exercer leur effet physiologique. L'absorption intestinale constitue une des étapes les plus importantes dans l'activité biologique de certains peptides. Le passage des peptides à travers l'entérocyte peut générer de nouvelles séquences peptidiques par l'action des peptidases intracellulaires. On peut alors supposer que certaines séquences bioactives présentes à l'intérieur des peptides identifiés dans les digesta seront libérées dans la circulation sanguine.

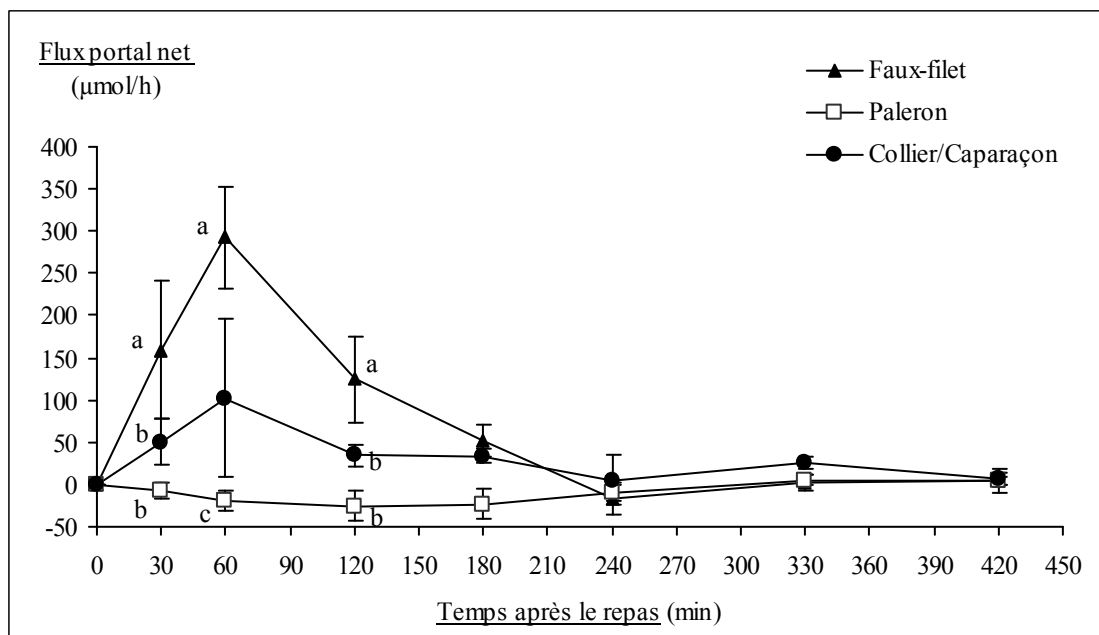
Ainsi, l'étape suivante de ce travail a été de caractériser les peptides d'origine alimentaire (viande bovine) dans le sang de la veine porte chez le porc.

**Figure 43** : Variation post-prandiale de la concentration artérielle en carnosine dans le plasma de porcs (n = 4) après l'ingestion de faux-filet grillé, de paleron braisé ou du mélange collier /caparaçon grillé.



Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM. Pour chaque temps, les valeurs moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

**Figure 44** : Variation post-prandiale du flux portal net de la carnosine chez des porcs (n = 4) après l'ingestion de faux-filet grillé, de paleron braisé ou du mélange collier/caparaçon grillé.



Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM. Pour chaque temps, les valeurs moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).



## **IV. ETUDE DE L'ABSORPTION DES PEPTIDES**

### **Introduction**

Après avoir étudié la fraction peptidique des contenus digestifs de l'intestin grêle, suite à l'ingestion de différentes viandes bovines, l'objectif de cette troisième partie de la thèse était d'explorer la fraction peptidique du plasma afin de mettre en évidence une éventuelle absorption intestinale. Pour cela, nous avons utilisé le mini-porc comme animal modèle. L'approche expérimentale devait permettre à la fois de caractériser la fraction peptidique dans sa totalité et de quantifier l'absorption de la carnosine dont nous avons montré l'abondance dans les contenus digestifs après ingestion de viande. Pour cela, les animaux étaient équipés de cathéters permanents dans la veine porte et l'aorte abdominale, ainsi que d'une sonde débitmétrique sur la veine porte. Le faux-filet grillé et le paleron braisé, précédemment étudiés, ont été utilisés comme repas tests. En ce qui concerne l'absorption de la carnosine, un troisième aliment de teneur en carnosine intermédiaire a été testé : un mélange de collier et de caparaçon, viandes utilisées dans la réalisation du steak haché. La quantité d'aliment distribuée était calculée de façon à apporter la même quantité de protéine quel que soit l'aliment.

Les travaux de Gardner et al. (1991) ont montré qu'une partie de la carnosine administrée par voie orale pouvait traverser intacte la barrière intestinale et apparaître dans le compartiment sanguin. De plus, une augmentation de la concentration en carnosine dans du plasma humain a été observée suite après consommation de viande de bœuf (Park et al., 2005). Ces derniers résultats suggèrent que dans des conditions normales d'alimentation, une part de la carnosine contenue dans les produits carnés peut résister aux peptidases digestives et entérocytaires et apparaître dans le compartiment sanguin. Cependant, aucune étude ne permet d'estimer la quantité de carnosine réellement absorbée. Notre objectif était donc de quantifier la libération de carnosine alimentaire dans la veine porte après l'ingestion de 3 viandes bovines de teneurs en carnosine différentes (*cf publication n°5*).

Nous avons également cherché à caractériser les peptides d'origine alimentaire apparaissant dans la veine porte après ingestion de faux-filet et de paleron. Dans la littérature, les peptides pour lesquels une absorption intestinale a pu être mise en évidence sont en général de faible poids moléculaire. Le spectromètre de masse MALDI-ToF que nous avons utilisé jusque-là n'étant pas adapté à l'étude des peptides d'une taille < 800 Da,

**Tableau 23** : Paramètres de cinétique de la concentration artérielle ( $[Carn_{art}]$ ) et du flux net portal ( $PNF_{carn}$ ) de carnosine déterminés après l'ingestion par des porcs ( $n = 4$ ) de différentes viandes bovines cuites (faux-filet, paleron, mélange collier/caparaçon) pendant 7 h de période post-prandiale.

	Faux-filet	Paleron	Collier/Caparaçon
<b><math>[Carn_{art}]</math>, <math>\mu\text{mol/L}</math></b>			
Augmentation maximale	19,6 $\pm$ 2,0 <sup>a</sup>	3,2 $\pm$ 1,3 <sup>c</sup>	7,6 $\pm$ 2,0 <sup>b</sup>
Augmentation moyenne	9,4 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	1,4 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	3,6 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>
<b><math>PNF_{carn}</math></b>			
Augmentation maximale, $\mu\text{mol/h}$	334 $\pm$ 59 <sup>a</sup>	21 $\pm$ 7 <sup>b</sup>	157 $\pm$ 75 <sup>a, b</sup>
Flux total, $\mu\text{mol/7 h}$	499 $\pm$ 78 <sup>a</sup>	8 $\pm$ 25 <sup>c</sup>	332 $\pm$ 66 <sup>a</sup>

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM. Les moyennes d'une même ligne ayant une lettre différente sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

**Tableau 24** : Liste des masses ( $m/z$ ) des peptides alimentaires détectés par HPLC-ESI-Q-ToF dans les contenus intestinaux (duodénum et jéjunum) et dans le plasma de la veine porte de porcs collectés après l'ingestion de viande bovine (faux-filet grillé ou paleron braisé) pendant toute la période post-prandiale (6 h et 7 h, respectivement). Les masses listées ont été trouvées dans au moins 3 animaux sur 4 dans les digesta.

Aliment	$m/z$ ( $M+H^+$ )	Occurrences	
		Digesta	Plasma
<b>Faux-filet</b>	315,169	3/4	1/4
	391,207	3/4	2/4
	415,248	3/4	2/4
	446,255	3/4	3/4
	517,314	3/4	3/4
	568,313	3/4	2/4
	624,329	3/4	1/4
<b>Paleron</b>	263,137	3/4	1/4

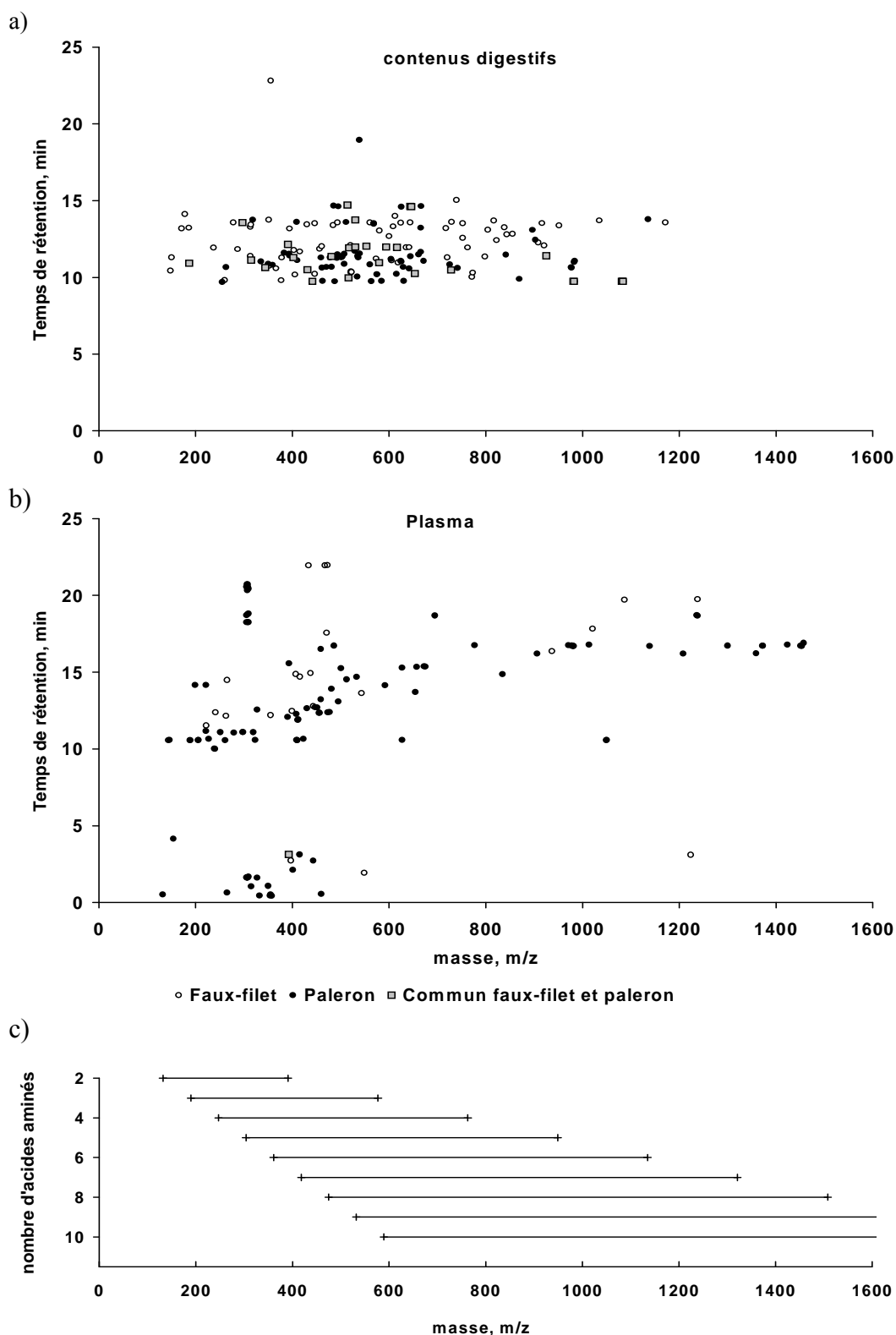
nous avons utilisé une autre technique de spectrométrie de masse, l'HPLC-ESI-Q-ToF, adaptée à la détection de peptides de masse inférieure 1500 Da (*cf paragraphe 3.4.*). Les échantillons de contenus digestifs collectés au niveau du duodénum et du jéjunum dans l'expérience précédente (*cf partie III. de l'étude expérimentale*) ainsi que les plasmas préparés avec le sang de la veine porte au cours de l'expérience présente, après ingestion de faux-filet et de paleron, ont été analysés par cette technique. L'ensemble des données de masse obtenues à partir des digesta et des plasmas a été ensuite traité par le logiciel Markerlynx. Pour les digesta, les masses détectées dans les échantillons prélevés avant le repas et après ingestion de l'aliment sans protéines ont été considérées comme des masses associées à des composés endogènes et donc retirées des listes de masses attribuables à des composés provenant de la viande. Pour les échantillons plasmatiques, les masses présentes avant le repas ont été retirées. Comme lors des études précédentes (*cf publications n°3 et 4*), nous avons concentré notre attention sur les peptides observés de façon répétable, i.e. présents dans les échantillons d'au moins 3 animaux.

### **Principaux résultats**

Les concentrations en carnosine du faux-filet grillé, du paleron braisé, du mélange collier et caparaçon grillé étaient de 468,4, 162,2, 280,0 mg/100 g de viande, respectivement. En période post-prandiale, la concentration artérielle de la carnosine n'était pas significativement modifiée par l'ingestion de paleron tandis qu'elle augmentait fortement entre 30 et 60 min après l'ingestion de faux-filet et du mélange collier/caparaçon (**Figure 43**). En accord avec ces résultats, le flux net de carnosine dans la veine porte restait nul avec le paleron alors qu'il augmentait significativement après l'ingestion de faux-filet et du mélange collier/caparaçon, avec un maximum atteint 1 h après le repas (**Figure 44**). C'est après l'ingestion de faux-filet que l'augmentation de la concentration artérielle en carnosine et du flux portal net de carnosine était la plus importante (**Tableau 23**). Pour ces deux viandes, l'apparition nette de carnosine dans la veine porte représentait 22% de la carnosine contenue dans la viande ingérée.

L'analyse par HPLC-ESI-Q-ToF des contenus digestifs prélevés dans le duodénum et le jéjunum a permis de révéler la présence répétable (3 animaux sur 4) d'un grand nombre de composés d'origine alimentaire de rapport m/z inférieur à 1200 (**Figure 45**). Le nombre de ces composés n'était pas différent après ingestion de faux-filet ou de paleron.

**Figure 45** : Profil de masse des composés détectés par HPLC-ESI-Q-ToF dans les contenus digestifs (a) et le plasma (b) après ingestion de faux-filet et de paleron. Ces composés étaient présents dans au moins 3 des 4 animaux utilisés dans chacune des expériences. Gamme de poids moléculaire théorique des peptides en fonction de leur nombre d'acides aminés (c).

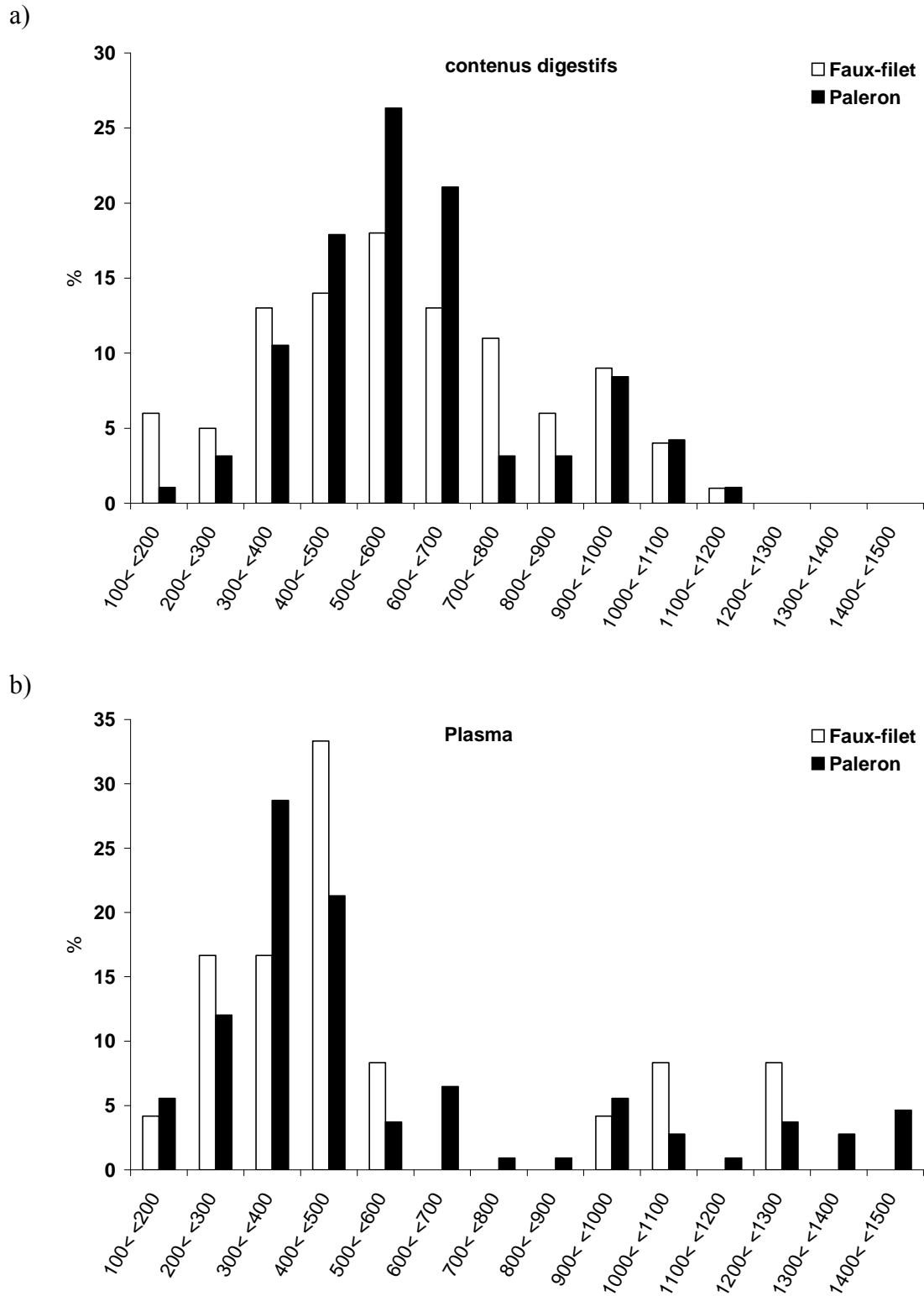


Parmi eux, 29 étaient présents à la fois dans les digesta de faux-filet et de paleron. Quelle que soit la viande ingérée, environ 70% des composés détectés avaient un rapport m/z compris entre 300 et 700 (**Figure 46**).

Pour le plasma, le nombre de composés mis en évidence de façon répétable avec le paleron était supérieur à celui obtenu avec le faux-filet (108 vs 24) (**Figure 45**). En l'absence de mesures effectuées avec un aliment sans protéines et bien que nous ayons soustrait les composés plasmatiques détectés avant le repas, nous ne pouvons donc pas exclure que parmi ces composés certains soient d'origine endogène. Cependant, on peut noter qu'un seul composé était commun aux 2 viandes testées, ce qui laisse supposer que les profils obtenus avec chacun des aliments étaient en grande partie expliqués par des composés d'origine alimentaire. La distribution par classe de masse des composés observés dans le plasma était sensiblement différente de celle observée dans les contenus digestifs, avec une plus forte représentation des composés dont le rapport m/z est compris entre 200 et 500. Cette classe de masse correspond plus spécifiquement aux di- et tripeptides (**Figure 45**).

L'analyse conjointe des données de spectrométrie de masse par HPLC-ESI-Q-ToF des contenus intestinaux et des plasmas collectés après ingestion de faux-filet et de paleron a révélé la présence dans le plasma de quelques composés d'origine alimentaire observés de façon répétable dans les contenus digestifs (**Tableau 24**).

**Figure 46** : Distribution par classe de poids moléculaire des composés détectés par HPLC-ESI-Q-ToF dans les contenus digestifs (a) et le plasma (b) après ingestion de faux-filet et de paleron. Ces composés étaient présents dans au moins 3 des 4 animaux pour chacune des expériences.



---

Publication n°5

**Carnosine concentration of ingested meat affects carnosine net release  
into the portal vein of minipigs**

Caroline Bauchart <sup>a, b</sup>, Isabelle Savary-Auzeloux <sup>c</sup>, Philippe Patureau Mirand <sup>b</sup>,  
Emilie Thomas <sup>d</sup>, Martine Morzel <sup>a</sup>, Didier Rémond <sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Qualité des Produits Animaux*, <sup>b</sup> *UMR 1019 Unité de Nutrition Humaine*,

<sup>c</sup> *Unité de Recherches sur les Herbivores*,

*Institut National de la Recherche Agronomique*,

*Centre de Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France.*

<sup>d</sup> *ADIV, 2 rue Chappe, 63039 Clermont-Ferrand, France.*

***Journal of Nutrition*** (sous presse)

---

**Carnosine concentration of ingested meat affects carnosine net release  
into the portal vein of minipigs<sup>1,2</sup>**

Caroline Bauchart,<sup>\*</sup> Isabelle Savary-Auzeloux,<sup>\*\*</sup>  
Philippe Patureau Mirand,<sup>\*</sup> Emilie Thomas,<sup>†</sup> Martine Morzel,<sup>\*\*\*</sup> and Didier Rémond<sup>\*3</sup>

INRA, <sup>\*</sup> UMR1019 Unité de Nutrition Humaine, <sup>\*\*</sup> Unité de Recherches sur les Herbivores, <sup>\*\*\*</sup> Qualité des Produits Animaux, Centre de Clermont-Ferrand – Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France, and <sup>†</sup>ADIV, 2 rue Chappe, 63039 Clermont-Ferrand, France.

Word count: 4627; Tables: 1; Figures: 2.

Running title: PORTAL NET RELEASE OF DIETARY CARNOSINE

<sup>1</sup> Partly presented as a poster at ICoMST, August 2006, Dublin, Ireland [Bauchart C, Savary-Auzeloux I, Cossoul C, Buffière C, Patureau Mirand P, Thomas E, Morzel M, Rémond D. 2006. Bioavailability of carnosine from beef meat in minipigs (abstract). In: Proceedings of the 52<sup>nd</sup> International Congress of Meat Science and Technology (Troy D, Pearce R, Byrne B, Kerry J, Eds.) pp. 711-712, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands].

<sup>2</sup> Supported by OFIVAL (Office National Interprofessionnel des Viandes, de l'Élevage et de l'Aviculture), France, INTERBEV (Association Nationale Interprofessionnel du Bétail et des Viandes), France, and INRA<sup>4</sup>, France.

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed.

UNH, INRA de Theix, 63122 St Genès-Champanelle, France

Tel.: (33) 473 624 074; Fax: (33) 473 624 755

E-mail: [remond@clermont.inra.fr](mailto:remond@clermont.inra.fr)

<sup>4</sup> Abbreviations used: INRA, French National Institute of Agricultural Research; NB, blend of grilled neck and brisket; TL, grilled top loin; S, stewed shoulder.

**ABSTRACT**

Because of its physiological effects, carnosine ( $\beta$ -alanyl-L-histidine) can be considered as a bioactive food component. The objective of this study was to assess the quantitative significance of intact carnosine absorption, after ingestion of different beef meats, using the minipig as animal model. In a preliminary experiment, we evaluated the level of dietary carnosine in intestinal digesta of pigs ( $n = 4$ ), after a meat meal (0.94 g of



protein/kg of body weight) of grilled top loin (TL) or stewed shoulder (S). In accordance with meat carnosine concentration (20.7 and 7.2  $\mu\text{mol/g}$  for TL and S, respectively), intestinal carnosine concentration was greater for TL than S. For both meats, carnosine flow to mid-jejunum was almost completed in the first three hours following intake, and about half of the ingested carnosine disappeared from the intestinal lumen before the mid-jejunum. In catheterized minipigs ( $n = 4$ ), we assessed the portal net release of dietary carnosine after a meat meal (1.4 g of protein/kg of body weight) of TL, S, and a blend of grilled neck and brisket (NB, 12.2  $\mu\text{mole}$  of carnosine/g). Postprandial carnosine plasma concentration and portal net release were not significantly affected after an S meal, but they increased, proportionally to meat carnosine content, with NB and TL. For these meats, carnosine net release throughout the whole postprandial period accounted for 22% of the ingested carnosine. These results indicated that meat carnosine can be significantly absorbed across the intestinal wall, and that carnosine bioavailability depends on carnosine content of cooked meat.

KEY WORDS: *Carnosine · small intestine · absorption · beef meat · minipig*

## INTRODUCTION

Carnosine ( $\beta$ -alanyl-L-histidine) is a cytoplasmic dipeptide found in various animal tissues, including brain, skeletal muscle, liver, kidney, heart, and skin (1). Various biological roles have been ascribed to carnosine, including proton buffering (2), reactive aldehyde scavenging, prevention of protein crosslinking (3), and involvement in the degradation of carbonylated proteins (4). It was reported that some dietary carnosine can cross the gut barrier and appear intact in human plasma (5). Thus, through its biological activities, carnosine can be considered as a bioactive food component with several potential health benefits for humans, such as prevention of pathologies related to oxidative damage, or to release of advanced glycosylation end products and reactive aldehydes e.g. neurodegeneration or diabetes and its related complications (3, 6).

Carnosine is exclusively found in animal tissues, and meat is the main contributor to carnosine supply in humans. Carnosine concentration was shown to increase in human plasma after the consumption of beef (7), however it is not known how much carnosine is actually absorbed intact across the intestinal epithelium, and how absorption is affected by the type of ingested meat. The paracellular route is not dominant for carnosine absorption (5). Thus, for intact absorption, carnosine has to cross the brush border membrane of the

**TABLE 1***Composition of cooked meat*

Component (g/100 g)	Top loin	Shoulder	Neck-Brisket blend
Water	67.0	60.8	62.1
Protein	27.7	33.5	25.7
Fat	5.1	5.8	12.1

enterocyte to remain intact within the cell and to cross the basolateral membrane. Carnosine is thought to be transported across the brush border membrane via the peptide transporter PEPT1 (8). Less is known about its outflow through the basolateral membrane. As suggested for small peptides, carnosine may reach the blood stream via a transporter less sensitive to extracellular pH than PEPT1, with lower substrate affinity but similar substrate specificity (9). Although carnosinase (EC 3.4.13.3) is less abundant than in kidney and liver, its presence has been evidenced in small intestine (10), and part of the absorbed carnosine can be hydrolyzed within the enterocyte.

In this study, we investigated the quantitative importance of carnosine release in the portal vein after ingestion of different, traditionally cooked beef meats, using the minipig as animal model. In a preliminary study, we checked the occurrence of carnosine in intestinal digesta of pigs after a meat meal.

## MATERIALS AND METHODS

*Meats.* Top loin, shoulder, neck and brisket were taken from a Charolais cow. Meat pieces were sampled 2 days post mortem at the slaughterhouse, and were matured 10 days under vacuum at 4 °C. Top loin, neck, and brisket were then sliced (2 cm thickness) and grilled at 380-420 °C until reaching a core temperature of  $55 \pm 5$  °C. After cooking, meats were cooled to 4 °C and cut up. Shoulder was diced (3 cm x 3 cm) and braised for 10 min with margarine (30 g/kg) before stewing in water for 135 min at 80 °C. All meats were vacuum-packed and stored at -20 °C prior to utilization. Before use, meats were thawed at 4°C for 16 h. The proximate composition of meats is given in **Table 1**.

*Animals.* Surgical procedures and postsurgical care were conducted in accordance with national legislation on the care and use of laboratory animals.

*Experiment 1:* Three weeks before the experiment, four 3-month-old female Large White x Danish Landrace pigs ( $40.5 \pm 5.2$  kg) were surgically fitted with a T-shaped cannula (silicone rubber; 12 mm i.d., 17 mm o.d.) in the mid-jejunum (about 4 m downstream of the pylorus), and a catheter (polyvinyl chloride; 1.1 mm i.d., 1.9 mm o.d.) in the vena cava.

*Experiment 2:* Three weeks before the experiment, four 6-month-old ( $21.3 \pm 0.5$  kg) female Pitman-Moore minipigs (CEGAV, Passais-la-Conception, France) were surgically fitted with catheters (polyvinyl chloride; 1.1 mm i.d., 1.9 mm o.d.) in the portal vein and the abdominal aorta, and with a transit-time ultrasonic blood flow probe (12 mm A-series; Transonic Systems, Ithaca, NY) around the portal vein (11). The portal vein

catheter was placed via the splenic vein, with the catheter tip positioned in the liver hilus. Minipigs wore a canvas harness to protect catheters and probe connectors.

Throughout both experiments pigs were housed in individual pens (1 x 1.5 m) separated by plexiglass walls, in a ventilated room with controlled temperature (20-23 °C). They were fed twice daily in equal amounts at 0800 and 1600 h, with a commercial diet (18% protein (N-6.25), 2% fat, 5% cellulose, 6% ash) (Porcyprima, SANDERS, France), and had free access to water. At the end of the experiments, animals were killed with an i.v. injection of sodium pentobarbital (125 mg/kg body weight) (Doléthal; Vetoquinol, Lure, France).

#### *Experimental procedures.*

*Experiment 1:* The experimental protocol included three periods. In the first period, all pigs received a control meal, and in the two other periods, grilled top loin (TL) and stewed shoulder (S) were tested according to a 2 x 2 crossover design. For each animal, sampling sessions were separated by 7 d. Pigs were food-deprived from 1630 h on the day prior to sampling. At 0900 h on the sampling day, they were offered a test meal exclusively composed of meat, or the control meal. Each test meal provided 40 g of protein. The control meal, without carnosine, was made up of 47% free amino acid mixture, 23% wheat starch, 12% fat, and 18% water. The amino acid mixture was representative of beef meat amino acid pattern. Ytterbium (Yb)-acetate, used as a transit marker, was incorporated (as a powder) in a fraction (10%) of each test meal at a level of 1.2 mg Yb/g of meal dry matter. Digesta were continuously collected from 0800 to 1500 h in cold plastic bottles that were replaced each hour. On sampling days, water intake was restricted to 250 mL/h. To prevent dehydration, 1 L of Ringer-lactate solution was intravenously infused throughout the sampling session, at a rate of 150 mL/h.

Hourly collected digesta were immediately homogenized using a Waring Blender at high speed (2 x 5 s spaced by 5 s). Homogenate was subsampled: 10 g were used for dry matter (DM) determination, 200 g were lyophilized for Yb determination, and 100 g were treated with perchloric acid (PCA) (170 mmol/L, final concentration). After vigorous shaking, samples to which PCA had been added were kept on ice 15 min and then centrifuged at 10,000 x g for 20 min at 4 °C. Fractions of supernatants (2% of hourly collected digesta) from the postprandial period were pooled to yield two samples per animal: a first pool representative of the first three hours (PP1), and a second one representative of the last three hours (PP2). Postabsorptive (PA), PP1 and PP2 supernatants were filtered through a 5000-Da cut-off filter (Vivaspin 15, VIVASCIENCE, Hanover,

Germany) at 2,000 x g for 8 to 15 h at 4 °C. Filtrates were stored at -20 °C prior to analysis.

*Experiment 2:* The 4 catheterized minipigs randomly received 3 test meals exclusively composed of grilled top loin (TL), stewed shoulder (S), or a mixture of grilled neck and brisket (40/60; blend used in hamburger) (NB). At least 2 days separated sampling sessions. Before sampling, minipigs were deprived of food from 1700 to 1100 h of the following day. Base-line arterial and portal blood samples were simultaneously withdrawn at 1000, 1030 and 1100 h during the postabsorptive period. Then, at 1105 h, minipigs were offered a test meal (30 g of protein/meal). Arterial and portal blood samples were then taken at 1130, 1200, 1300, 1400, 1500, 1630 and 1800 h. Blood samples (5 mL) were collected into cold syringes with lithium heparin as anticoagulant (S-monovettes, Starstedt). Portal vein blood flow was continuously recorded during the sampling session.

Hemoglobin concentration, pH, bicarbonate ion concentration, and packed cell volume (PCV) were immediately determined using an automatic blood-gas analyzer (ABL510, Radiometer Co., Copenhagen, Denmark). The remaining blood was centrifuged at 3,000 x g for 10 min at 4 °C. Plasma (300  $\mu$ L) spiked with homocarnosine as internal standard (30  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L) was vortexed with sulfosalicylic acid (SSA) (190 mmol/L, final concentration) for 1 min, then left 15 min at room temperature and centrifuged at 10,000 x g for 15 min at 4 °C. The resulting supernatant was stored at -80 °C.

**Analytical methods.** Lyophilized postprandial digesta were pooled at 10% dry matter of hourly collected digesta and homogenized with a mixer. Concentration of Yb in these pools was determined using absorption spectrometry.

Carnosine content in cooked meat was determined by ion-exchange chromatography on an HPLC System (BioTek Kontron, Rotkreuz, Switzerland) using postcolumn derivatization with ninhydrin. Moisture, protein (Kjeldahl method), and crude fat (ether extract) were analyzed according to the methods of the Association of Official Analytical Chemists (12).

Carnosine concentration in digesta and plasma was quantified by RP-HPLC on a 5  $\mu$ m C18-HDO Uptisphere (Interchim) column (250 x 4.6 mm) using a pre-column derivatization with O-phthaldehyde reagent adapted from the method of Maynard et al. (13).

Total antioxidant capacity (TAC) of plasma was measured with the iron/metmyoglobin absorption method (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK). Data are expressed as  $\mu$ mol/L Trolox equivalents.

*Calculations.* Yb jejunal recovery (% of intake) was calculated as:

$$\text{Yb recovery} = [\text{Yb}] \times \text{DM} \times 100/\text{Yb}_{\text{ing}}$$

where [Yb] is the concentration of Yb in pooled digesta, DM is the amount of dry matter collected during the whole postprandial period, and  $\text{Yb}_{\text{ing}}$  is the amount of ingested Yb.

Carnosine jejunal flux (mg/6 h) was calculated as:

$$\text{Carnosine flux} = (([\text{Carn}_{\text{jej}}]_{\text{PP1}} \times \text{FM}_{\text{PP1}}) + ([\text{Carn}_{\text{jej}}]_{\text{PP2}} \times \text{FM}_{\text{PP2}})) \times 100/\text{Yb recovery}$$

where  $[\text{Carn}_{\text{jej}}]_{\text{PP1}}$ ,  $[\text{Carn}_{\text{jej}}]_{\text{PP2}}$  are carnosine concentrations in PP1 and PP2 digesta pool, respectively,  $\text{FM}_{\text{PP1}}$  and  $\text{FM}_{\text{PP2}}$  are amounts of digesta fresh matter collected during the PP1 and PP2 periods.

The portal net flux of carnosine in plasma ( $\text{PNF}_{\text{carn}}$ ,  $\mu\text{mol/h}$ ) was calculated as follows:

$$\text{PNF}_{\text{carn}} = ([\text{Carn}_{\text{port}}] \times (\text{Hb}_{\text{art}}/\text{Hb}_{\text{port}}) - [\text{Carn}_{\text{art}}]) \times \text{PPF}$$

where  $[\text{Carn}_{\text{port}}]$  and  $[\text{Carn}_{\text{art}}]$  are carnosine concentrations ( $\mu\text{mol/L}$ ) in arterial and portal plasma, respectively,  $\text{Hb}_{\text{art}}$  and  $\text{Hb}_{\text{port}}$  are hemoglobin concentrations ( $\text{g/L}$ ) in arterial and portal whole blood, respectively, and PPF is portal plasma flow ( $\text{L/h}$ ).

$$\text{PPF} = \text{PBF} \times (100 - \text{PCV}_{\text{port}})/100$$

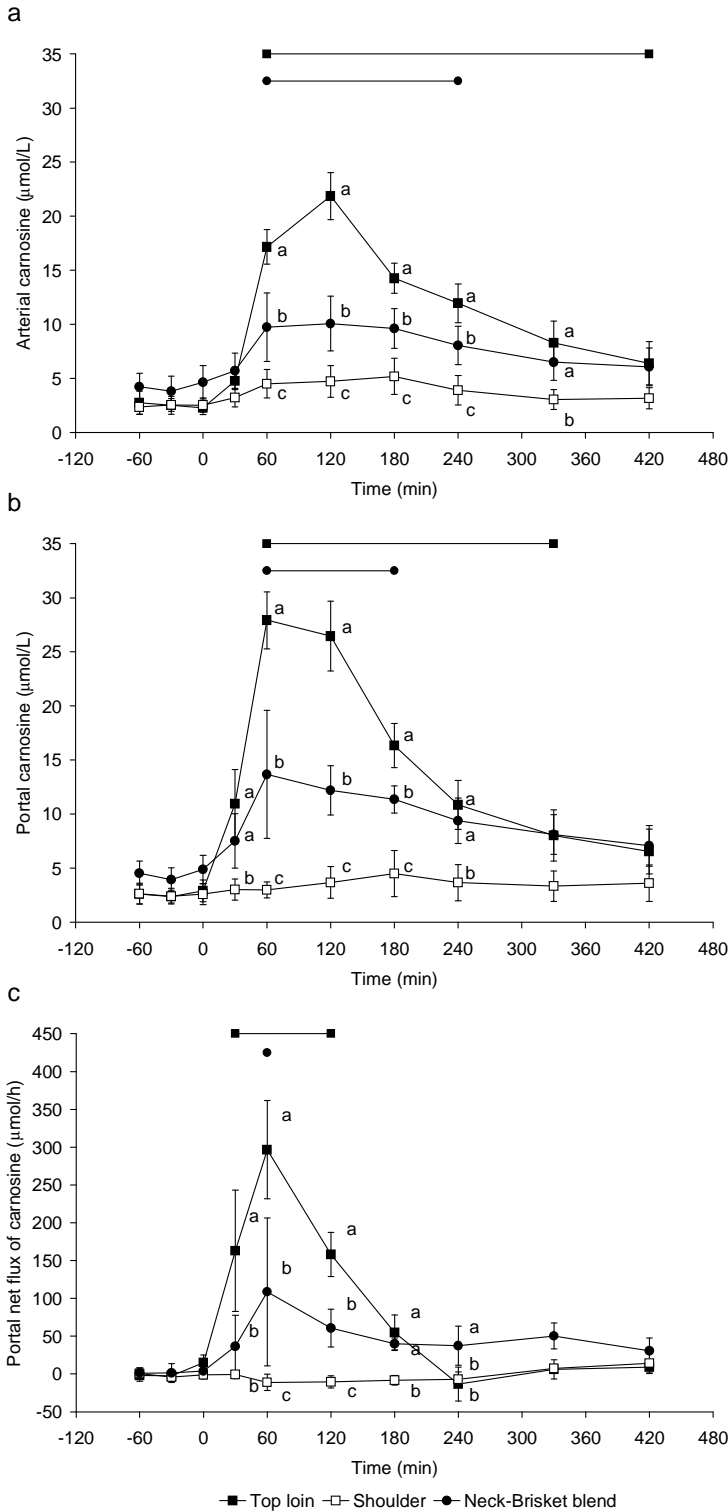
in which PBF is portal blood flow ( $\text{L/h}$ ) and  $\text{PCV}_{\text{port}}$  is packed cell volume in portal blood (%).

*Statistical analyses.* Values in the text are means  $\pm$  SEM. Test meal effects on  $[\text{Carn}_{\text{art}}]$  and  $\text{PNF}_{\text{carn}}$  were statistically analyzed using the repeated option of PROC MIXED procedure of SAS (SAS/STAT<sup>®</sup> Users Guide, Release 8.1; SAS Institute Inc., Cary, NC, 2000), with subjects as random effect and time, group, time\*group as factors. When significant time\*group interaction was found, the LSMEANS procedure was used to test differences at specific times, between groups and within-groups vs baseline. Postprandial area under the curve of  $\text{PNF}_{\text{carn}}$  was calculated integrating the difference between postabsorptive and observed value, using the trapezoidal method. These data, and data from experiment 1, were analyzed by ANOVA with the GLM procedure of SAS, using a model with animal and test meal as independent variables. Means are considered significantly different at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

*Meat carnosine.* Carnosine content of grilled top loin, stewed shoulder, grilled neck, and grilled brisket was 20.7, 7.2, 13.0, and 11.8  $\mu\text{mol/g}$  of meat, respectively.

**Fig 1.** Carnosine concentrations in arterial (a) and portal plasma (b), and carnosine net release in the portal vein (c) of minipigs (n = 4) after ingestion of grilled top loin, stewed shoulder or a blend of grilled neck and brisket. Values are means ± SEM. Data were analyzed by a mixed-model ANOVA, and time\*group interaction was significant ( $P<0.0001$ ) for carnosine concentrations and portal net release. For each time, mean values with different letters are significantly different ( $P<0.05$ ). Lines at the top of each graph indicate a significant difference ( $P<0.05$ ) from baseline for each curve.



**Carnosine in the digestive tract (Experiment 1).** Animals always ate the whole meal in less than 15 min. Carnosine concentration in jejunal content was not significantly different from zero in PA, PP1 and PP2 samples with the control meal, and in PA samples with meat meals. After meat ingestion, jejunal carnosine concentration was greater ( $P < 0.05$ ) with the TL than with the S meal ( $0.82 \pm 0.27$  vs  $0.23 \pm 0.01$  mmol/g in PP1, and  $0.17 \pm 0.02$  vs  $0.06 \pm 0.03$  mmol/g in PP2). Postprandial carnosine flow to the jejunum was greater ( $P < 0.05$ ) for TL than for S ( $1.48 \pm 0.27$  vs  $0.35 \pm 0.04$  mmol/6 h, respectively). When expressed as a proportion of carnosine ingestion, this flow was not different between TL and S meals ( $P > 0.10$ ), and accounted for about 50% of carnosine intake. Carnosine flow to the jejunum was almost completed in the first three hours following meal intake: PP1 accounted for about 90% of the total postprandial flow for both meats.

**Portal vein net release of carnosine (Experiment 2).** Minipigs always ate the whole meal in less than 15 min. Average portal blood flow (PBF) during the postabsorptive period was  $49 \pm 2$  mL·min<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup>. The time-variations in PBF throughout the postprandial period were not significantly affected by the nature of the meat. PBF increased by about 20% during the first hour following the beginning of the meal and then gradually decreased to attain the level of the pre-feeding period 2-3 h later.

Carnosine intake was 2246, 645, and 1494  $\mu$ moles for TL, S, and NB, respectively. Whereas [Carn<sub>art</sub>] was not affected by the ingestion of S, it sharply increased between 30 and 60 min after the meal of TL and NB (**Fig. 1a**). The same pattern was observed for portal carnosine concentration (**Fig. 1b**).

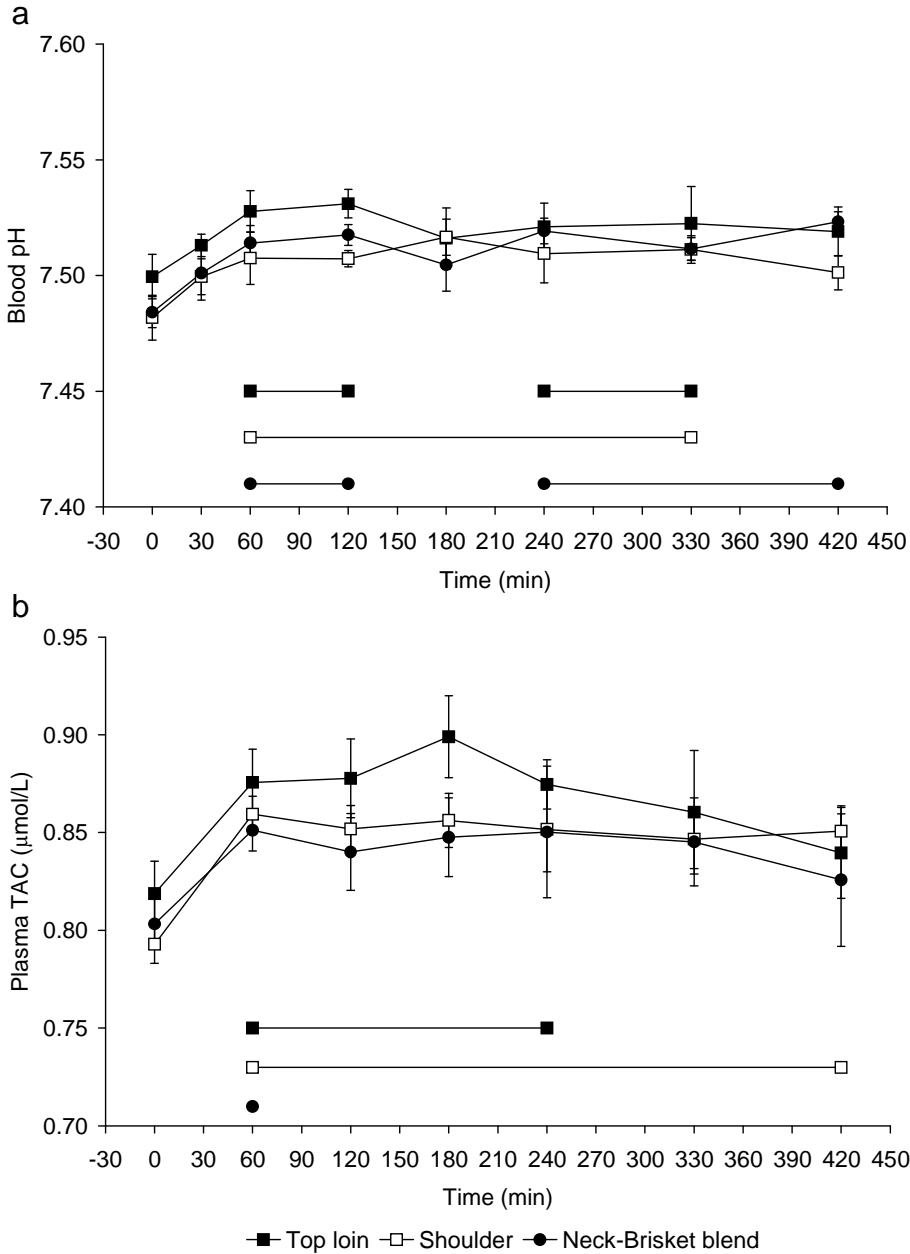
Postabsorptive portal net flux of carnosine was not significantly different from zero ( $-7 \pm 8$   $\mu$ mol/h). Portal net flux of carnosine (PNF<sub>carn</sub>) was not affected by ingestion of S but it significantly increased after the meal of TL and NB (**Fig. 1c**), and for both meats maximum PNF<sub>carn</sub> was reached 1 h after the meals. It returned to the basal level after 2 h and 3 h for NB and TL, respectively. Portal net release of carnosine throughout the postprandial period calculated from PNF<sub>carn</sub> integration, was  $499 \pm 78$ ,  $8 \pm 25$ ,  $332 \pm 66$   $\mu$ mol/7 h accounting for  $22.2 \pm 3.5$  and  $22.3 \pm 4.4$  % of carnosine intake for TL and NB, respectively.

Whatever the meat, blood pH increased after the meal (**Fig. 2a**). Its variation with time was not affected by the type of meat. Postprandial pH increase was linearly related to the increase in blood HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration ( $r^2 = 0.33$ ;  $P < 0.0001$ ) (data not shown).

Whatever the meat, plasma TAC increased during the first hour following the meal (**Fig. 2b**). No significant differences were seen between the kinetics observed with the



**Fig 2.** Blood pH (a) and total antioxidant capacity (TAC) of plasma (b) in minipigs (n = 4) after ingestion of grilled top loin, stewed shoulder or a blend of grilled neck and brisket. Values are means  $\pm$  SEM. Lines at the bottom of each graph indicate a significant difference ( $P < 0.05$ ) from baseline for each curve.



different meats. Nevertheless, TAC was linearly related to carnosine concentration in plasma samples,  $TAC = 4.051 [Carn_{art}] + 817$  ( $r^2 = 0.32$ ;  $P < 0.001$ ) (data not shown).

## DISCUSSION

In raw beef meat, reported carnosine concentrations range from 10 to 20  $\mu\text{mol/g}$  (14-18). Differences between meat may be explained by the muscle oxidative patterns, carnosine level being lower in muscles with a high proportion of oxidative muscle fibers (14), by animal breed and production system (16, 17), and by slaughter age (16). Carnosine level in beef meat is not affected by storage time (16, 19), but can be altered by cooking. In grilled meat, carnosine concentration (on a fresh matter basis) tends to increase (7, 18), although it slightly decreases when expressed on the basis of the dry matter (18). In stewed red meat, decrease in carnosine concentration by up to 30% has been reported (19, 20) which is consistent with the low level of carnosine observed in cooked shoulder in the present study.

Dietary carnosine can be absorbed if it is not rapidly and fully hydrolyzed in the intestinal lumen. In the present study, we observed in young pigs that, after a meat meal, about half of the ingested carnosine flowed to the mid jejunum. Whether the remaining carnosine has been absorbed in the first part of the intestine or degraded is not known. In vitro studies suggested that carnosine in cooked meat is not very sensitive to pepsin and pancreatin digestion (21). Nonetheless, our data show that even if carnosine is hydrolyzed in the gut lumen, this degradation is not rapid enough to prevent its absorption. Carnosine concentration in the intestinal lumen appeared to be related to the amount of ingested carnosine, intestinal concentrations being greater after top loin ingestion than after shoulder ingestion.

Gardner et al (5) were the first to investigate the possibility of the intestinal absorption of intact carnosine in humans. They observed a substantial increase (+ 80  $\mu\text{mol/L}$ ) in plasma carnosine concentration within the hour following oral administration of carnosine, and a rapid decline in the next hour. In humans, plasma carnosine concentration increased (+ 144  $\mu\text{mol/L}$ ) after consumption of a ground beef meal containing 267 mg of carnosine (7). Although the magnitude of the variation was lower in the present study (+ 22  $\mu\text{mol/L}$  with top loin), the increase in minipig plasma carnosine concentration showed a similar pattern: rapid increase during the first postfeeding hours, maximum concentrations 2-3 h postfeeding and return to baseline 6-7 h postfeeding. Furthermore, maximal values of plasma carnosine were closely related to carnosine intake.

Plasma concentrations remain difficult to interpret because they result from entry rate in plasma (endogenous production and intestinal absorption) and disappearance rate (degradation, uptake by tissues). In the present study, the minipig model allowed us to focus on carnosine intestinal absorption.

After carnosine oral administration in humans, carnosine excretion in the urine was shown to account for up to 14% of ingested carnosine (5). From these data, it was however not possible to quantify true intestinal absorption. If we assume no significant uptake of arterial carnosine and no significant synthesis of carnosine by the portal drained viscera, portal net release of carnosine reflects intestinal absorption. In the present study, the portal net release of carnosine accounted for about 22% of the intake for top loin and the neck-brisket blend. Surprisingly, no significant portal net flux of carnosine was detected after shoulder intake, and there was no significant increase in arterial carnosine. Cooking conditions for shoulder were more drastic than for the other meats, and a lower small intestinal digestibility of carnosine might be suspected. Indeed, although no difference in jejunal digestibility between grilled top loin and stewed shoulder was detected in the digestion study, carnosine adduct formation during prolonged cooking may reduce carnosine digestibility in the distal part of the small intestine. The absence of carnosine net release into the portal vein could also be due to a threshold effect: below 700  $\mu$ mole of carnosine ingested, all dietary carnosine would be sequestered in the small intestine. Above this value, carnosine net release in blood would be proportional to carnosine intake. This threshold for carnosine net release in bloodstream would be mainly related to an overflow of the intestinal carnosinase activity.

Among its different potential activities, carnosine pH buffering capacity is the most widely accepted. In the present study, owing to the high protein content of the meals, a postprandial decrease in pH could have been expected as a consequence of oxidation of S-containing amino acids to  $H_2SO_4$ . Conversely, whatever the ingested meat, blood pH increased after the meal. This increase was mainly related to the postprandial increase in blood bicarbonate, leading to the recognized postprandial 'alkaline tide' (22). Under these conditions, it was impossible to detect any "anti-acidosis" effect of dietary carnosine in blood. Nevertheless, it was shown in humans that oral supplementation with chicken breast extract, which is a rich source of histidine dipeptide, enhances nonbicarbonate blood pH buffering during intense intermittent exercise (23).

In humans, serum TAC was shown to increase after a meat meal, without any contribution of serum urate level increase, and a similar increase was observed after oral

administration of carnosine alone (24). In the present study, we also observed a postprandial increase in plasma TAC level after a meat meal in minipigs. Although it was impossible to relate this increase in plasma TAC to carnosine meat content, regression analysis showed that up to 30% of TAC variations could be explained by plasma carnosine increase.

In conclusion, the results of this study provide further evidence that small peptides can cross small intestinal epithelium, and reach the bloodstream. After a meal of meat, a significant amount of carnosine is released into the portal blood, depending on the amount of carnosine intake. Owing to its numerous health benefits, carnosine should be considered when defining the nutritional value of meat.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank D. Durand for surgical preparation of the animals, C. Lafarge for animal care, and C. Cossoul and C. Buffière for technical assistance.

### **LITERATURE CITED**

1. Boldyrev AA, Severin SE. The histidine-containing dipeptides, carnosine and anserine: distribution, properties and biological significance. *Adv Enzyme Reg.* 1990; 30: 175-94.
2. Abe H. Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituents in vertebrate muscle. *Biochemistry (Mosc).* 2000; 65: 757-65.
3. Guitto A, Calderan A, Ruzza P, Borin G. Carnosine and carnosine-related antioxidants: a review. *Curr Med Chem.* 2005; 12: 2293-315.
4. Hipkiss AR, Brownson C, Bertani MF, Ruiz E, Ferro A. Reaction of carnosine with aged proteins: another protective process. *Ann NY Acad Sci.* 2002; 959: 285-94.
5. Gardner LLG, Illingworth KM, Kelleher J, Wood D. Intestinal absorption of the intact peptide carnosine in man, and comparison with intestinal permeability to lactulose. *J Physiol.* 1991; 439: 411-22.
6. Hipkiss AR. Glycation, ageing and carnosine: are carnivorous diets beneficial? *Mech Aging Dev.* 2005; 126: 1034-39.
7. Park YJ, Volpe SL, Decker EA. Quantitation of carnosine in humans plasma after dietary consumption of beef. *J Agric Food Chem.* 2005; 53: 4736-39.

8. Son DO, Satsu H, Kiso Y, Shimizu M. Characterization of carnosine uptake and its physiological function in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biofactors*. 2004; 21: 395-38.
9. Irie M, Terada T, Okuda M, Inui K. Efflux properties of basolateral peptide transporter in human intestinal cell line Caco-2. *Pflugers Archiv*. 2004; 449: 186-94.
10. Lenney JF, Peppers SC, Kucera-Orallo CM, George RP. Characterization of human tissue carnosinase. *Biochem J*. 1985; 228: 653-60.
11. Rémond D, Ortigues-Marty I, Isserty A, Lefaivre J. Technical note: measuring portal blood flow in sheep using an ultrasonic transit time flow probe. *J Anim Sci*. 1998; 76: 2712-16.
12. Williams S. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 14<sup>th</sup> edn. Association of Official Analytical Chemists, Virginia. 1984.
13. Maynard LM, Boissonneault GA, Chow CK, Bruckner GG. High Levels of dietary carnosine are associated with increased concentrations of carnosine and histidine in rat soleus muscle. *J Nutr*. 2001; 131: 287-90.
14. Rao MV, Gault NFS. The influence of fiber-type composition and associated biochemical characteristics on the acid buffering capacities of several beef muscles. *Meat Sci*. 1989; 26: 5-18.
15. Aristoy, MC, Toldra F. Histidine dipeptides HPLC-based test for the detection of mammalian origin proteins in feeds for ruminants. *Meat Sci*. 2004; 67: 211-17.
16. Watanabe A, Ueda Y, Higuchi M. Effects of slaughter age on the levels of free amino acids and dipeptides in fattening cattle. *Anim Sci J*. 2004; 75: 361-67.
17. Purchas RW, Busboom J. The effect of production system and age on levels of iron, taurine, carnosine, coenzyme q(10), and creatine in beef muscles and liver. *Meat Sci*. 2005; 70: 589-96.
18. Purchas RW, Rutherfurd SM, Pearce PD, Vather R, Wilkinson BHP. Cooking temperature effects on the forms of iron and levels of several other compounds in beef semitendinosus muscle. *Meat Sci*. 2004; 68: 201-7.
19. Bauchart C, Rémond D, Chambon C, Patureau Mirand P, Savary-Auzeloux I, Reynès C, Morzel M. Small peptides (<5 kDa) found in ready-to-eat beef meat. *Meat Sci*. 2006; 74: 658-66.
20. Purchas RW, Rutherfurd SM, Pearce PD, Vather R, Wilkinson BHP. Concentrations in beef and lamb of taurine, carnosine, coenzyme Q10, and creatine. *Meat Sci*. 2004; 66: 629-37.

21. Purchas RW, Busboom JR, Wilkinson BHP. Changes in the forms of iron and in concentrations of taurine, carnosine, coenzyme Q<sub>10</sub>, and creatine in beef longissimus muscle with cooking and simulated stomach and duodenal digestion. *Meat Sci.* 2006; 74: 443-449.
22. Moore EW. The alkaline tide. *Gastroenterol.* 1967; 52:1052-4.
23. Susuki Y, Nakao T, Maemura H, Sato M, Kamahara K, Morimatsu F, Takamatsu K. Carnosine and anserine ingestion enhances contribution of nonbicarbonate buffering. *Med Sci Sports Exerc.* 2006; 38: 334-38.
24. Antonini FM, Petruzzi E, Pinzani P, Orlando C, Pogessi M, Serio M, Pazzagli M, Masotti G. The meat in the diet of aged subjects and the antioxidant effects of carnosine. *Arch Gerontol Geriatr.* 2002; suppl 8: 7-14.

## Discussion générale

"If we continue to look only for free amino acids we shall find only free amino acids ; peptides cannot be expected to declare their presence" écrivait Matthews dès 1991. Malgré cela, l'apparition dans le sang porte de peptides d'origine alimentaire reste à ce jour peu documentée. Pourtant, la possibilité d'une absorption de peptides sous forme intacte à travers l'épithélium intestinal a bien été démontrée. Il s'agit essentiellement de l'absorption de di- et tripeptides, tels que la carnosine (Gardner et al., 1991 ; Park et al., 2005), les séquences GG (Adibi, 1971), VY (Matsui et al., 2002) et GGG (Matthews et Adibi, 1976). Des peptides de plus de 4 acides aminés issus du CMP et de fragments des caséines ont également été détectés dans le plasma après l'ingestion de lait et de yaourt chez l'homme (Chabance et al., 1998). De même, des fragments de CMP ont été mis en évidence dans le sang suite à l'ingestion de Phe-CMP chez le rat (Fosset et al., 2002).

Nos travaux (*cf publication n°5*) démontrent de façon directe (flux porte) la possibilité d'une absorption d'un dipeptide, la carnosine, après l'ingestion d'un repas contenant de la viande. Dans nos conditions expérimentales, la quantité de carnosine absorbée représente pratiquement un quart de la carnosine ingérée pour deux des viandes testées (faux-filet et mélange collier/caparaçon). Par contre, pour la troisième viande testée (paleron), qui présentait la plus faible teneur en carnosine, aucune absorption n'a pu être mise en évidence. Ceci pourrait s'expliquer par un effet de seuil, la concentration dans les digesta en un peptide donné devant atteindre un niveau suffisant pour permettre son apparition dans le compartiment sanguin. Cependant, d'autres hypothèses peuvent également être avancées pour expliquer cette observation. Le mode de cuisson du paleron était différent de celui des deux autres viandes, la cuisson longue du paleron pourrait avoir diminué la disponibilité intestinale de la carnosine et limité son absorption. Il est également possible que l'effet de seuil soit dû, non pas à la concentration dans les aliments et par conséquent dans les digesta, mais plutôt aux limites analytiques (seuil de détection).

Au cours de cette étude, nous avons également entrepris une recherche plus systématique des peptides d'origine alimentaire dans le plasma, en utilisant une technique de spectrométrie de masse récemment développée dans le cadre des études de "métabolomique", l'HPLC-ESI-Q-ToF. Dans un premier temps, nous avons utilisé ce spectromètre de masse pour obtenir des profils de masse des composés présents dans les échantillons. Bien que les deux aliments testés (faux-filet et paleron) soient tous deux issus de muscles relativement proches en terme de composition biochimique, nous avons pu

mettre en évidence des différences dans le profil et le nombre de composés détectés de façon répétable dans le plasma après ingestion de ces aliments. L'ingestion de paleron, viande qui se distinguait par une teneur élevée en collagène et une cuisson longue, a conduit à une présence répétable d'un plus grand nombre de composés. Ce sont principalement des peptides d'une taille inférieure à 700 Da, parmi lesquels on pourrait s'attendre à retrouver des di- et tripeptides.

Notre tentative de rapprochement des données obtenues sur les contenus digestifs et les plasmas a été peu fructueuse dans la mesure où peu de composés détectés dans le plasma étaient également présents dans la lumière intestinale. Ceci suggère une dégradation importante des peptides à l'intérieur des entérocytes par les peptidases cytosoliques, ce qui aurait pour conséquence un remodelage du profil peptidique. Il faut cependant garder à l'esprit que les prélèvements de contenus digestifs et de plasma n'ont pas été effectués au cours d'une même expérience et sur les mêmes animaux et considérer ces résultats avec prudence. De plus, l'identification des composés n'a pas encore été réalisée et il est probable que tous ne soient pas des peptides. Ces travaux seront donc poursuivis par l'identification des composés d'intérêt, à partir de leur spectre de fragmentation.



---

---

## **DISCUSSION FINALE ET PERSPECTIVES**

---

---

Lorsque ce travail de thèse a été entrepris, la notion de peptides bioactifs était déjà ancienne. Elle reposait essentiellement sur la mise en évidence de propriétés physiologiques attribuées à des fractions des protéines alimentaires. Le développement des études basées sur l'analyse de ce concept a conduit à la multiplication des composés potentiellement actifs et des fonctions susceptibles d'y être sensibles. Toutefois, la plupart des travaux portaient sur les protéines laitières, évaluaient le potentiel d'activité d'hydrolysats, le plus souvent *in vitro*, mais aussi dans certains cas *in vivo* et cherchaient à identifier le ou les composés actifs. Si certaines études cherchaient à connaître aussi le devenir des composés actifs lors de la digestion, rares sont celles qui ont aussi cherché à suivre *in vivo* la génération du composé actif et son absorption. C'est plutôt cette dernière approche qui a inspiré ce travail dont l'objectif était d'élaborer une stratégie et une méthodologie permettant de détecter des oligopeptides alimentaires susceptibles d'être actifs au niveau du tractus digestif ou des autres organes après absorption et de l'appliquer au cas des produits carnés (viande ou poisson). La démarche a donc été de rechercher, à l'aide des outils de la peptidomique puis de la métabolomique, des oligopeptides bien caractérisés, qui présentent des caractéristiques de stabilité dans l'aliment ou dans la lumière digestive ou dans le compartiment sanguin et éventuellement des séquences compatibles avec une activité physiologique par une action au niveau du tractus digestif avant absorption ou au niveau d'autres organes après avoir été absorbés. La mise en œuvre de cette stratégie à l'étude des produits carnés a conduit à examiner la composition peptidique originelle des muscles puis lors de leur transformation en aliments (conservation/maturation et cuisson), puis celles des contenus digestifs et enfin du plasma de la veine porte. Bien que ce travail ne soit pas totalement achevé puisque la caractérisation des peptides générés par un repas de viande dans le compartiment sanguin n'est pas terminée ou incertaine, il a apporté un ensemble de résultats originaux qui devraient permettre de mieux orienter la recherche de peptides bioactifs, notamment dans les produits carnés.

La première partie du travail expérimental a montré que dans le muscle de truite ou de bovin, les peptides prépondérants étaient les dipeptides de l'histidine et le glutathion et que les oligopeptides protéiniques étaient quantitativement peu abondants mais présents de façon reproductible pour certains d'entre eux. Les conditions de conservation et de cuisson des aliments issus de ces muscles n'ont eu que peu d'influence sur les concentrations en dipeptides de l'histidine et en glutathion, ce qui fait de ces aliments des sources de ces

composés nutritionnellement intéressants. En revanche, la maturation et surtout la cuisson longue de la viande ont produit de nombreux oligopeptides protéiniques de façon très reproductible pour un grand nombre d'entre eux. La diversité de ces oligopeptides n'a pas pu être complètement mise en évidence, notamment chez la truite, par l'identification de chacun d'entre eux, probablement en raison de leur faible abondance. Il serait intéressant de savoir quelles sont les conséquences sensorielles et nutritionnelles de la présence de ces oligopeptides dans la viande cuite.

Des résultats originaux ont été obtenus lors de l'étude des différentes phases digestives de la génération d'oligopeptides, et particulièrement novateurs dans le cas des protéines carnées. Si aucun peptide ayant une masse comprise entre 2300 et 5000 Da n'a été détecté dans les fractions extraites des contenus digestifs, de très nombreux composés l'ont été pour des masses inférieures, notamment des composés de faible masse (< 800 Da) dont il faudra confirmer qu'il s'agit d'oligopeptides après identification. Parmi les peptides identifiés (entre 700 et 2300 Da), la plupart d'entre eux apparaissaient de façon apparemment aléatoire. Ils provenaient principalement de l'actine et de la myosine. Cela indique que la digestion de ces protéines majeures du muscle libère une grande variété de peptides, même si certains sont apparentés et se distinguent seulement par la perte d'un ou deux acides aminés.

Toutefois, pour environ 20% de ces peptides identifiés dans les digesta, leur présence était beaucoup plus constante. D'une taille comprise entre 800 et 1600 Da, ils provenaient d'abord de l'actine et comportaient une ou plusieurs séquences ayant montré des propriétés inhibitrices de l'ACE. D'autres protéines musculaires comme la créatine kinase et la GA3PDH ont aussi fourni au moins un peptide observé de façon répétable. La contribution de la myosine était plus épisodique. On peut penser que c'est plutôt dans la population de ces peptides observés de façon répétable, apparemment moins sensibles à l'action des protéases et peptidases, qu'il convient de rechercher d'éventuels peptides bioactifs ou précurseurs de peptides bioactifs. Cette action des protéases conditionne la nature des profils peptidiques observés. Ainsi, ils étaient relativement différents dans le duodénum (résultat de l'action des protéases gastriques) et le jéjunum (résultat de l'action des protéases gastriques, pancréatiques et intestinales, et aussi de l'absorption intestinale) car seulement 2 peptides étaient communs sur les 28 détectés avec les 4 aliments. Cependant, à un niveau donné de l'intestin, certains peptides étaient présents systématiquement, avec les 3 viandes et même la truite. Si une activité biologique devait

leur être attribuée, elle serait commune à tous ces aliments. Par contre, très peu de peptides spécifiques d'un aliment donné figuraient parmi les peptides les plus constants : trois seulement dans les contenus de duodénum étaient spécifiques de la truite et pourraient donc être vecteurs d'effets particuliers à cet aliment (deux issus de chaînes légères de la myosine et le troisième de la GA3PDH).

Les travaux sur l'absorption des peptides d'origine alimentaire sont moins avancés mais ils sont prometteurs. D'une part, l'étude sur l'absorption de la carnosine a clairement mis en évidence dans quelle mesure la viande bovine était une source alimentaire majeure de ce peptide musculaire. D'autre part, deux observations suggèrent congrûment l'absorption de nombreux peptides alimentaires. Ce sont l'apparition d'un grand nombre de composés spécifiques dans le plasma de la veine porte observés de façon répétable après un repas de viande, et le fait que certains d'entre eux présentent des caractéristiques (masses et temps de rétention chromatographiques) qui ont aussi été observées dans les contenus digestifs. De plus, contrairement à ce qui était constaté dans les contenus digestifs pour des peptides de plus grande taille, les composés détectés dans le plasma de la veine porte paraissaient beaucoup plus spécifiques de l'aliment, même pour des aliments aussi proches que le faux-filet et le paleron. Si c'est confirmé, cela illustrerait le rôle majeur de l'intestin dans le remaniement des peptides absorbés et l'existence de mécanismes semblables à celui mis en évidence pour la carnosine, conditionnant leur passage au niveau sanguin à leur abondance dans la lumière intestinale ou dans les entérocytes.

Ces études montrent donc que la viande bovine et la truite sont des sources potentielles de peptides bioactifs puisqu'elles sont susceptibles de fournir des peptides présentant des caractéristiques de stabilité et de séquence compatibles avec une activité physiologique, soit au niveau du tractus digestif avant absorption, soit au niveau d'autres organes après avoir été absorbés. Elles comportent cependant certaines limites.

Certaines sont d'ordre analytique.

En effet, malgré leur potentiel impressionnant, les techniques de peptidomique et de métabolomique utilisées ne permettent pas de dresser des listes exhaustives des peptides présents dans les échantillons, notamment de ceux pour lesquels l'ionisation est difficile. De plus, les identifications sont dépendantes de la qualité des bases de données et il est possible que certains peptides qui en sont absents, n'aient pu être identifiés.

D'autres limites concernent le protocole.

Une étude avec modèle animal, même s'il est proche de l'homme, ne remplace pas une étude clinique. Ce modèle qui a été imposé par des prélèvements de contenus à différents niveaux de l'intestin grêle et surtout de sang de la veine porte, a permis de confirmer l'hypothèse du potentiel des aliments carnés comme source de peptides fonctionnels et d'identifier un certain nombre de ces peptides éventuellement bioactifs. Cela devrait faciliter la suite de leur étude, notamment chez l'homme. Le choix d'un repas test composé uniquement de viande ou de truite, a probablement rendu plus aisée la recherche des peptides mais il faut bien avoir conscience que ce qui a été observé dans cette situation n'est pas nécessairement représentatif des phénomènes qui se produisent dans le cadre d'une alimentation courante. Le fait d'avoir testé des aliments préparés dans les conditions où ils sont habituellement consommés, ne permet pas de distinguer dans leur comparaison ce qui dépend de la nature de l'aliment de ce qui est dû au mode de préparation. Enfin, l'approche utilisée était essentiellement qualitative et non quantitative, notamment dans l'étude des phénomènes digestifs. Hormis les cas des acides aminés peptidiques, des dipeptides de l'histidine et du glutathion dans les aliments ainsi que l'absorption de la carnosine, aucune quantification des peptides identifiés n'a été réalisée. Or, il semble que les effets physiologiques des peptides bioactifs ne soient pas indépendants de la quantité apportée.

De ce travail, exploratoire par différents aspects, émergent plusieurs questions.

Les unes sont relatives à la nature des composés de faible masse détectés par HPLC-ESI-Q-ToF dans les contenus digestifs et le plasma. Leur identification, possible à partir de leur spectre de fragmentation, sera entreprise pour les plus représentatifs et complètera celle déjà effectuée dans les contenus digestifs pour les composés de plus de 800 Da.

La suite évidente de ce travail est aussi de rechercher quelles propriétés physiologiques peuvent être attribuées aux peptides repérés. Cela est déjà possible pour nombre d'entre elles par l'interrogation de bases de données qui ont listé un grand nombre de séquences potentiellement actives dont il conviendra de vérifier l'efficacité lorsqu'elles sont apportées par de la viande bovine ou de la truite. Ce travail pourrait aussi avoir des prolongements par ses retombées que ce soit dans le domaine des sciences des aliments ou dans celui de la nutrition. En effet, les études sur les peptides des aliments se multiplient et pas seulement pour leur intérêt nutritionnel mais aussi pour leur éventuel impact sur les propriétés fonctionnelles et sensorielles des aliments vecteurs ou comme traceurs des

traitements auxquels ils ont été soumis. En outre, la notion de peptide bioactif interfère avec plusieurs aspects génériques des recherches en nutrition. En effet, les travaux sur la cinétique de la digestion des protéines et d'apparition des produits de leur digestion rejoignent ainsi ceux relatifs à la chrononutrition. De même, le concept de peptide bioactif fait référence au rôle signal de ces composés d'origine alimentaire et s'intègre dans les recherches sur le rôle signal des nutriments dont elle élargit la notion. Enfin, les progrès des connaissances sur les peptides bioactifs permettent de réactualiser la notion de qualité nutritionnelle des protéines alimentaires, traditionnellement fondée sur leur composition en acides aminés indispensables et leur digestibilité, en y intégrant d'autres propriétés susceptibles d'avoir un impact sur la santé et de mieux replacer ces aliments dans le cadre d'une alimentation équilibrée.

---

---

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

---

- Abe, H. (2000). Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituents in vertebrate muscle. *Biochem. (Mosc.)* 65, 757-765.
- Abugroun, H.A.; Forrest, J. C.; Aberle, E.D.; Judge, M.D. (1985). Shortening and tenderness of pre-rigor heated beef: Part 2 - Effect of heating rate on muscles of electrically stimulated carcasses. *Meat Sci.* 14, 15-28.
- Abumrad, N.N.; Morse, E.L.; Lochs, H.; Williams, P.E.; Adibi, S.A. (1989). Possible sources of glutamine for parenteral nutrition: impact on glutamine metabolism. *Am. J. Physiol.* 257, E228-E234.
- Adams, M.R.; Golden, D.L.; Franke, A.A.; Potter, S.M.; Smith, H.S.; Anthony, M.S. (2004). Dietary soy beta-conglycinin (7S globulin) inhibits atherosclerosis in mice. *J. Nutr.* 134, 511-516.
- Adibi, S.A. (1971). Intestinal transport of dipeptides in man: relative importance of hydrolysis and intact absorption. *J. Clin. Invest.* 50, 2266-2275.
- Adibi, S.A.; Paleos, G.A.; Morse, E.L. (1986). Influence of molecular structure on half-life and hydrolysis of dipeptides in plasma: importance of glycine as N-terminal amino acid residue. *Metabolism* 35, 830-836.
- Adson, A.; Raub, T.J.; Burton, P.S.; Barsuhn, C.L.; Hilgers, A.R.; Audus, K.L.; Ho, N.F. (1994). Quantitative approaches to delineate paracellular diffusion in cultured epithelial cell monolayers. *J. Pharm. Sci.* 83, 1529-1536.
- Ait-Oukhatar, N.; Bouhallab, S.; Bureau, F.; Arhan, P.; Maubois, J.L.; Drosdowsky, M.A.; Bougle, D.L. (1997). Bioavailability of caseinophosphopeptide bound iron in the young rat. *J. Nutr. Biochem.* 8, 190-194.
- Ait-Oukhatar, N.; Peres, J.M.; Bouhallab, S.; Neuville, D.; Bureau, F.; Bouvard, G.; Arhan, P.; Bougle, D. (2005). Bioavailability of caseinophosphopeptide-bound iron. *J. Lab. Clin. Med.* 140, 290-294.
- Albers, S.; Wernerman, J.; Stehle, P.; Vinnars, E.; Furst, P. (1988). Availability of amino acids supplied intravenously in healthy man as synthetic dipeptides: kinetic evaluation of L-alanyl-L-glutamine and glycyl-L-tyrosine. *Clin. Sci.* 75, 463-468.
- Alnemri, E.S.; Livingston, D.J.; Nicholson, D.W.; Salvesen, G.; Thornberry, N.A.; Wong, W.W.; Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 87, 171.
- Anderson, M.E. (1998). Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem. Biol. Interact.* 112, 1-14.
- Arihara, K. (2006). Functional properties of bioactive peptides derived from meat proteins. In *Advanced Technologies for Meat Processing* Nollet, L.M.L.; Toldrá, F. (Eds.). CRC Taylor & Francis Group. pp. 245-273.



- Arihara, K.; Nakashima, Y.; Mukai, T.; Ishikawa, S.; Itoh, M. (2001). Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Sci.* 57, 319-324.
- Aristoy, M.C.; Toldrá, F. (1998). Concentration of free amino acids and dipeptides in porcine skeletal muscles with different oxidative patterns. *Meat Sci.* 50, 327-332.
- Aristoy, M.C.; Toldrá, F. (2004). Histidine dipeptides HPLC-based test for the detection of mammalian origin proteins in feeds for ruminants. *Meat Sci.* 67, 211-217.
- Asche, G.L.; Lewis, A.J.; Peo, E.R. Jr. (1989). Protein digestion in weanling pigs: effect of feeding regimen and endogenous protein secretion. *J. Nutr.* 119, 1083-1092.
- Asghar, A.; Bhatti, A.R. (1987). Endogenous proteolytic enzymes in skeletal muscle: their significance in muscle physiology and during postmortem aging events in carcasses. *Adv. Food Res.* 31, 343-451.
- Ayala, M.D.; Lopez Albors, O.; Blanco, A.; Garcia Alcazar, A.; Abellan, E.; Ramirez Zarzosa, G.; Gil, F. (2005). Structural and ultrastructural changes on muscle tissue of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., after cooking and freezing. *Aquaculture* 250, 215-231.
- Baran, E.J. (2000). Metal complexes of carnosine. *Biochemistry* 65, 789-797.
- Barbut, S.; Findlay, C.J. (1991). Influence of sodium, potassium and magnesium chloride on thermal properties of beef muscle. *J. Food Sci.* 56, 180-182.
- Bauchart, C.; Chambon, C.; Patureau Mirand, P.; Savary-Auzeloux, I.; Rémond, D.; Morzel, M. (2007). Peptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle subjected to ice storage and cooking. *Food Chem.* 100, 1566-1572.
- Bauchart, C.; Rémond, D.; Chambon, C.; Patureau Mirand, P.; Savary-Auzeloux, I.; Reynès, C.; Morzel, M. (2006). Small peptides (<5 kDa) found in ready-to-eat beef meat. *Meat Sci.* 74, 658-666.
- Belem, M.A.F.; Gibbs, B.F.; Lee, B.H. (1999). Proposing Sequences for Peptides Derived from Whey Fermentation with Potential Bioactive Sites. *J. Dairy Sci.* 82, 486-493.
- Bendall, J.R.; Restall, D.J. (1983). The cooking of single myofibres, small myofibre bundles and muscle strips from beef *M. psoas* and *M. sternomandibularis* muscles at varying heating rates and temperature. *Meat Sci.* 8, 93-117.
- Beucher, S.; Levenez, F.; Yvon, M.; Corring, T. (1994). Effects of gastric digestive products from casein on CCK release by intestinal cells in rat. *J. Nutr. Biochem.* 5, 578-584.
- Beutler, E. (1989). Nutritional and Metabolic Aspects of Glutathione. *Annu. Rev. Nutr.* 9, 287-302.

- Bhardwaj, R.K.; Herrera-Ruiz, D.; Eltoukhy, N.; Saad, M.; Knipp, G.T. (2006). The functional evaluation of human peptide/histidine transporter 1 (hPHT1) in transiently transfected COS-7 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 27, 533-542.
- Boldyrev, A.A.; Dupin, A.M.; Bunin, A.Y.A., Babizhaev, M.A.; Severin, S.E. (1987). The antioxidative properties of carnosine, a natural histidine containing dipeptide. *Biochem. Int.* 15, 1105-1113.
- Boldyrev, A.A.; Severin, S.E. (1990). The histidine-containing dipeptides, carnosine and anserine: distribution, properties and biological significance. *Adv. Enzyme Regul.* 30, 175-194.
- Bonfanti, L.; Peretto, P.; De Marchis, S.; Fasola, A. (1999). Carnosine-related dipeptides in the mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 59, 333-353.
- Bourlieux, P. (1998). Composition et rôles de la flore intestinale. *La lettre de l'Institut Danone, Objectif Nutrition N°41.*
- Brandsch, M.; Knütter, I.; Leibach, F.H. (2004). The intestinal H<sup>+</sup>/peptide symporter PEPT1: structure-affinity relationships. *Eur. J. Pharm. Sci.* 21, 53-60.
- Brandsch, M.; Knütter, I.; Thuncke, F.; Hartrodt, B.; Born, I.; Borner, V.; Hirche, F.; Fischer, G.; Neubert, K. (1999). Decisive structural determinants for the interaction of proline derivatives with the intestinal H<sup>+</sup>/peptide symporter. *Eur. J. Biochem.* 266, 502-508.
- Brantl, V.; Teschemacher, H.; Henschen, A.; Lottspeich, F. (1979). Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone. *Hoppe Seylers Z Physiol. Chem.* 360, 1211-1216.
- Brinckerhoff, L.H.; Kalashnikov, V.V.; Thompson, L.W. Yamshchikov, G.V.; Pierce, R.A.; Galavotti, H.S.; Engelhard, V.H.; Slingluff, C.L. Jr. (1999). Terminal modifications inhibit proteolytic degradation of an immunogenic MART-1(27-35) peptide: implications for peptide vaccines. *Int. J. Cancer* 83, 326-334.
- Brunton, N.P.; Lyng, J.G.; Zhang, L.; Jacquier, J.C. (2006). The use of dielectric properties and other physical analyses for assessing protein denaturation in beef *biceps femoris* muscle during cooking from 5 to 85 degrees C. *Meat Sci.* 72, 236-244.
- Carnegie PR, Hee KP, Bell AW. (1982). Ophidine (beta-alanyl-L-3-methylhistidine, "balenine") and other histidine dipeptides in pig muscles and tinned hams. *J. Sci. Food Agric.* 33, 795-801.
- Carnegie, P.R.; Ilic, M.Z.; Etheridge, M.O.; Collins, M.G. (1983). Improved high-performance liquid chromatographic method for analysis of histidine dipeptides anserine, carnosine and balenine present in fresh meat. *J. Chromatogr.* 261, 153-157.
- Chabance, B.; Marteau, P.; Rambaud, J.C.; Migliore-Samour, D.; Boynard, M.; Perrotin, P.; Guillet, R.; Jollès, P.; Fiat, A.M. (1998). Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie* 80, 155-165.

- Chan, K.M.; Decker, E.A. (1994). Endogenous skeletal muscle antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 34, 403-426.
- Chan, K.M.; Decker, E.A.; Chow, C.K.; et Boissonneault, G.A. (1994). Effect of dietary carnosine on plasma and tissue antioxidant concentrations and on lipid oxidation in rat skeletal-muscle. *Lipids* 29, 461-466.
- Chang, K.J.; Killian, A.; Hazum, E.; Cuatrecasa, P. (1981). Morphiceptin (NH<sub>4</sub>-tyr-pro-phe-pro-COHN<sub>2</sub>): a potent and specific agonist for morphine (mu) receptor. *Science* 212, 75-77.
- Chen, J.R.; Yang, S.C.; Suetsana, K.; Chao, J.C. (2004). Soybean protein-derived Hydrolysate affects blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J. Food Biochem.* 28, 61-73.
- Chéret, R.; Delbarre-Ladrat, C.; de Lamballerie-Anton, M.; Verrez-Bagnis, V. (2007). Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. *Food Chem.* 101, 1491-1496.
- Chiba, H.; Tani, F.; Yoshikawa, M. (1989). Opioid antagonist peptides derived from kappa-casein. *J. Dairy Res.* 56, 363-366.
- Cho, E.S.; Sahyoun, N.; Stegink, L.D. (1981). Tissue glutathione as a cysteine reservoir during fasting and refeeding of rats. *J. Nutr.* 111, 914-922.
- Choi, H.S.; Cho, H. Y.; Yang, H.C.; Ra, K.S.; Suh, H.J. (2001). Angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Grifola frondosa*. *Food Res. Intern.* 34, 177-182.
- Choi, I.; Jung, C.; Choi, H.; Kim, C.; Ha, H. (2005). Effectiveness of phosvitin peptides on enhancing bioavailability of calcium and its accumulation in bones. *Food Chem.* 93, 577-583.
- Clare DA, Catignani GL, Swaisgood HE. (2003). Biodefense properties of milk: the role of antimicrobial proteins and peptides. *Curr. Pharm. Des.* 9, 1239-1255.
- Claustre, J.; Toumi, F.; Trompette, A.; Jourdan, G.; Guignard, H.; Chayvialle, J.A.; Plaisancie, P. (2002). Effects of peptides derived from dietary proteins on mucus secretion in rat jejunum. *Am. J. Physiol.* 283, G521-G528.
- Claeys, E.; De Smet, S.; Balcaen, A.; Raes, K.; Demeyer, D. (2004). Quantification of fresh meat peptides by SDS-PAGE in relation to ageing time and taste intensity. *Meat Sci.* 67, 281-288.
- Cornet, M.; Bousset, J. (1999). Free amino acids and dipeptides in porcine muscles: differences between 'red' and 'white' muscles. *Meat Sci.* 51, 215-219.
- Coste, M.; Rochet, V.; Léonil, J.; Molle, D.; Bouhallab, S.; Tomé, D. (1992). Identification of C-terminal peptides of bovine beta-casein that enhance proliferation of rat lymphocytes. *Immunol. Lett.* 33, 41-46.

- Creagh, E.M.; Martin, S.J. (2001). Caspases: cellular demolition experts. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 696-702.
- Crush, K.G. (1970). Carnosine and related substances in animal tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 34, 3-30.
- Cuber, J.C.; Bernard, G.; Fushiki, T.; Bernard, C.; Yamanishi, R.; Sugimoto, E.; Chayvialle, J.A. (1990). Luminal CCK-releasing factors in the isolated vascularly perfused rat duodenojejunum. *Am. J. Physiol.* 259, G191-G197.
- Daniel, H. (2004). Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu. Rev. Physiol.* 66, 361-384.
- Daniel, H.; Adibi, S.A. (1994). Functional separation of dipeptide transport and hydrolysis in kidney brush border membrane vesicles. *FASEB J.* 8, 753-759.
- Daniel, H.; Kottra, G. (2004). The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. *Pflugers Arch.* 447, 610-618.
- Daniel, H.; Vohwinkel, M.; Rehner, G. (1990). Effect of casein and beta-casomorphins on gastrointestinal motility in rats. *J. Nutr.* 120, 252-257.
- Darlak, K.; Benovitz, D.E.; Spatola, A.F.; Grzonka, Z. (1988). Dermorphin analogs: resistance to in vitro enzymatic degradation is not always increased by additional D-amino acid substitutions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156, 125-130.
- Davey, C.L. (1960). The significance of carnosine and anserine in striated skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 89, 303-308.
- Davies, K.J. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J. Biol. Chem.* 262, 9895-9901.
- Decker, E.A. (2001). The role of histidine-containing compounds of the buffering capacity of muscle. *Proceedings of the 54th Reciprocal Meat Conference* 161-164.
- Decker, E.A.; Xiong, Y.L.; Calvert, J.T.; Crum, A.D.; Blanchard, S.P. (1993). Chemical, Physical, and Functional Properties of Oxidized Turkey White Muscle Myofibrillar Proteins. *J. Agric. Food Chem.* 41, 186-189.
- Delbarre-Ladrat, C.; Chéret, R.; Taylor, R.; Verrez-Bagnis, V. (2006). Trends in postmortem aging in fish: understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46, 409-421.
- Delgado, E.F.; Geesink, G.H.; Marchello, J.A.; Goll, D.E.; Koohmaraie, M. (2001). The calpain system in three muscles of normal and callipyge sheep. *J. Anim. Sci.* 79, 398-412.
- Deneke, S.M.; Lynch, B.A.; Fanburg, B.L. (1985). Effects of low protein diets or feed restriction on rat lung glutathione and oxygen toxicity. *J. Nutr.* 115, 726-732.

- Dransfield, E. (1992). Optimisation of tenderisation, ageing and tenderness. *Proceedings of the 38<sup>th</sup> ICoMST*, 23-28 August, Clermont-Ferrand, France, 1, 71-78.
- Dröge, W.; Pottmeyer-Gerber, C.; Schmidt, H.; Nick, S. (1986). Glutathione augments the activation of cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Immunobiology* 172, 151-156.
- Drouet, L.; Bal dit Sollier, C.; Cisse, M.; Pignaud, G.; Mazoyer, E.; Fiat, A.M.; Jollès, P.; Caen, J.P. (1990). The antithrombotic effect of KRDS, a lactotransferrin peptide, compared with RGDS. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* 32, 59-62.
- Duarte, J.; Vinderola, G.; Ritz, B.; Perdigon, G.; Matar, C. (2006). Immunomodulating capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation. *Immunobiology* 211, 341-350.
- Dunajski, E. (1979). Texture of fish muscle. *J. Text. Stud.* 10, 301-318.
- Dziuba, J.; Minkiewicz, P.; Nalecz, D.; Iwaniak, A. (1999). Database of biologically active peptide sequences. *Nahrung-Food*, 43, 190-195.
- Eddy, E.P.; Wood, C.; Miller, J.; Wilson, G.; Hidalgo, I.J. (1995). A comparison of the affinities of dipeptides and antibiotics for the di-/tripeptide transporter in Caco-2 cells. *Int. J. Pharm.* 115, 79-86.
- Elitsur, Y.; Luk, G.D. (1991). Beta-casomorphin (BCM) and human colonic lamina propria lymphocyte proliferation. *Clin. Exp. Immunol.* 85, 493-497.
- Enquête INCA. (2000). Editions Tec & Doc.
- Erba, D.; Ciapellano, S.; Testolin, G. (2001). Effect of caseinphosphopeptides on inhibition of calcium intestinal absorption due to phosphate. *Nutr. Res.* 21, 649-656.
- Etherington, D.J. (1991). Enzymes in meat industry. In *Enzymes in Food Processing*. Tucker, G.A.; Woods, L.F. (Eds.). Blackie, London, pp. 128-160.
- Feidt, C.; Brun-Bellut, J.; Dransfield, E. (1998). Liberation of Peptides During Meat Storage and Their Interaction with Proteinase Activity. *Meat Sci.* 49, 223-231.
- Ferraretto, A.; Gravaghi, C.; Fiorilli, A.; Tettamanti, G. (2003). Casein-derived bioactive phosphopeptides: role of phosphorylation and primary structure in promoting calcium uptake by HT-29 tumor cells. *FEBS Lett.* 551, 92-98.
- Fiat, A.M.; Migliore-Samour, D.; Jollès, P. (1993). Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *J. Dairy Sci.* 73, (Supplement 1), 301-310.
- FitzGerald, R.J. (1998). Potential Uses of Caseinophosphopeptides. *Int. Dairy J.* 8, 451-457.
- FitzGerald, R.J.; Meisel, H. (2000). Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *Br. J. Nutr.* 84, S33-S37.

- Fitzgerald, R.J.; Murray, B.A.; Walsh, D.J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *J. Nutr.* 134, 980S-988S.
- Flores, M.; Moya, V.J.; Aristoy, M.M.; Toldrá, F. (2000). Nitrogen compounds as potential biochemical markers of pork meat quality. *Food Chem.* 69, 371-377.
- Fok, K.F.; Panzer-Knodle, S.G.; Nicholson, N.S.; Tjoeng, F.S.; Feigen, L.P.; Adams, S.P. (1991). Aminopeptidase resistant Arg-Gly-Asp analogs are stable in plasma and inhibit platelet aggregation. *Int. J. Pept. Protein Res.* 38, 124-130.
- Fosset, S.; Fromentin, G.; Gietzen, D.W.; Dubarry, M.; Huneau, J.F.; Antoine, J.M.; Lang, V.; Mathieu-Casseron, F.; Tomé, D. (2002). Peptide fragments released from Phe-caseinomacropetide in vivo in the rat. *Peptides* 23, 1773-1781.
- Fritz, J.D.; Greaser, M.L. (1991). Changes in titin and nebulin in postmortem bovine muscle revealed by gel electrophoresis, western blotting and immunofluorescence microscopy. *J. Food Sci.* 56, 607-610.
- Froetschel, M.A.; Azain, M.J.; Edwards, G.L.; Barb, C.R.; Amos, H.E. (2001). Opioid and cholecystokinin antagonists alleviate gastric inhibition of food intake by premeal loads of casein in meal-fed rats. *J. Nutr.* 131, 3270-3276.
- Fujita, H.; Sasaki, R.; Yoshikawa, M. (1995). Potentiation of the antihypertensive activity of orally administered ovokinin, a vasorelaxing peptide derived from ovalbumin, by emulsification in egg phosphatidylcholine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 2344-2345.
- Fujita, H.; Yokoyama, K.; Yoshikawa, M. (2000). Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *J. Food Sci.* 65, 564-569.
- Galea, C.A.; Dalrymple, B.P.; Kuypers, R.; Blakeley, R. (2000). Modification of the substrate specificity of porcine pepsin for the enzymatic production of bovine hide gelatin. *Protein Sci.* 9, 1947-1959.
- Ganapathy, V.; Leibach, F.H. (1999). Protein digestion and assimilation. In *Textbook of Gastroenterology*. YAMADA, T. (Ed.). Lippincott Williams & Wilkins, pp. 456-467.
- Ganapathy, V.; Miyauchi, S. (2005). Transport systems for opioid peptides in mammalian tissues. *AAPS J.* 7, E852-E856.
- Gangwar, S.; Pauletti, G.M.; Wang, B.H.; Siahaan, T.J.; Stella, V.J.; Borchardt, R.T. (1997). Prodrug strategies to enhance the intestinal absorption of peptides. *Drug Discov. Today* 2, 148-155.
- Gardner, M.L. (1988). Gastrointestinal absorption of intact proteins. *Annu. Rev. Nutr.* 8, 329-350.

- Gardner, L.L.G.; Illingworth, K.M.; Kelleher, J.; Wood, D. (1991). Intestinal absorption of the intact peptide carnosine in man, and comparison with intestinal permeability to lactulose. *J. Physiol.* 439, 411-422.
- Gaudichon, C.; Mahé, S.; Roos, N.; Benamouzig, R.; Luengo, C.; Huneau, J.F.; Sick, H.; Bouley, C.; Rautureau, J.; Tomé, D. (1995). Exogenous and endogenous nitrogen flow rates and level of protein hydrolysis in the human jejunum after [15N]milk and [15N]yoghurt ingestion. *Br. J. Nutr.* 74, 251-260.
- Gérard-Monnier, D.; Chaudière, J. (1996). Metabolism and antioxidant function of glutathione. *Pathol. Biol.* 44, 77-85.
- Gianelli, P.; Flores, M.; Moya, V.J.; Aristoy, M.C.; Toldrá, F. (2000). Effect of carnosine, anserine and other endogenous skeletal peptides on the activity of porcine muscle alanyl and arginyl aminopeptidases. *J. Food Biochem.* 24, 69-78.
- Gill, H.S.; Doull, F.; Rutherford, K.J.; Cross, M.L. (2000). Immunomodulatory peptides in bovine milk. *Br. J. Nutr.* 84, S111-S117.
- Gobbetti, M.; Minervini, F.; Rizzello, C.G. (2004). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *Inter. J. Dairy Technol.* 57, 173-188.
- Gopalakrishnan, J.; Decker, E.A.; Means, W.J. (1999). Antioxidant activity of mechanically separated pork extracts. *Meat Sci.* 52, 101-110.
- Green, B.D.; Mooney, M.H.; Gault, V.A.; Irwin, N.; Bailey, C.J.; Harriott, P.; Greer, B.; O'Harte, F.P.; Flatt, P.R. (2004). N-terminal His(7)-modification of glucagon-like peptide-1(7-36) amide generates dipeptidyl peptidase IV-stable analogues with potent antihyperglycaemic activity. *J. Endocrinol.* 180, 379-388.
- Guesdon, B.; Messaoudi, M.; Lefranc-Millot, C.; Fromentin, G.; Tomé, D.; Even, P.C. (2006). A tryptic hydrolysate from bovine milk alphaS1-casein improves sleep in rats subjected to chronic mild stress. *Peptides* 27, 1476-1482.
- Guitto, A.; Calderan, A.; Ruzza, P.; Borin, G. (2005). Carnosine and carnosine-related antioxidants: a review. *Curr. Med. Chem.* 12, 2293-2315.
- Guo, Z.; Zhang, Q.C.; Zou, H.F.; Guo, B.C.; Ni, J.Y. (2002). A method for the analysis of low-Mass molecules by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* 74, 1637-1641.
- Hagenbuch, B.; Meier, P.J. (2004). Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pfluegers Arch.* 447, 653-665.
- Hamm, R. (1977). Changes of muscle proteins during the heating of meat. In *Physical, chemical and biological changes in food caused by thermal processing*. Höyem, T.; Kvåle, O. (Eds.). Applied Science Publishing, pp. 101-134.
- Hardt, M.; Thomas, L.R.; Dixon, S.E.; Newport, G.; Agabian, N.; Prakobphol, A.; Hall, S.C.; Witkowska, H.E.; Fisher, S.J. (2005). Toward defining the human parotid gland

- salivary proteome and peptidome: identification and characterization using 2D SDS-PAGE, ultrafiltration, HPLC, and mass spectrometry. *Biochemistry* 44, 2885-2899.
- Harris, R.C.; Marlin, D.J.; Dunnett, M.; Snow, D.H.; Hultman, E. (1990). Muscle buffering capacity and dipeptide content in the thoroughbred horse, greyhound dog and man. *Comp. Biochem. Physiol. A* 97, 249-251.
- Harris, R.C.; Tallon, M.J.; Dunnett, M.; Boobis, L.; Coakley, J.; Kim, H.J.; Fallowfield, J.L.; Hill, C.A.; Sale, C.; Wise, J.A. (2006). The absorption of orally supplied beta-alanine and its effect on muscle carnosine synthesis in human vastus lateralis. *Amino Acids* 30, 279-289.
- Hasan, F.; Kitagawa, M.; Kumada, Y.; Hashimoto, N.; Shiiba, M.; Katoh, S.; Terashima, M. (2006). Production kinetics of ACE inhibitory peptides from bonito meat in artificial gastric juices. *Process. Biochem.* 41, 505-511.
- Hata, Y.; Yamamoto, M.; Ohni, M.; Nakajima, K.; Nakamura, Y.; Takano T. (1996). A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 64, 767-771.
- Hausch, F.; Shan, L.; Santiago, N.A.; Gray, G.M.; Khosla, C. (2002). Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am. J. Physiol.* 283, G996-G1003.
- Henschen, A.; Lottspeich, F.; Brantl, V.; Teschemacher, H. (1979) Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). II. Structure of active components from bovine casein peptone. *Hoppe Seylers Z Physiol. Chem.* 360, 1217-1224.
- Herrera-Mendez, C.H.; Becila, S.; Boudjellal, A.; Ouali, A. (2006). Meat ageing: reconsideration of the current concept. *Trends Food Sci. Technol.* 17, 394-405.
- Heyman, M.; Desjeux, J.F. (1992). Significance of intestinal food protein transport. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 15, 48-57.
- Hidalgo, I.J.; Bhatnagar, P.; Lee, C.P.; Miller, J.; Cucullino, G.; Smith, P.L. (1995). Structural requirements for interaction with the oligopeptide transporter in Caco-2 cells. *Pharm. Res.* 12, 317-319.
- Hipkiss A.R. (1998). Carnosine, a protective, anti-ageing peptide? *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 30, 863-868.
- Ho, C.Y.; Stromer, M.H.; Robson, R.M. (1994). Identification of the 30-Kda polypeptide in *post-mortem* skeletal-muscle as a degradation product of troponin-T. *Biochimie* 76, 369-375.
- Hopkins, D.L.; Thompson, J.M. (2002). Factors contributing to proteolysis and disruption of myofibrillar proteins and the impact on tenderisation in beef and sheep meat. *Aust. J. Agric. Res.* 53, 149-166.
- Hortin, G.L. (2006). The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. *Clin. Chem.* 52, 1223-1237.



- Hu, S.; Xie, Y.; Ramachandran, P.; Ogorzalek Loo, R.R.; Li, Y.; Loo, J.A.; Wong, D.T. (2005). Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry. *Proteomics* 5, 1714-1728.
- Huff-Lonergan, E.; Parrish, F.C.; Robson, R.M. (1995). Effects of postmortem aging time, animal age, and sex on degradation of Titin and Nebulin in bovine longissimus muscle. *J. Anim. Sci.* 73, 1064-1073.
- Hughes, M.C.; Kerry, J.P.; Arendt, E.K.; Kenneally, P.M.; McSweeney, P.L.H.; O'Neill, E.E. (2002). Characterization of proteolysis during the ripening of semi-dry fermented sausages. *Meat Sci.* 62, 205-216.
- Humphrey, S.P.; Williamson, R.T. (2001). A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J. Prosthet. Dent.* 85, 162-169.
- Hunter, E.B.; Powers, S.P.; Kost, L.J.; Pinon, D.I.; Miller, L.J.; LaRusso, N.F. (1990). Physicochemical determinants in hepatic extraction of small peptides. *Hepatology* 12, 76-82.
- Irie, M.; Terada, T.; Okuda, M.; Inui, K. (2004). Efflux properties of basolateral peptide transporter in human intestinal cell line Caco-2. *Pflugers Arch.* 449, 186-194.
- Jackson, M.C.; Kucera, C.M.; Lenney, J.F. (1991). Purification and properties of human serum carnosinase. *Clinica Chimica Acta* 196, 193-205.
- Jiang, B.; Mine, Y. (2001). Phosphopeptides derived from hen egg yolk phosvitin: effect of molecular size on the calcium-binding properties. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 1187-1190.
- Johnson, P.; Fedyna, J.S.; Schindzielorz, A.; Smith, C.M.; Kasvinsky, P.J. (1982). Regulation of muscle phosphorylase activity by carnosine and anserine. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 109, 769-775.
- Johnson, P.; Hammer, J.L. (1989). Effects of L-1-methyl-histidine and the muscle dipeptides carnosine and anserine on the activities of muscle calpains. *Comp. Biochem. Physiol. B* 94, 45-48.
- Jollès, P.; Levy-Toledano, S.; Fiat, A.M.; Soria, C.; Gillessen, D.; Thomaidis, A.; Dunn, F.W.; Caen, J.P. (1986). Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from kappa-casein on platelet function. *Eur. J. Biochem.* 158, 379-382.
- Jung, W.K.; Kim, S.K. (2006). Calcium-binding peptide derived from pepsinolytic hydrolysates of hoki (*Johnius belengerii*) frame. *Eur. Food Res. Technol.* (in press).
- Kageyama, T. (2002). Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 288-306.
- Kan, B.; London, I.M.; Levin, D.H. (1988). Role of reversing factor in the inhibition of

- protein synthesis initiation by oxidized glutathione. *J. Biol. Chem.* 263, 15652-15656.
- Karaki, H.; Doi, K.; Sugano, S.; Uchiwa, H.; Sugai, R.; Murakami, U.; Takemoto, S. (1990). Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 96, 367-371.
- Kaspari, A.; Diefenthal, T.; Grosche, G.; Schierhorn, A.; Demuth, H.U. (1996). Substrates containing phosphorylated residues adjacent to proline decrease the cleavage by proline-specific peptidases. *Biochem. Biophys. Acta* 1293, 147-153.
- Katayama, K.; Tomatsu, M.; Fuchu, H.; Sugiyama, M.; Kawahara, S.; Yamauchi, K.; Kawamura, Y.; Muguruma, M. (2003). Purification and characterization of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from porcine troponin C. *Anim. Sci. J.* 74, 53-58.
- Kawasaki, Y.; Isoda, H.; Tanimoto, M.; Dosako, S.; Idota, T.; Ahiko, K. (1992). Inhibition by lactoferrin and kappa-casein glycomacropeptide of binding of Cholera toxin to its receptor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 195-198.
- Kayser, H.; Meisel, H. (1996). Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Lett.* 383, 18-20.
- Kilara, A.; Panyam, D. (2003). Peptides from milk proteins and their properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43, 607-633.
- Kim, S.K.; Byun, H.G.; Park, P.J.; Shahidi, F. (2001). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2992-2997.
- Kjærsgård, I.V.H.; Jessen, F. (2004). Oxidation of proteins in rainbow trout muscle. *Proceedings of the 34<sup>th</sup> WEFTA meeting*, 12-15<sup>th</sup> September, Lübeck, Germany, 186.
- Klee, W. A.; Zioudrou, C.; Straetly, R.A. (1978). Exorphin peptides with opioid activity isolated from wheat gluten and their possible role in the etiology of schizophrenia. In: *Endorphins in Mental Health research* (Usdin E.; Bunney, W.E.; Kline, N.S.; Eds). MacMillan, New York, pp. 209-218.
- Kobayashi, D.; Nozawa, T.; Imai, K.; Nezu, J.; Tsuji, A.; Tamai, I. (2003). Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 703-708.
- Kohen, R.; Yamamoto, Y.; Cundy, K.C.; Ames, B.N. (1988). Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 3175-3179.
- Kohmura, M.; Nio, N.; Kubo, K.; Minoshima, Y.; Munekata, E.; Ariyoshi, H. (1989). Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptides of human beta-casein. *Agric. Biol. Chem.* 53, 2107-2114.
- Konno, T.; Kamatari, Y.O.; Tanaka, N.; Kamikubo, H.; Dobson, C.M.; Nagayama, K. (2000). A partially unfolded structure of the alkaline-denatured state of pepsin and its

- implication for stability of the zymogen-derived protein. *Biochemistry*, 39, 4182-4190.
- Koohmaraie, M.; Whipple, G.; Kretchmar, D.H.; Crouse, J.D.; Mersmann, H.J. (1991). Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *J. Anim. Sci.* 69, 617-624.
- Korhonen, H.; Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides--opportunities for designing future foods. *Curr. Pharm. Des.* 9, 1297-1308.
- Lahov, E.; Regelson, W. (1996). Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food Chem. Toxicol.* 34, 131-145.
- Lametsch, R.; Roepstorff, P.; Bendixen, E. (2002). Identification of protein degradation during post-mortem storage of pig meat. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5508-5512.
- Langguth, P.; Bohner, V.; Heizmann, J.; Merkle, H.P.; Wolffram, S.; Amidon, G.L.; Yamashita, S. (1997). The challenge of proteolytic enzymes in intestinal peptide delivery. *J. Control. Release* 46, 39-57.
- Lawrie, R.A. (1998). The conversion of muscle to meat. In *Lawrie's Meat Science*, 6<sup>th</sup> edition. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, pp. 96-118.
- Ledoux-Rolf Pedersen, N.; Nagain-Domaine, C.; Mahé, S.; Chariot, J.; Rozé, C.; Tomé, D. (2000). Caseinomacropeptide specifically stimulates exocrine pancreatic secretion in the anesthetized rat. *Peptides* 21, 1527-1535.
- Lee, D.H.; Kim, J.H.; Park, J.S.; Choi, Y.J.; Lee, J.S. (2004). Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides* 25, 621-627.
- Lenney, J.F. (1976). Specificity and distribution of mammalian carnosinase. *Biochim. Biophys. Acta* 429, 214-219.
- Léonil, J.; Mollé, D. (1990). Liberation of tryptic fragments from caseinomacropeptide of bovine kappa-casein involved in platelet function. *Kinetic study. Biochem J.* 271, 247-252.
- Li, J.; Tamura, K.; Lee, C.P.; Smith, P.L.; Borchardt, R.T.; Hidalgo, I.J. (1998). Structure-affinity relationships of Val-Val and Val-Val-Val stereoisomers with the apical oligopeptide transporter in human intestinal Caco-2 cells. *J. Drug Target* 5, 317-327.
- Li, Y.; Tomé, D.; Desjeux, J.F. (1989). Indirect effect of casein phosphopeptides on calcium absorption in rat ileum in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.* 29, 227-33.
- Liu, G.; Xiong, Y.L. (1996). Contribution of lipid and protein oxidation to rheological differences between chicken white and red muscle myofibrillar proteins. *J. Agric. Food Chem.* 44, 779-784.
- Lister, N.; Sykes, A.P.; Bailey, P.D.; Boyd, C.A.; Bronk, J.R. (1995). Dipeptide transport and hydrolysis in isolated loops of rat small intestine: effects of stereospecificity. *J.*

- Physiol.* 484, 173-182.
- Lochs, H.; Williams, P.E.; Morse, E.L.; Abumrad, N.N.; Adibi, S.A. (1988). Metabolism of dipeptides and their constituent amino acids by liver, gut, kidney, and muscle. *Am. J. Physiol.* 254, E588-E594.
- Loukas, S.; Varoucha, D.; Zioudrou, C.; Streaty, R.A.; Klee, W.A. (1983). Opioid activities and structures of alpha-casein-derived exorphins. *Biochemistry* 22, 4567-4573.
- Lovati, M.R.; Manzoni, C.; Gianazza, E.; Arnoldi, A.; Kurowska, E.; Carroll, K.K.; Sirtori, C.R. (2000). Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells. *J. Nutr.* 130, 2543-2549.
- Ma, M.S.; Bae, I.Y.; Lee, H.G.; Yang, C.B. (2006). Purification and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Food Chem.* 96, 36-42.
- Mac Bride, M.A.; Parrish, F.C. (1977). The 30 000-dalton component of tender bovine longissimus muscle. *J. Food Sci.* 42, 1627-1629.
- Maeno, M.; Yamamoto, N.; 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.
- Mahé, S.; Roos, N.; Benamouzig, R.; Sick, H.; Baglieri, A.; Huneau, J.F.; Tomé, D. (1994). True exogenous and endogenous nitrogen fractions in the human jejunum after ingestion of small amounts of <sup>15</sup>N-labeled casein. *J. Nutr.* 124, 548-555.
- Marczak, E.D.; Ohinata, K.; Lipkowski, A.W.; Yoshikawa, M. (2006). Arg-Ile-Tyr (RIY) derived from rapeseed protein decreases food intake and gastric emptying after oral administration in mice. *Peptides* 27, 2065-2068.
- Marczak, E.D.; Usui, H.; Fujita, H.; Yang, Y.J.; Yokoo, M.; Lipkowski, A.W.; Yoshikawa, M. (2003). New antihypertensive peptides isolated from rapeseed. *Peptides* 24, 791-798.
- Mårtensson, J.; Meister, A. (1989). Mitochondrial damage in muscle occurs after marked depletion of glutathione and is prevented by giving glutathione monoester. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86, 471-475.
- Martinaud, A.; Mercier, Y.; Marinova, P.; Tassy, C.; Gatellier, P.; Renerre, M. (1997). Comparison of oxidative processes on myofibrillar proteins from beef during maturation and by different model oxidation systems. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2481-2487.
- Maruyama, S.; Nakagomi, K.; Tomizuka, N.; Suzuki, H. (1985). Angiotensin I converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic Hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.* 49, 1405-1409.

- Maruyama, S.; Mitachi, H.; Awaka, J.; Kurono, M.; Tomizuka, N.; Suzuki, H. (1987). Angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of  $\alpha$ S1-casein. *Agric. Biol. Chem.* 51, 1581-1586.
- Maruyama, S.; Miyoshi, S.; Kaneko, T.; Tanaka, H. (1989). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of synthetic peptides related to the tandem repeated sequence of a maize endosperm protein. *Agric. Biol. Chem.* 53, 1077-1081.
- Maruyama, S.; Suzuki, H. (1982). A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.* 46, 1393-1394.
- Masuda, O.; Nakamura, Y.; 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, 3063-3068.
- Matar, C.; Amiot, J.; Savoie, L.; Goulet, J. (1996). The Effect of Milk Fermentation by *Lactobacillus helveticus* on the Release of Peptides During In Vitro Digestion. *J. Dairy Sci.* 79, 971-979.
- Matés, J.M.; Sánchez-Jiménez, F. (1999). Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front. Biosci.* 4, d339-345.
- Matsufuji, H.; Matsui, T.; Seki, E.; Osajima, K.; Nakashima, M.; Osajima, Y. (1994). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolyzate derived from sardine muscle. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 2244-2245.
- Matsui, T.; Li, C.H.; Osajima, Y. (1999). Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I-converting enzyme inhibition from wheat germ. *J. Pept. Sci.* 5, 289-297.
- Matsui, T.; Tamaya, K.; Seki, E.; Osajima, K.; Matsumoto, K.; Kawasaki, T. (2002). Val-Tyr as a natural antihypertensive dipeptide can be absorbed into the human circulatory blood system. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29, 204-208.
- Matsui, T.; Yukiyoishi, A.; Doi, S.; Sugimoto, H.; Yamada, H.; Matsumoto, K. (2002). Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR. *J. Nutr. Biochem.* 13, 80-86.
- Matsumura, N.; Fujii, M.; Takeda, Y.; Sugita, K.; Shimizu, T. (1993). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels autolysate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57, 695-697.
- Matthews, D.M. (1975). Absorption of peptides by mammalian intestine. In *Peptide transport in protein nutrition*. Matthews, D.M.; Payne, J.W. (Eds.), North Holland, Amsterdam, pp. 61-146.
- Matthews, D.M. (1991). *Protein absorption: development and present state of the subject*. Wiley-Liss, New York.
- Matthews, D.M.; Adibi, S.A. (1976). Peptide absorption. *Gastroenterology* 71, 151-161.

- Maubois, J. L.; Léonil, J. (1989). Peptides du lait à activité biologique. *Le Lait* 69, 245-269.
- Maynard, L.M.; Boissonneault, G.A.; Chow, C.K.; Bruckner, G.G. (2001). High levels of dietary carnosine are associated with increased concentrations of carnosine and histidine in rat soleus muscle. *J. Nutr.* 131, 287-290.
- McDonagh, D.; FitzGerald, R.J. (1998). Production of Caseinophosphopeptides (CPPs) from Sodium Caseinate Using a Range of Commercial Protease Preparations. *Int. Dairy J.* 8, 39-45.
- Meisel, H. (1986). Chemical characterization and opioid activity of an exorphin isolated from in vivo digests of casein. *FEBS Lett.* 196, 223-227.
- Meisel, H. (1998). Overview on milk protein-derived peptides. *Int. Dairy J.* 8, 363-373.
- Meisel, H.; Bernard, H.; Fairweather-Tait, S.; Fitzgerald, R.J.; Hartmann, R.; Lane, C.N.; McDoangh, D.; Teucher, B.; Wal, J.M. (2003). Detection of caseinophosphopeptides in the distal ileostomy fluid of human subjects. *Br. J. Nutr.* 89, 351-358.
- Meisel, H.; Fitzgerald, R.J. (2003). Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr. Pharm. Des.* 9, 1289-1295.
- Meister, A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 263, 17205-17208.
- Mellander, O. (1950). The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. II. Peroral calcium dosage of infants. *Acta Soc Med Ups.* 55, 247-55.
- Meredith, D.; Temple, C.S.; Guha, N.; Sword, C.J.; Boyd, C.A.; Collier, I.D.; Morgan, K.M.; Bailey, P.D. (2000). Modified amino acids and peptides as substrates for the intestinal peptide transporter PepT1. *Eur. J. Biochem.* 267, 3723-3728.
- Messaoudi, M.; Lefranc-Millot, C.; Desor, D.; Demagny, B.; Bourdon, L. (2005). Effects of a tryptic hydrolysate from bovine milk alphaS1-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.; Papadopoulos, V.; Boujrad, N.; Vanderesse, R.; Boudier, J.F.; Desor, D.; Linden, G.; Gaillard, J.L. (2001). Characterization of alpha-casozepine, a tryptic peptide from bovine alpha(s1)-casein with benzodiazepine-like activity. *FASEB J.* 15, 1780-1782.
- Migliore-Samour, D.; Floc'h, F.; Jollès, P. (1989). Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation. *J. Dairy Res.* 56, 357-362.
- Miyoshi, S.; Ishikawa, H.; Kaneko, T.; Fukui, F.; Tanaka, H.; Maruyama, S. (1991). Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an alpha-zein Hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.* 55, 1313-1318.

- Morzel, M.; Chambon, C.; Hamelin, M.; Santé-Lhoutellier, V.; Sayd, T.; Monin, G. (2004). Proteome changes during pork meat ageing following use of two different pre-slaughter handling procedures. *Meat Sci.* 67, 689-696.
- Morzel, M.; Gatellier, P.; Sayd, T.; Renerre, M.; Laville, E. (2006). Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *Meat Sci.* 73, 536-543.
- Moskowitz, D.W. (2003). Is 'somatic' angiotensin-I-converting enzyme a mechanosensor? *Diabetes Technol. Ther.* 4, 841-858.
- Mullen, A.M.; Stoeva, S.; Laib, K.; Gruebler, G.; Voelter, W.; Troy, D.J. (2000). Preliminary analysis of amino acids at various locations along the *M*-Longissimus dorsi in aged beef. *Food Chem.* 69, 461-465.
- Muroya, S.; Nakajima, I.; Chikuni, K. (2003). Amino acid sequences of multiple fast and slow troponin T isoforms expressed in adult bovine skeletal muscles. *J. Anim. Sci.* 81, 1185-1192.
- Nagasawa, T.; Yonekura, T.; Nishizawa, N.; Kitts, D.D. (2001). In vitro and in vivo inhibition of muscle lipid and protein oxidation by carnosine. *Mol. Cell. Biochem.* 225, 29-34.
- Nakamura, Y.; Yamamoto, N.; Sakai, K.; Okubo, A.; Yamazaki, S.; Takano, T. (1995). Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci.* 78, 777-783.
- Nedjar-Arroume, N.; Dubois-Delval, V.; Miloudi, K.; Daoud, R.; Krier, F.; Kouach, M.; Briand, G.; Guillochon, D. (2006). Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. *Peptides* 27, 2082-2089.
- Neeser, J.R.; Chambaz, A.; Del Vedovo, S.; Prigent, M.J.; Guggenheim, B. (1988). Specific and nonspecific inhibition of adhesion of oral actinomyces and streptococci to erythrocytes and polystyrene by caseinoglycopeptide derivatives. *Infect. Immun.* 56, 3201-3208.
- Némoz-Gaillard, E.; Bernard, C.; Abello, J.; Cordier-Bussat, M.; Chayvialle, J.A.; Cuber, J.C. (1998). Regulation of cholecystokinin secretion by peptones and peptidomimetic antibiotics in STC-1 cells. *Endocrinology* 139, 932-938.
- Neufer, P.D.; Benjamin, I.J. (1996). Differential expression of  $\alpha$ B-crystallin and Hsp27 in skeletal muscle during continuous contractile activity. Relationship to myogenic regulatory factors. *J. Biol. Chem.* 271, 24089-24095.
- Neyraud, E.; Sayd, T.; Morzel, M.; Dransfield, E. (2006). Proteomic Analysis of Human Whole and Parotid Salivas Following Stimulation by Different Tastes. *J. Proteome Res.* 5, 2474-2480
- Nielsen, C.U.; Supuran, C.T.; Scozzafava, A.; Frokjaer, S.; Steffansen, B.; Brodin, B. (2002). Transport characteristics of L-carnosine and the anticancer derivative 4-

- toluenesulfonylureido-carnosine in a human epithelial cell line. *Pharm. Res.* 19, 1337-1344.
- Nishi, T.; Hara, H.; Hira, T.; Tomita F. (2001). Dietary protein peptic hydrolysates stimulate cholecystinin release via direct sensing by rat intestinal mucosal cells. *Exp. Biol. Med.* 226, 1031-1036.
- Nishi, T.; Hara, H.; Asano, K.; Tomita, F. (2003). The soybean beta-conglycinin beta 51-63 fragment suppresses appetite by stimulating cholecystinin release in rats. *J. Nutr.* 133, 2537-2542
- Nishimura, T.; Kato, H. (1988). Taste of free amino acids and peptides. *Food Rev. Int.* 4, 175-194.
- Nozawa, T.; Imai, K.; Nezu, J.; Tsuji, A.; Tamai, I. (2004). Functional characterization of pH-sensitive organic anion transporting polypeptide OATP-B in human. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, 438-445.
- Ofstad, R.; Kidman, S.; Hermansson, A.M. (1996). Ultramicroscopical structures and liquid loss in heated cod (*Gadus morhua* L.) and salmon (*Salmo salar*) muscle. *J. Sci. Food Agric.* 72, 337-347.
- Okumu, F.W.; Pauletti, G.M.; Vander Velde, D.G.; Siahaan, T.J.; Borchardt, R.T. (1995). The effect of conformational flexibility on the permeability of a hexapeptide across monolayers of a cultured human intestinal cell (Caco-2 cells). *Pharm. Res.* 12, S-302.
- Okumura, T.; Yamada, R.; Nishimura, T. (2003). Survey of conditioning indicators for pork loins: changes in myofibrils, proteins and peptides during postmortem conditioning of vacuum-packed pork loins for 30 days. *Meat Sci.* 64, 467-473.
- Okumura, T.; Yamada, R.; Nishimura, T. (2004). Sourness-suppressing peptides in cooked pork loins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1657-1662.
- Ondetti, M.A.; Williams, N.J.; Sabo, E.F.; Pluscec, J.; Weaver, E.R.; Kocy, O. (1971). Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure, and synthesis. *Biochemistry* 10, 4033-4039.
- Ono, S.; Hosokawa, M.; Miyashita, K.; Takahashi, K. (2003). Isolation of peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory effect derived from hydrolysate of upstream chum salmon muscle. *J. Food Sci.* 68, 1611-1614.
- Oshima, G.; Shimabukuro, H.; Nagasawa, K. (1979). Peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. *Biochim. Biophys. Acta.* 566, 128-137.
- Otani, H.; Monnai, M.; Kawasaki, Y.; Kawakami, H.; Tanimoto, M. (1995). Inhibition of mitogen-induced proliferative responses of lymphocytes by bovine kappa-caseinoglycopeptides having different carbohydrate chains. *J. Dairy Res.* 62, 349-357.



- Ouali, A. (1992). Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development. *Biochimie* 74, 251-265.
- Papa, I.; Alvarez, C.; Verrez-Bagnis, V.; Fleurence, J.; Benyamin, Y. (1996). Post mortem release of fish white muscle alpha-actinin as a marker of disorganisation. *J. Sci. Food Agric.* 72, 63-70.
- Papa, I.; Taylor, R.G.; Astier, C.; Ventre, F.; Lebart, M.C.; Roustan, C.; Ouali, A.; Benyamin, Y. (1997). Dystrophin cleavage and sarcolemma detachment are early post mortem changes on pass (*Dicentrarchus labrax*) white muscle. *J. Food Sci.* 62, 917-921.
- Pappenheimer, J.R.; Dahl, C.E.; Karnovsky, M.L.; Maggio, J.E. (1994). Intestinal absorption and excretion of octapeptides composed of D amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91, 1942-1945.
- Park, Y.J.; Volpe, S.L.; Decker, E.A. (2005). Quantitation of carnosine in humans plasma after dietary consumption of beef. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4736-4739.
- Pedroche, J.; Ysut, M.; Giron-calle, J.; Alaiz, M.; Millan, F.; Vioque, J. (2002). Utilisation of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *J. Sci. Food Agri.* 82, 960-965.
- Pellegrini, A. (2003). Antimicrobial peptides from food proteins. *Curr. Pharm. Des.* 9, 1225-1238.
- Pérès, J.M.; Bouhallab, S.; Bureau, F.; Maubois, J.L.; Arthan, P.; Bouglé, D. (1997). Absorption digestive du fer lié au caséinophosphopeptide 1-25 de la bêta-caséine. *Le Lait* 77, 433-440.
- Pérès, J.M.; Bouhallab, S.; Bureau, F.; Neuville, D.; Maubois, J.L.; Devroede, G.; Arhan, P.; Bouglé, D. (1999). Mechanisms of absorption of caseinophosphopeptide bound iron. *J. Nutr. Biochem.* 10, 215-222.
- Picot, L.; Bordenave, S.; Didelot, S.; Fruitier-Arnaudin, I.; Sannier, F.; Thorkelsson, G.; Bergé, J.P.; Guérard, F.; Chabeaud, A.; Pio, J.M. (2006). Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochem.* 41, 1217-1222.
- Pihlanto-Leppälä, A. (2001). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory. *Trends Food Sci. Technol.* 11, 347-356.
- Pospiech, E.; Greaser, M.L.; Mikolajczak, B.; Chiang, W.; Krzywdzińska, M. (2002). Thermal properties of titin from porcine and bovine muscles. *Meat Sci.* 62, 187-192.
- Prockop, D.J.; Keiser, H.R.; Sjoerdsma, A. (1962). Gastrointestinal absorption and renal excretion of hydroxyproline peptides. *Lancet* 2, 527-528.

- Purchas, R.W.; Busboom, J. (2005). The effect of production system and age on levels of iron, taurine, carnosine, coenzyme q(10), and creatine in beef muscles and liver. *Meat Sci.* 70, 589-596.
- Purchas, R.W.; Rutherford, S.M.; Pearce, P.D.; Vather, R.; Wilkinson, B.H.P. (2004). Cooking temperature effects on the forms of iron and levels of several other compounds in beef semitendinosus muscle. *Meat Sci.* 68, 201-207.
- Raha, S.; Dosquet, C.; Abgrall, J.F.; Jollès, P.; Fiat, A.M.; Caen, J.P. (1988). KRDS--a tetrapeptide derived from lactotransferrin--inhibits binding of monoclonal antibody against glycoprotein IIb-IIIa on ADP-stimulated platelets and megakaryocytes. *Blood* 72, 172-178.
- Rao, M.V.; Gault, N.F.S. (1989). The influence of fiber-type composition and associated biochemical characteristics on the acid buffering capacities of several beef muscles. *Meat Sci.* 26, 5-18.
- Rémond, D.; Bernard, L.; Poncet, C. (2000). Free and peptide amino acid net flux across the rumen and the mesenteric- and portal-drained viscera of sheep. *J. Anim. Sci.* 78, 1960-1972.
- Rémond, D.; Bernard, L.; Chauveau, B.; Nozière, P.; Poncet, C. (2003). Digestion and nutrient net fluxes across the rumen, and the mesenteric- and portal-drained viscera in sheep fed with fresh forage twice daily: net balance and dynamic aspects. *Br. J. Nutr.* 89, 649-666
- Rérat, A.; Corring, T.; Laplace, J.P. (1976). Protein digestion and absorption. In *Protein metabolism and nutrition*. Cole, D.J.A.; Boorman, K.N.; Buttery, P.J.; Lewis, D.; Neale, R.J.; Swaned, H (Eds.). Butterworks, Londres, 97-138.
- Reynès, C.; Sabatier, R.; Molinari, N.; Lehman, S. (2005). Recherche de pics discriminants pour des spectres SELDI-ToF par algorithme génétique. *1<sup>er</sup> congrès commun de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique (SFEAP) - Société Française de Spectrométrie de Masse (SFSM)*, 26-29 Septembre, Montpellier, France.
- Richter, R.; Schulz-Knappe, P.; Schrader, M.; Standker, L.; Jurgens, M.; Tammen, H.; Forssmann, W.G. (1999). Composition of the peptide fraction in human blood plasma: database of circulating human peptides. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 726, 25-35.
- Ririe, D.G.; Roberts, P.R.; Shouse, M.N.; Zaloga, G.P. (2000). Vasodilatory actions of the dietary peptide carnosine. *Nutrition* 16, 168-172.
- Robert, N.; Briand, M.; Taylor, R.; Briand, Y. (1999). The effect of proteasome on myofibrillar structures in bovine skeletal muscle. *Meat Sci.* 51, 149-153.
- Rochdi, A.; Bonnet, M.; Kopp, J. (1985). Dénaturation du collagène musculaire au cours du chauffage : Incidence de la restriction des fibres sur la concentration et le degré de dénaturation. *Sci. Alim.* 5, 293-298.

- Roepstorff, P.; Fohlman, J. (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* 11, 601-609.
- Rouzer, C.A.; Scott, W.A.; Hamill, A.L.; Liu, F.T.; Katz, D.H.; Cohn, Z.A. (1982). Secretion of leukotriene C and other arachidonic acid metabolites by macrophages challenged with immunoglobulin E immune complexes. *J. Exp. Med.* 156, 1077-1086.
- Rowe, L.J.; Maddock, K.R.; Lonergan, S.M.; Huff-Lonergan, E. (2004). Oxidative environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of  $\mu$ -calpain. *J. Anim. Sci.* 82, 3254-3266.
- Rutherford-Markwick, K.J.; Moughan, P.J. (2005). Bioactive peptides derived from food. *J. AOAC Int.* 88, 955-966.
- Sakate, M.; Enjoh, M.; Nakamura, Y.; Takano, T.; Kawamura, Y.; Arai, S.; Shimizu, M. (2002). Transepithelial transport of the bioactive tripeptide, Val-Pro-Pro, in human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 378-384.
- Sandré, C.; Gleizes, A.; Forestier, F.; Gorges-Kergot, R.; Chilmonczyk, S.; Léonil, J.; Moreau, M.C.; Labarre, C. (1986). A peptide derived from bovine beta-casein modulates functional properties of bone marrow-derived macrophages from germfree and human flora-associated mice. *J. Nutr.* 131, 2936-2942.
- Sato, K.; Guo, Y.H.; Feng, J.; Sugiyama, S.; Ichinomiya, M.; Tsukamasa, Y.; Minegishi, Y.; Sakata, A.; Komiya, K.; Yamasaki, Y.; Nakamura, Y.; Ohtsuki, K.; Kawabata, M. (1998). Direct fractionation of proteins in particle-containing feedstocks by a filter paper pieces-based DEAE-cellulose column chromatography: Rapid, robust and low-cost capturing procedure for protein. *J. Chromatogr. A* 811, 69-76.
- Sato, M.; Hosokawa, T.; Yamaguchi, T.; Nakano, T.; Muramoto, K.; Kahara, T.; Funayama, K.; Kobayashi, A.; Nakano, T. (2002). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from wakame (*Undaria pinnatifida*) and their antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6245-6252.
- Sato, R.; Noguchi, T.; Naito, H. (1986). Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine. *J. Nutr. Sc. Vitaminol.* 32, 67-76.
- Sato, R.; Shindo, M.; Gunshin, H.; Noguchi, T.; Naito, H. (1991). Characterization of phosphopeptide derived from bovine beta-casein: an inhibitor to intra-intestinal precipitation of calcium phosphate. *Biochim. Biophys. Acta.* 1077, 413-415.
- Sayd, T.; Chambon, C.; Reynès, C.; Morzel, M.; Engell, E.; Laville, E. (2006). Comparaison de profils peptidiques massiques issus d'exsudats de viande par spectrométrie de masse MALDI-ToF. 23<sup>èmes</sup> Journées Françaises de Spectrométrie de Masse, 11-14 Septembre 2006, Nantes, France.

- Scanff, P.; Savalle, B.; Miranda, G.; Pelissier, J.P.; Guilloteau, P., Toullec, R. (1990). In vivo Gastric Digestion of Milk Proteins - Effect of Technological Treatments. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1623-1629.
- Scheler, C.; Li, X.P., Salnikow, J.; Dunn, M.J.; Jungblut, P.R. (1999). Comparison of two-dimensional electrophoresis pattern of heat shock protein Hsp27 species in normal and cardiomyopathic hearts. *Electrophoresis* 20, 3623-3628.
- Schmitz, J.; Triadou, N. (1982). Digestion et absorption intestinale des peptides. *Gastroentérol. Clin. Biol.* 6, 651-661.
- Schrader, M.; Schulz-Knappe, P. (2001). Peptidomics technologies for human body fluids. *Trends Biotechnol.* 19, S55-S60.
- Schulte, I.; Tammen, H.; Selle, H.; Schulz-knappe, P. (2005). Peptides in body fluids and tissues as markers of disease. *Rev. Mol. Diagn.* 5, 145-157.
- Sentandreu, M.A.; Coulis, G.; Ouali, A. (2002). Role of endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends Food Sci. Technol.* 13, 400-421.
- Sentandreu, M.A.; Toldrá, F. (1998). Biochemical properties of dipeptidyl peptidase III purified from porcine skeletal muscle. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3977-3984.
- Sentandreu, M.A.; Toldrá, F. (2000). Purification and biochemical properties of dipeptidyl peptidase I purified from porcine skeletal muscle. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5014-5022.
- Sentandreu, M.A.; Toldrá, F. (2001). Dipeptidyl peptidase IV from porcine skeletal muscle: purification and biochemical properties. *Food Chem.* 75, 159-168.
- Sentandreu, M.A.; Toldrá, F. (2007). Evaluation of ACE inhibitory activity of dipeptides generated by the action of porcine muscle dipeptidyl peptidases. *Food Chem.* 101, 1629-1633.
- Seppo, L.; Jauhiainen, T.; Poussa, T.; Korpela, R. (2003). A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, (2), 326-330.
- Sforza, S.; Pigazzani, A.; Motti, M.; Porta, C.; Virgili, R.; Galaverna, G.; Dossena, A.; Marchelli, R. (2001). Oligopeptides and free amino acids in Parma hams of known cathepsin B activity. *Food Chem.* 75, 267-273.
- Shen, W.C.; Wan, J.; Ekrami, H. (1992). Means to enhance penetration: Enhancement of polypeptide and protein absorption by macromolecular carriers via endocytosis and transcytosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 8, 93-113.
- Shimizu, M. (1999). Modulation of intestinal functions by food substances. *Nahrung-Food* 43, 154-158.
- Shimizu, M. (2004). Food-derived peptides and intestinal functions. *BioFactors* 21, 43-47.

- Shimizu, M.; Tsunogai, M.; Arai, S. (1997). Transepithelial transport of oligopeptides in the human intestinal cell, Caco-2. *Peptides* 18, 681-687.
- Silva, S.V.; Malcata, F.X. (2005). Caseins as source of bioactive peptides. *Int. Dairy J.* 15, 1-15.
- Smacchi, E.; Gobetti, M. (2000). Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiol.* 17, 129-141.
- Snyder, S.H. (1980). Brain peptides as neurotransmitters. *Science* 209, 976-983.
- Sorimachi, H.; Tsukahara, T.; Okada-Ban, M.; Sugita, H.; Ishiura, S.; Suzuki, K. (1995). Identification of a third ubiquitous calpain species--chicken muscle expresses four distinct calpains. *Biochim. Biophys. Acta.* 1261, 381-393.
- Spanier, A.M.; Edwards, J.V.; Dupuy, H.P. (1988). The warmed-over flavor process in beef: a study of meat proteins and polypeptides. *Food Technol.* 42, 110-118.
- Spanier, A.M.; McMillin, K.W.; Miller, J.A. (1990). Enzyme activity levels in beef: effect of postmortem aging and end-point cooking temperature. *J. Food Sci.* 55, 318-322.
- Stadtman, E.R. (1990). Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic. Biol. Med.* 9, 315-325.
- Steffansen, B.; Nielsen, C.U.; Brodin, B.; Eriksson, A.H.; Andersen, R.; Frokjaer, S. (2004). Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. *Eur. J. Pharm. Sci.* 21, 3-16.
- Stoeva, S.; Byrne, C.E.; Mullen, A.M.; Troy, D.J.; Voelter, W. (2000). Isolation and identification of proteolytic fragments from TCA soluble extracts of bovine M-Longissimus dorsi. *Food Chem.* 69, 365-370.
- Su, C.M.; Jensen, L.R.; Heimer, E.P.; Felix, A.M.; Pan, Y.C.; Mowles, T.F. (1991). In vitro stability of growth hormone releasing factor (GRF) analogs in porcine plasma. *Horm. Metab. Res.* 23, 15-21.
- Suthanthiran, M.; Anderson, M.E.; Sharma, V.K.; Meister, A. (1990). Glutathione Regulates Activation-Dependent DNA Synthesis in Highly Purified Normal Human T Lymphocytes Stimulated via the CD2 and CD3 Antigens. *PNAS* 87, 3343-3347.
- Suzuki, Y.; Nakao, T.; Maemura, H.; Sato, M.; Kamahara, K.; Morimatsu, F.; Takamatsu, K. (2006). Carnosine and anserine ingestion enhances contribution of nonbicarbonate buffering. *Med. Sci. Sports Exerc.* 38, 334-338.
- Svedberg, J.; de Haas, J.; Leimenstoll, G.; Paul, F.; Teschemacher, H. (1985). Demonstration of beta-casomorphin immunoreactive materials in in vitro digests of bovine milk and in small intestine contents after bovine milk ingestion in adult humans. *Peptides* 6, 825-830.
- Sylvestre, M.N.; Feidt, C.; Brun-Bellut, J. (2001). Post-mortem evolution of non-protein

- nitrogen and its peptide composition in growing lamb muscles. *Meat Sci.*, 58, 363-369.
- Takada, F.; Vander Woude, D.L.; Tong, H-Q.; Thompson, T.G.; Watkins, S.C.; Kunkel, L.M.; Beggs, A.H. (2001). Myozenin: An  $\alpha$ -actinin- and  $\gamma$ -filamin-binding protein of skeletal muscle Z lines. *PNAS* 98, 1595-1600.
- Takahashi, K. (1996). Structural weakening of skeletal muscle tissue during post-mortem ageing of meat: the non-enzymatic mechanism of meat tenderization. *Meat Sci.* 43, S67-S80.
- Tani, F.; Iio, K.; Chiba, H.; Yoshikawa, M. (1990). Isolation and characterization of opioid antagonist peptides derived from human lactoferrin. *Agric. Biol. Chem.* 54, 1803-1810.
- Tani, F.; Shiota, A.; Chiba, H.; Yoshikawa, M. (1994). Serorphin, an opioid peptide derived from bovine serum albumin. In *Beta-casomorphins and related peptides: recent developments*. Brantl, V.; Teschemacher, H. (Eds.). Weinheim : VCH. pp. 3-17.
- Taylor, R.G.; Geesink, G.H.; Thompson, V.F.; Koohmaraie, M.; Goll, D.E. (1995). Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? *J. Anim. Sci.* 73, 1351-1367.
- Terada, T.; Sawada, K.; Irie, M.; Saito, H.; Hashimoto, Y.; Inui, K. (2000). Structural requirements for determining the substrate affinity of peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Pflugers Arch.* 440, 679-684.
- Terada, T.; Sawada, K.; Saito, H.; Hashimoto, Y.; Inui, K. (1999). Functional characteristics of basolateral peptide transporter in the human intestinal cell line Caco-2. *Am. J. Physiol.* 276, G1435-G1441.
- Terada, T.; Shimada, Y.; Pan, X.; Kishimoto, K.; Sakurai, T.; Doi, R.; Onodera, H.; Katsura, T.; Imamura, M.; Inui, K. (2005). Expression profiles of various transporters for oligopeptides, amino acids and organic ions along the human digestive tract. *Biochem. Pharmacol.* 70, 1756-63.
- Teucher, B.; Majsak-Newman, G.; Dainty, J.R.; McDonagh, D.; FitzGerald, R.J.; Fairweather-Tait, S.J. (2006). Calcium absorption is not increased by caseinophosphopeptides. *Am. J. Clin. Nutr.* 84, 162-166.
- Thwaites, D.T.; Hirst, B.H.; Simmons, N.L. (1994). Substrate specificity of the di/tripeptide transporter in human intestinal epithelia (Caco-2): identification of substrates that undergo H(+)-coupled absorption. *Br. J. Pharmacol.* 113, 1050-1056.
- Tomita, M.; Takase, M.; Bellamy, W.; Shimamura, S. (1994). A review: the active peptide of lactoferrin. *Acta Paediatr. Jpn.* 36, 585-591.
- Tornberg, E. (2005). Effects of heat on meat proteins - implications on structure and quality of meat products. *Meat Sci.* 70, 493-508.
- Tsuchiya, H.; Kita, S.; Seki, N. (1992). Postmortem changes in  $\alpha$ -actinin and connectin in carp and rainbow trout muscles. *Nip. Suisan. Gak.* 58, 793-798.

- Tsuchiya, H.; Seki, N. (1991). Action of calpain on alpha-actinin within and isolated from carp myofibrils. *Nip. Suisan. Gak.* 57, 1133-1139.
- Vanhoof, G.; Goossens, F.; De Meester, I.; Hendriks, D.; Scharpe, S. (1995). Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J.* 9, 736-744.
- Verrez-Bagnis, V.; Noël, J.; Sautereau, C.; Fleurence, J. (1999). Desmin degradation in postmortem fish muscle. *J. Food Sci.* 64, 240-242.
- Vercruysse, L.; Van Camp, J.; Smaghe, G. (2005). Ace inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: a review. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8106-8115.
- Vermeirssen, V.; Van Camp, J.; Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Br. J. Nutr.* 92, 357-366.
- Vitorino, R.; Lobo, M.J.; Ferrer-Correira, A.J.; Dubin, J.R.; Tomer, K.B.; Domingues, P.M.; Amado, F.M. (2004). Identification of human whole saliva protein components using proteomics. *Proteomics* 4, 1109-1115.
- Wakabayashi, H.; Takase, M.; Tomita, M. (2003). Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin. *Curr. Pharm. Des.* 9, 1277-1287.
- Watanabe, A.; Ueda, Y.; Higuchi, M. (2004). Effects of slaughter age on the levels of free amino acids and dipeptides in fattening cattle. *Anim. Sci. J.* 75, 361-367.
- Watson, C.J.; Rowland, M.; Warhurst, G. (2001). Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 281, C388-C397.
- Werle, M.; Bernkop-Schnurch, A. (2006). Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. *Amino Acids* 30, 351-367.
- Wu, J.P.; Ding, X.L. (2001). Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.* 49, 501-506.
- Yamamoto, N. (1997). Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Biopolymers* 43, 129-134.
- Yamamoto, N.; Akino, A.; Takano, T. (1994). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.* 77, 917-922.
- Yamamoto, N.; Ejiri, M.; Mizuno, S. (2003). Biogenic peptides and their potential use. *Curr. Pharm. Des.* 9, 1345-1355.
- Yang, Y.J.; Marczak, E.D.; Yokoo, M.; Usui, H.; Yoshikawa, M. (2003). Isolation and antihypertensive effect of angiotensin I-Converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from spinach rubisco. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4897-4902.

- Yeung, A.K.; Basu, S.K.; Wu, S.K.; Chu, C.; Okamoto, C.T.; Hamm-Alvarez, S.F.; von Grafenstein, H.; Shen, W.C.; Kim, K.J.; Bolger, M.B.; Haworth, I.S.; Ann, D.K.; Lee, V.H. (1998). Molecular identification of a role for tyrosine 167 in the function of the human intestinal proton-coupled dipeptide transporter (HPepT1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250, 103-107.
- Yokoyama, K.; Chiba, H.; Yoshikawa, M. (1992). Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 1541-1545.
- Yoshikawa, M.; Fujita, H.; Matoba, N.; Takenaka, Y.; Yamamoto, T.; Yamauchi, R.; Tsuruki, H.; Takahata, K. (2000). Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases. *Biofactors* 12, 143-146.
- Yust, M.M.; Pedroche, J.; Giron-Calle, J.; Alaiz, M.; Millan, F.; Vioque, J. (2003). Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea Legumin with alcalase. *Food Chem.* 81, 363-369.
- Yoshikawa, M.; Tani, F.; Yoshimura, T.; Chiba, H. (1986). Opioid peptides from milk proteins. *Agric. Biol. Chem.* 50, 2419-2421.
- Yvon, M.; Beucher, S.; Guilloteau, P.; Le Huerou-Luron, I.; Corring, T. (1994). Effects of caseinomacropeptide (CMP) on digestion regulation. *Reprod. Nutr. Dev.* 34, 527-537.
- Zahraoui, A. (2004). Les jonctions serrées, plate-forme de régulation de la prolifération et de la polarité cellulaire. *Med. Sci.* 20, 580-585.
- Zebrowska, T.; Simon, O.; Munchmeyer, R.; Bergner, H.; Zebrowska, H. (1982). Investigations on the amino acid secretion and absorption in the stomach of the growing pig. *Arch. Tierernahr.* 32, 703-710.
- Zimmermann, K.C.; Bonzoon, C.; Green, D.R. (2001). The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Therapeutics.* 92, 57-70.
- Zioudrou, C.; Streaty, R.A.; Klee, W. A. (1979). Opioid peptides derived from food proteins. The exorphins. *J. Biol. Chem.* 254, 2446-2449.
- Zhou, Q.; Ruiz-Lozano, P.; Martone, M.E.; Chen, J. (1999). Cypher, a striated muscle-restricted PDZ and LIM domain-containing protein, binds to alpha-actinin-2 and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 274, 19807-19813.
- Ziv, E.; Bendayan, M. (2000). Intestinal absorption of peptides through the enterocytes. *Microsc. Res. Tech.* 49, 346-352.
- Zucht, H.D.; Raida, M.; Adermann, K.; Magert, H.J.; Forssmann, W.G. (1995). Casocidin-I: a casein-alpha s2 derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Lett.* 372, 185-188.



---

---

## **ANNEXES**

---

---

**Annexe 1** : Nomenclature et formule chimique des acides aminés.

Nom	Code à 3 lettres	Code à 1 lettre	Formule chimique	Poids moléculaire (g/mol)
Alanine	Ala	A	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	89,10
Arginine	Arg	R	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{NH} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{N} \quad \text{NH} \\ \parallel \\ \text{NH} \end{array}$	174,20
Asparagine	Asn	N	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CONH}_2 \end{array}$	132,12
Aspartate	Asp	D	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{COOH} \end{array}$	133,11
Cystéine	Cys	C	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_2\text{SH} \end{array}$	121,16
Glutamine	Gln	Q	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CONH}_2 \end{array}$	147,13
Glutamate	Glu	E	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{COOH} \end{array}$	146,15
Glycine	Gly	G	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{COOH} \\   \\ \text{H} \end{array}$	75,07
Histidine	His	H	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{HC} \\ / \quad \backslash \\ \text{N} \quad \text{NH} \\ \parallel \\ \text{C} \\   \\ \text{H} \end{array}$	155,16
Isoleucine	Ile	I	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{COOH} \\   \\ \text{HC}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	131,18
Leucine	Leu	L	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{HC} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$	131,18

**Annexe 1 : (suite)**

Nom	Code à 3 lettres	Code à 1 lettre	Formule chimique	Poids moléculaire (g/mol)
Lysine	Lys	K	$  \begin{array}{c}  \text{H}_2\text{N}-\text{COOH} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{NH}_2  \end{array}  $	146,19
Méthionine	Met	M	$  \begin{array}{c}  \text{H}_2\text{N}-\text{COOH} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{S} \\    \\  \text{CH}_3  \end{array}  $	149,21
Phénylalanine	Phe	F	$  \begin{array}{c}  \text{H}_2\text{N}-\text{COOH} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{C}_6\text{H}_5  \end{array}  $	165,19
Proline	Pro	P	$  \begin{array}{c}  \text{H}_2 \\    \\  \text{H}_2\text{C}-\text{C} \\    \quad   \\  \text{H}_2\text{C}-\text{N}-\text{CH} \\    \quad   \\  \text{H} \quad \text{COOH}  \end{array}  $	115,13
Sérine	Ser	S	$  \begin{array}{c}  \text{H}_2\text{N}-\text{COOH} \\    \\  \text{CH}_2\text{OH}  \end{array}  $	105,09
Thréonine	Thr	T	$  \begin{array}{c}  \text{H}_2\text{N}-\text{COOH} \\    \\  \text{CH}_2\text{OH} \\    \\  \text{CH}_3  \end{array}  $	119,12
Tryptophane	Trp	W	$  \begin{array}{c}  \text{H}_2\text{N}-\text{COOH} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{C}_8\text{H}_6\text{N}  \end{array}  $	204,23
Tyrosine	Tyr	Y	$  \begin{array}{c}  \text{H}_2\text{N}-\text{COOH} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{C}_6\text{H}_4 \\    \\  \text{OH}  \end{array}  $	181,19
Valine	Val	V	$  \begin{array}{c}  \text{H}_2\text{N}-\text{COOH} \\    \\  \text{C} \\  / \quad \backslash \\  \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3  \end{array}  $	117,15

**Annexe 2** : Liste des peptides alimentaires (< 5 kDa) identifiés par nano-HPLC-ESI-IT MS/MS dans les digesta de porc (n = 4) collectés pendant les 3 premières heures après l'ingestion de chair de truite cuite ou de viande bovine cuite (faux-filet, paleron ou pectoral profond).

Protéine parent	Séquence du fragment	m/z (M+H <sup>+</sup> )	Aliment	Nombre d'échantillons
<b>Duodénum</b>				
Actine	VGMGQKDSYVGDEAQSQRGIL	2238,119	Faux-filet	1
	KIKIIPPERKYSVW	1828,085	Faux-filet	1
	KIKIIPPERKYSV	1642,006	Faux-filet	1
	KIKIIPPERKY	1455,905	Faux-filet, paleron, pectoral profond, truite	7
	IGMESAGIHETAY	1378,631	Truite	1
	MKILTERGYSF	1344,699	Faux-filet	1
	SYELPDGQVITI	1334,684	Pectoral profond, truite	2
	LRVAPEEHPTL	1261,691	Faux-filet, paleron, pectoral profond, truite	14
	DLAGRDLTDYL	1251,622	Faux-filet, paleron, pectoral profond, truite	8
	AVFPSIVGRPR	1198,706	Paleron, pectoral profond, truite	5
	MKILTERGYS	1197,630	Faux-filet, truite	2
	YALPHAIMRL	1184,661	Faux-filet, paleron, pectoral profond	5
	LRVAPEEHPT	1148,606	Faux-filet, pectoral profond	5
	RVVAPEEHPTL	1148,606	Paleron, truite	4
	IGMESAGIHET	1144,531	Truite	1
	DLAGRDLTDY	1138,538	Pectoral profond	2
	YELPDGQVIT	1134,568	Faux-filet, pectoral profond, truite	3
	VFPSIVGRPR	1127,669	Pectoral profond	1
	MKILTERGY	1110,598	Faux-filet, pectoral profond	3
	EYDEAGPSIV	1079,490	Truite	1
	ETFNVPAMY	1071,482	Pectoral profond, truite	2
	LMKILTERG	1060,619	Faux-filet, pectoral profond	2
	IGMESAGIHE	1043,483	Faux-filet, pectoral profond, truite	6
	FPSIVGRPR	1028,601	Paleron, pectoral profond	2
	RLDLAGRDL	1028,585	Faux-filet, paleron, pectoral profond	4
	AGDDAPRAVF	1018,496	Faux-filet, paleron, pectoral profond, truite	9
	AGFAGDDAPR	976,499	Truite	1
GYALPHAIM	972,498	Faux-filet, paleron	3	
YALPHAIM	915,476	Faux-filet, paleron, pectoral profond, truite	14	
Créatine kinase	VWVNEEDHL	1140,533	Truite	1
	LFDKPVSPLL	1128,667	Faux-filet, paleron, pectoral profond, truite	11
	LFDKPVSPL	1015,583	Paleron, pectoral profond, truite	6
	FDKPVSPL	902,499	Paleron, pectoral profond	2
Enolase	FYKAGKYDLD	1219,600	Truite	1
	YKAGKYDLD	1072,532	Truite	1
	MILPIGASNF	1062,566	Truite	1
	MILPVGASSF	1021,539	Pectoral profond	1
	ILPVPAF	756,466	Faux-filet, pectoral profond	4
Fructose-1,6-bisphosphate aldolase	IAHRIVAPGKGIL	1344,848	Faux-filet, paleron, pectoral profond	7
	FSYGRALQA	1013,132	Faux-filet	1
GA3PDH	APLAKVIHDHF	1247,690	Faux-filet	2
	INDPFIDLHY	1246,611	Faux-filet, pectoral profond	2
	TVRLEKPASY	1163,643	Truite	3
	VIDGHKITVF	1128,642	Truite	1
	FRVPTPNVSV	1115,621	Faux-filet, paleron, pectoral profond, truite	12
	VKVGVNGFGR	1032,595	Truite	2
	FRVPTPNVS	1016,553	Truite	2
	VKVGVNGF	819,473	Faux-filet, pectoral profond, truite	4
Myoglobine	FRNDMAAQYKVLGFHG	1853,912	Faux-filet	1
	AIIHVLHAKHPSDFGAD	1827,951	Faux-filet	1
	AIIHVLHAKHPSDF	1584,865	Faux-filet, paleron, pectoral profond	7
	AAQYKVLGFHG	1190,632	Faux-filet	1
	YKVLGFHG	920,499	Faux-filet, paleron, pectoral profond	12
FTGHPETL	901,442	Paleron	2	

**Annexe 2 : (suite)**

Protéine parent	Séquence du fragment	m/z (M+H <sup>+</sup> )	Aliment	Nombre d'échantillons
<b>Duodénum (suite)</b>				
Myosine	FEKPKPAKGKAEAHF	1684,918	Truite	2
	IRIHFGTTGKLASAD	1586,866	Faux-filet	1
	DVFPDDKEEF	1339,606	Pectoral profond	1
	IRIHFGTTGKL	1242,732	Faux-filet, pectoral profond	2
	SLIHYAGTVDY	1238,606	Faux-filet, pectoral profond	3
	SLVHYAGTVDY	1224,590	Truite	2
	MMKEASGPINF	1224,576	Faux-filet, pectoral profond	2
	FKVLDPDATGF	1209,616	Truite	4
	MVKEASGPINF	1192,604	Truite	1
	NSYEEALDHL	1190,533	Truite	1
	MTHLHEPAVL	1147,593	Faux-filet, pectoral profond	2
	MKEASGPINF	1093,535	Pectoral profond	1
	RIVLGTGK	1085,668	Truite	1
	SLIHYAGTVD	1075,542	Pectoral profond	1
	FKVFDPEGK	1066,557	Paleron	1
	VKEASGPINF	1061,563	Truite	1
	SLVHYAGTVD	1061,527	Truite	1
	YFKIKPLL	1021,645	Faux-filet, paleron, pectoral profond, truite	11
	YNLKERY	985,511	Faux-filet, paleron, pectoral profond, truite	8
	FVKHVLSV	928,562	Truite	3
	IEKPLGIF	917,130	Truite	1
	YFKIKPL	908,561	Paleron, pectoral profond	3
	ADFMPMM	842,325	Truite	2
Parvalbumine	FKVIDQDASGF	1226,606	Truite	1
Titine (ou connectine)	FRLKIPI	886,588	Faux-filet	1
<b>Jéjunum</b>				
Actine	DSGDGVTHNVPIYEG	1559,698	Truite	1
	VMSGTTMYPGIAD	1399,624	Faux-filet	1
	RAVFPISVGRPR	1354,807	Paleron	1
	SYELPDGQVITI	1334,684	Faux-filet, paleron, pectoral profond, truite	6
	GIITNWDDMEK	1321,610	Pectoral profond	1
	AGDDAPRAVF	1293,623	Paleron	1
	LRVAPEEHPTL	1261,691	Paleron, pectoral profond, truite	5
	RVAPEEHPTLL	1261,691	Truite	1
	IGMESAGIHETT	1245,579	Pectoral profond	1
	SYELPDGQVIT	1221,600	Truite	1
	EYDEAGPSIVH	1216,549	Truite	1
	IGMESAGIHETA	1215,568	Truite	1
	AVFPISVGRPR	1198,706	Faux-filet, paleron, pectoral profond, truite	15
	SGGTTMYPGIAD	1169,515	Faux-filet, pectoral profond, truite	6
	EITALAPSTMK	1161,619	Paleron	1
	LRVAPEEHPT	1148,606	Paleron, pectoral profond, truite	3
	RVAPEEHPTL	1148,606	Pectoral profond	1
	IGMESAGIHET	1144,531	Truite	1
	YELPDGQVIT	1134,568	Faux-filet	1
	VFPISVGRPR	1127,669	Faux-filet, paleron, pectoral profond, truite	9
	SYELPDGQVI	1120,553	Pectoral profond, truite	2
	VAPEEHPTLL	1105,589	Pectoral profond	1
	EYDEAGPSIV	1079,490	Faux-filet, paleron, pectoral profond, truite	6
	IGMESAGIHE	1043,483	Truite	1
	EITALAPSTM	1033,524	Pectoral profond	1
	FPSIVGRPR	1028,601	Faux-filet, paleron, pectoral profond, truite	7
	AGDDAPRAVF	1018,496	Paleron	1
	SYELPDGQV	1007,469	Pectoral profond	1
	DLTDYLMK	998,487	Pectoral profond	1
	LTEAPLNPK	982,557	Truite	2
	AGFAGDDAPR	976,449	Pectoral profond, truite	5
	VFPISVGRP	971,568	Faux-filet, paleron, pectoral profond	4
	FIGMESAGI	924,450	Truite	1
	YALPHAIM	915,476	Faux-filet	1
	PSIVGRPR	881,532	Truite	3
	FPSIVGRP	872,500	Paleron	3

**Annexe 2 : (suite)**

Protéine parent	Séquence du fragment	m/z (M+H <sup>+</sup> )	Aliment	Nombre d'échantillons
<b>Jéjunum (suite)</b>				
Calséquestrine	EEGLDFPEYD	1213,490	Pectoral profond	1
	LDVLEDPVEL	1141,599	Pectoral profond	1
Créatine kinase	FLFDKPVSP	1162,651	Faux-filet, pectoral profond	2
	VWVNEEDHL	1140,533	Paleron	2
	LFDKPVSP	1128,667	Paleron, pectoral profond	3
	LFDKPVSP	1015,583	Faux-filet, pectoral profond, truite	15
	GVDNPGHPF	939,433	Paleron	2
	FDKPVSP	902,499	Faux-filet, paleron, pectoral profond	10
Diacylglycérol kinase	FEVIPNDKD	1076,526	Pectoral profond	1
Enolase	MRIEELGDK	1219,599	Truite	1
Fructose-1,6-bisphosphate aldolase	PEILPDGDHDLK	1348,675	Faux-filet, pectoral profond, truite	3
	IAHRIVAPGKGIL	1344,848	Pectoral profond	1
	PEILPDGDHDL	1220,580	Faux-filet, pectoral profond, truite	4
Glucosephosphate isomérase	IGIGGSDLGPLM	1129,593	Faux-filet	1
GA3PDH	VIHDHFGIVEGL	1335,706	Pectoral profond	1
	RVISAPSADAPM	1327,704	Faux-filet	1
	VIHDHFGIVEG	1222,622	Pectoral profond	1
	FRVPTPNVSV	1115,621	Faux-filet, paleron, pectoral profond, truite	13
	VKVGVNGFGR	1032,595	Truite	1
	FRVPTPNVS	1016,553	Pectoral profond	1
	VKVGVNGFG	876,494	Faux-filet, truite	2
Glycogène phosphorylase	NFDAFPDKV	1052,505	Pectoral profond	1
	YYDRIPEL	1068,537	Pectoral profond	1
Hémoglobine	TYFPHF	811,378	Pectoral profond	1
Myoglobine	SDAIIHVLHAKHPSD	1752,940	Paleron	1
	ANKHKIPVKYLEF	1586,906	Pectoral profond	1
	AIIHVLHAKHPSDF	1584,865	Paleron	1
	HLAESHANKHKIPV	1580,866	Paleron	1
	AIIHVLHAKHPSD	1437,797	Paleron	1
	WGKVEADVAGH	1168,575	Paleron	1
	YKVLGFHG	920,499	Faux-filet, paleron, pectoral profond	4
	TALGGILKK	900,588	Paleron	2
Myosine	DVFVPDDKEEFV	1438,674	Paleron, pectoral profond	3
	NSYEEALDHLET	1420,623	Truite	1
	DVFVPDDKEEF	1339,606	Paleron	1
	KMEIDDLSSNM	1282,566	Truite	1
	LLGSIDVNED	1211,591	Truite	2
	FKVLDPDATGF	1209,616	Truite	2
	NSYEEALDHL	1190,533	Truite	4
	TLEDQLSEIK	1175,616	Truite	1
	RIVLGTGGEK	1085,668	Truite	1
	IRIHFGAGK	1069,627	Truite	1
	FKVFDPEGK	1066,557	Paleron, pectoral profond	2
	SLVHYAGTVD	1061,527	Truite	1
	NLQEEISDL	1060,516	Paleron, truite	3
	FKVLDPEGK	1032,573	Paleron, pectoral profond	2
	SSPQSPLSAPG	1028,099	Paleron	1
	YFKIKPLL	1021,645	Paleron, pectoral profond	2
	AAFGEAAAPYL	1009,500	Paleron	1
	ENKCLKNE	1002,558	Pectoral profond	1
	IRIHFGTTG	1001,553	Pectoral profond	1
	VQQQGEVDD	988,459	Truite	1
	LEAQTRPF	961,511	Paleron	1
	IEKPLGIF	917,130	Truite	1

**Annexe 3** : Liste des peptides endogènes (< 5 kDa) identifiés par nano-HPLC-ESI-IT MS/MS dans les contenus intestinaux d'un porc équipé de deux canules, duodénale et jéjunale, collectés pendant les 3 premières heures après l'ingestion de l'aliment sans protéines. Les peptides listés ont été identifiés à l'aide de la base de données nr de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) restreintes à l'espèce *Sus scrofa*.

Fragment protéique	Position du fragment	m/z (M+H+)	Séquence du fragment	N° accession de la protéine parent
<b>Duodénum</b>				
Alpha-amylase pancréatique (précurseur)	412-424	1549,755	FRNVVDGQPFANW	gi 33860120
	503-514	1363,675	SISNSAEDPFIAI	gi 33860120
	502-511	1213,538	FSISNSAEDPF	gi 33860120
	412-421	1178,596	FRNVVDGQPF	gi 33860120
	503-511	1066,469	SISNSAEDPF	gi 33860120
	503-511	981,573	IAIHAESKL	gi 33860120
Co-transporteur K-Cl	450-471	2280,311	SIPVGTILAIITTSLVYFSSVV	gi 47522728
Hémoglobine (sous-unité alpha)	110-123	1514,678	AAHHPDDFNPSVHA	gi 122465
	110-122	1443,641	AAHHPDDFNPSVH	gi 122465
	37-46	1238,621	PTTKTYFPHF	gi 122465
Hémoglobine (sous-unité bêta)	72-82	1258,643	FSDGLKHLN	gi 3041678
Hémoglobine (sous-unité epsilon)	34-41	1048,558	VVYPWTQR	gi 3041679
Pepsine A (précurseur)	40-56	2015,050	FLKTHKNPASKYFPEA	gi 129794
	40-52	1570,849	FLKTHKNPASKY	gi 129794
	16-23	923,641	LVKVPLVR	gi 129794
Protéine basique riche en proline salivaire	52-72	2211,066	SQGEGHQKRPRPPGDGEQGP	gi 97180301
	260-278	1961,040	GPAPPGARPPPGPPPPGPPPPG	gi 97180301
	262-279	1904,018	APPGARPPPGPPPPGPPPPGP	gi 97180301
	644-664	1904,018	PGPAPPGARPPPGPPPPPPGP	gi 97180301
	35-51	1746,929	LRPPPGGGPPRPPPPPEE	gi 97180301
	424-437	1346,759	ARPLPGPPPPGPPP	gi 15145795
	665-676	1223,654	SPPRPPPGPPPQ	gi 97180301
Trypsine (précurseur)	86-95	1042,651	LIKLSSTATL	gi 136429
	76-84	1040,589	AKIITHPNF	gi 136429
	87-95	929,567	IKLSSTATL	gi 136429

**Annexe 3 : (suite)**

Fragment protéique	Position du fragment	m/z (M+H <sup>+</sup> )	Séquence du fragment	N° accession de la protéine parent
<b>Jéjunum</b>				
Pepsine A (précurseur)	347-358	1221,531	EGMDVPTSSGEL	gi 129794
Protéine basique riche en proline salivaire (précurseur)	242-263	2017,102	PPGARPPPGPPPLGPPPPGPAP	gi 97180301
	71-92	1961,040	GPAPPGARPPPGPPPPGPPPPG	gi 97180301
	111-131	1904,018	PPGPAPPGARPPPGPPPPGPP	gi 97180301
	73-93	1904,018	APPGARPPPGPPPPGPPPPGP	gi 97180301
	73-90	1652,891	APPGARPPPGPPPPGPPPP	gi 97180301
	36-51	1633,845	RPPPGGGPRPPPPPEE	gi 97180301
	162-177	1510,817	RPPPGPPPPGPPPPGP	gi 97180301
	408-422	1441,796	PAPPGARPPPPPPPP	gi 97180301
	409-423	1415,780	APPGARPPPPPPPPA	gi 97180301
	409-422	1344,743	APPGARPPPPPPPP	gi 97180301
	665-675	1095,595	SPPRPPPGPPP	gi 97180301
17-24	1010,495	RSPFFDLE	gi 97180301	
Protéine basique riche en proline salivaire	113-134	2019,045	GPAPPDARPPPGPPPPGPPPPG	gi 15145797
	495-515	1963,067	APPGARPRPGPPPPGPPPPGP	gi 15145793
	114-134	1962,024	PAPPDARPPPGPPPPGPPPPG	gi 15145797
	114-133	1905,002	PAPPDARPPPGPPPPGPPPP	gi 15145797
	235-251	1548,822	GPPPPPPPPPGPPPPGP	gi 15145795
	501-516	1413,764	PRPGPPPPGPPPPGP	gi 15145795
	426-440	1370,747	PLPGPPPPGPPPPGP	gi 15145795
424-437	1346,759	ARPLPGPPPPGPPPP	gi 15145795	
Trypsine (précurseur)	86-95	1042,651	LIKSSPATL	gi 136429
	87-95	929,567	IKLSSPATL	gi 136429



---

## RÉSUMÉ

La prise de conscience que les qualités nutritionnelles des protéines allaient au-delà de leur capacité à fournir des acides aminés, est apparue avec l'émergence de la notion de peptides bioactifs, c'est-à-dire d'oligopeptides principalement produits par protéolyse, pouvant être des modulateurs de divers processus biologiques. Si de nombreux peptides bioactifs ont été découverts dans des hydrolysats de protéines de lait, leur recherche dans les produits carnés reste à ce jour très peu développée. Dans ce contexte, nos objectifs ont été de caractériser et d'identifier les peptides (< 5 kDa) présents dans la chair de poisson ou viande bovine après conservation/maturation et cuisson, puis au cours de l'hydrolyse digestive *in vivo* chez le porc dans les contenus intestinaux et dans le sang portal.

La fraction peptidique des aliments, constituée des peptides non protéiniques (carnosine, ansérine, glutathion) et de ceux formés au cours des traitements technologiques (conservation et cuisson), était dépendante de l'espèce et des traitements appliqués. Dans la viande bovine cuite, où de nombreux peptides ont été détectés, des fragments de protéines de structure ont été identifiés.

Parmi la grande diversité des peptides d'origine alimentaire trouvés dans les contenus duodénaux et jéjunaux, certains d'entre eux, présents de façon systématique, étaient de possibles peptides bioactifs ou leurs précurseurs.

Outre la carnosine dont la biodisponibilité dépendait d'abord de sa teneur dans la viande, de nombreux composés, probablement des oligopeptides, étaient libérés dans le sang de la veine porte selon des profils spécifiques après un repas de faux-filet ou de paleron.

**Mots clés :** peptide bioactif ; digestion ; absorption ; spectrométrie de masse ; viande ; poisson.

---

## ABSTRACT

### **Contribution to the study of oligopeptides (< 5 kDa) generated by preparation and digestion of beef meat and fish products**

Nutritional quality of food proteins has been considered to exceed the mere supply of amino acids since the emergence of the concept of bioactive peptides, i.e. oligopeptides produced mainly by proteolysis, and behaving like modulators of various biological functions. While many bioactive peptides have been discovered in milk protein hydrolysates, their presence within meat and fish products or during digestion of such products has been very little documented to date. In this context, our objectives were to characterise and identify peptides (< 5 kDa) in fish flesh and beef meat after storage/ageing and cooking, and subsequently during *in vivo* digestive hydrolysis in pig, in intestinal contents and in portal blood.

The peptidic fraction in muscle-foods, made of non-proteinic peptides (carnosine, anserine, glutathione) and of peptides formed during the technological processes (storage and cooking), was dependent on the species and on the process used. In cooked beef meat, where numerous peptides were detected, fragments of structural proteins were identified.

Among the large number of dietary peptides found in duodenal and jejunal contents, some were systemically observed and may be bioactive peptides or precursors.

Beside carnosine, the absorption of which depending on its concentration in meat, many compounds, probably oligopeptides were released in the portal vein following specific patterns after a meal of top loin or of shoulder.

**Key words:** bioactive peptide; digestion; absorption; mass spectrometry; meat; fish.

---