



Thèse

Pour obtenir le diplôme de

Docteur de l'Université de Reims

Spécialité : Biochimie

Par

Laurent PERROT

Présentée et soutenue publiquement le 5 mai 2004

**Evaluation de l'effet antihypertenseur de la fraction
oligopeptidique du vin de Champagne.
Identification et caractérisation d'oligopeptides.**

Jury d'examen :

Mme M. CHARPENTIER, chef de projet au Laboratoire de Recherche Moët & Chandon, **Examineur**

M. F. DUCHIRON, professeur à la Faculté des Sciences de Reims, **Directeur de thèse**

M. B. DUTEURTRE, Directeur du Laboratoire de Recherche Moët & Chandon, **Examineur**

M. M.L. KALTENBACH, professeur à la Faculté de Pharmacie de Reims, **Examineur**

M. J.L. MAUBOIS, chargé de Mission à l'INRA de Rennes, **Rapporteur**

M. J. VERCAUTEREN, professeur à la Faculté de Pharmacie de Montpellier, **Rapporteur**

Invités :

Mme C. ELFAKIR, professeur à la Faculté des Sciences d'Orléans, **Examineur**

M. G. LINDEN, chercheur au Cirad de Montpellier, **Examineur**

Evaluation de l'effet antihypertenseur de la fraction oligopeptidique du champagne.

Identification et caractérisation d'oligopeptides.

Thèse de Doctorat présentée par

Laurent PERROT



Laboratoire de Recherche Moët & Chandon

Et



Université de Reims Champagne-Ardenne

Cette thèse vient consacrer plusieurs années d'études et de recherches qui s'inscrivent dans le cadre d'une formation universitaire pour l'obtention d'un doctorat (PhD) en Biologie-Biochimie. Bien que cet ouvrage représente une très grande satisfaction personnelle, il demeure avant tout important pour moi d'exprimer mes plus sincères remerciements à toutes celles et ceux qui, de façon directe ou indirecte, m'ont aidé à réaliser ce projet.

A **Monsieur Bruno DUTEURTRE**
Directeur de Laboratoire de Recherche Moët & Chandon (Epernay, France)

Qui m'a accueilli au sein du Laboratoire de Recherche Moët & Chandon et
qui a mis à ma disposition les conditions matérielles et financières
nécessaires pour la réalisation de ce travail tout au long de ces trois années.
Pour sa sincérité et ses qualités relationnelles.

Avec respect et reconnaissance.

A **Monsieur Francis DUCHIRON**
Directeur de Thèse,
Directeur du Laboratoire de Microbiologie Industrielle de l'Université de Reims
Champagne-Ardenne (Reims, France)

Pour m'avoir proposé ce sujet de thèse.
Pour son soutien, sa disponibilité, ses précieux conseils et avis éclairés sur ce travail.
Pour la patience qu'il a eu à relire mes longs manuscrits qu'ils fussent en français ou en anglais (avec réponse souhaitable sous 48 heures !).
Pour sa gentillesse et sa bonne humeur.

Avec mes plus sincères remerciements.

A **Madame Monique CHARPENTIER**
Chef de projet au Laboratoire de Recherche Moët & Chandon (Epernay, France)

Pour qui je suis particulièrement reconnaissant de m'avoir fait confiance pour
l'accomplissement de cette thèse.
Pour sa disponibilité, ses précieux conseils et avis éclairés sur ce travail.
Mais aussi pour sa gentillesse, sa générosité et sa bonne humeur.

Avec mes plus sincères remerciements.

A **Monsieur Matthieu KALTENBACH**
Professeur au Laboratoire de Pharmacologie et Pharmacocinétique de l'Université de Reims
Champagne-Ardenne (Reims, France)

Pour m'avoir accueilli chaleureusement à plusieurs reprises dans son laboratoire.

Pour m'avoir fait bénéficier de ses compétences en pharmacologie et pharmacocinétique et de ses conseils avisés depuis l'expérimentation jusqu'à la rédaction de ce travail.

Pour la générosité, la disponibilité et la patience qu'il a manifesté durant la rédaction des publications et du manuscrit.

Avec mes plus sincères remerciements pour son aide et tout le temps qu'il m'a consacré.

A **Monsieur Joseph VERCAUTEREN**
Professeur au Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Montpellier (France)

Et Monsieur Jean-Louis MAUBOIS
Chargé de Mission INRA (Rennes, France)
Directeur du Laboratoire de Recherche en Technologie Laitière (Rennes, France)

Pour l'honneur qu'ils me font d'être rapporteurs de cette thèse.

Avec toute ma reconnaissance et mes remerciements.

A **Madame Claire ELFAKIR**
Professeur à la Faculté des Sciences d'Orléans (France)

Et Monsieur Guy LINDEN
Chercheur au Centre de coopération international en recherche agronomique pour le
développement (Cirad, Montpellier, France)

Pour l'honneur qu'ils me font d'être examinateurs de cette thèse.

Avec toute ma reconnaissance et mes remerciements.

A **Mes parents,**

Qui m'ont toujours encouragé et soutenu tout au long de ces années d'études jusqu'à la Faculté.
Pour tout l'amour qu'ils m'ont donné et qu'ils me donnent encore.

Avec toute mon affection et mes remerciements.

A **Manuela,**

Ma « Pénélope » depuis bientôt 1 an. Elle est ma déesse, divine inspiratrice, me donnant la flamme et dont la présence à chaque instant réjouit mon cœur.
Le charme, la gaieté et la joie de vivre l'accompagnent. Autour d'elle resplendit une lumière enchanteresse de joie et d'affection.

Avec tout mon amour.

A **Ma famille et belle-famille,**

Grand-père et grand-mère, papy, Sylvie et Bruno, Cécile et Philippe, Yves, Daniel et Josette, Chantal, Aurore et Benoît, Caro et Nicolas, Nico, François, Ronan, Victoria, Guillaume, Lucie, Emilie, Elise, Eliane ainsi que tout le reste de la famille.
Mes beaux-parents (Firmino et Balbina, profitez-en c'est peut-être la seule fois où je vous appellerai par vos prénoms... !), Mini et Eglantine, Jojo et Aurélie ainsi que toute la famille présente en France et au Portugal (les cousins y compris !).

Avec toute mon estime et mon affection.

A Mes amis,

L'inévitable Seb (mon ami depuis la maternelle et qui, jusqu'à la thèse, a su animer toutes mes années d'études), Kiki (seul commercial capable de vendre un logiciel pour l'utilisation d'un frigo), Dgé (qui croit que Kiki veut lui vendre un Frigo), Oliv' (Félintra, Tête de tigre !!!), Bertrand (dit Crazy Bull alias Tigrou Dubois).

Sans oublier aussi : Dim (mon collègue de DEA) et Sandy, Johnny et Sandrine, Coco et Cyril (et le petit Gabriel), Pauline, Sandrine « Zed », Céline (Pichette), Thomas (dit Félicien) et Mimi, Nico (qui n'a jamais sa carte bancaire au resto), Steph (ton chat n'y survivra pas !), Cédric (l'œnologue de la bande), Nadège (néo-intermittente du spectacle), Aude (plic-ploc !), Reine (et le petit Yoan), Quentin, Guillaume (Doc. G Decaux) et Céline, Ludo et Adeline, Seb (Démon n°1 de la Salsa) et Christelle (et leurs enfants, Baptiste et Antoine), Guillaume (Démon n°2 de la Salsa) et Sylvie, Michel (tromboniste en chef), Alain et Nathalie, Vincent et Fanny, Jacky (mon courtier en verres à bière) et Thérèse, Pascale et Thomas, Sophie et Nico (commissionnaire en figurines de Matrix), Bobo (propriétaire d'un appartement qui n'existe pas... !) et Sarah, Karim et Séverine, Virginie et Arnauld (qui n'ose pas avouer qu'il concourt pour la toque de cuisinier), Hugo et Aurélie ainsi que Ti-punch (notre petite chatte).

Avec toute mon amitié.

A Mes stagiaires,

Blandine Maujean (2^{ème} année de BTSA Anabiotec, Lycée Thillois, Reims, France), année 2001.

Lucia Difederico (3^{ème} année de Pharmacie, Chieti, Italie, *via* Erasmus), année 2002.

Angélique Cochet (1^{ère} année de BTSA Anabiotec, Lycée S^{te} Colette, Corbie, France), année 2003.

Pour leur contribution à ce travail de thèse.

A Toutes les personnes rencontrées dans les différents laboratoires et avec qui j'ai eu plaisir à travailler,

Dr. Sylvain Dukic (Laboratoire de Pharmacologie et Pharmacocinétique, Université de Reims Champagne Ardenne, France), pour m'avoir enseigné les techniques de manipulation animale, ainsi que pour son aide, ses conseils, son naturel et sa bonne humeur.

Dr. Roselyne Garnotel, pour son assistance et ses connaissances apportées pour les dosages plasmatiques des ions, CRP et Big ET-1.

Lydie Ventéo et Pr. Michel Pluot, pour leur collaboration et leur interprétation des coupes histologiques réalisées lors de l'étude in vivo.

Pr. Richard Vistelle, Dr. Hélène Marty, Monique, Blandine Madiot, Anthony Pigeon, Dr. Guillaume Hoizey, Pr. Hubert Ferté (fidèle du Borgnefesse à St Malo), Dr. Jérôme Depaquit, Françoise Moreau, Nadia et Virginie de la Faculté de Médecine-Pharmacie (Reims, France).

Marine de Person, Pr. Claire Elfakir, Pr. Michel Lafosse ainsi que tous les membres de l'Institut de Chimie Organique et Analytique (Université d'Orléans, France), avec qui j'ai eu plaisir à collaborer pour la recherche des peptides dans le champagne par la technique LC-ESI-MS/MS.

Dr. David Chassagne et Jocelyne Guerreau de l'Institut Universitaire de la Vigne et du Vin (Dijon, France).

Dr. Caroline Rémond, Dr. Estelle Copinet, Dr. Pierre Labeille, Seb (jeune chercheur de fermenteur) et Alexandra du Laboratoire de Microbiologie Industrielle (Reims, France).

Dr. Marie-Claude Mauro, Dr. Laurence Mercier (pour ses commentaires judicieux apportés tout au long de cette thèse), Aurélie Bossus, Dr. Michel Boulay (pour ses conseils et la relecture de certaines parties de mon manuscrit), Dr. Bertrand Robillard (également pour ses conseils et la relecture de certaines parties de mon manuscrit), Dr. Alexandra Bonomelli, Julia Capitanio, Martine Lecourt, Laurence Viaux, Sandrine Toutain, Anne Colin, Denyse Faverolles, Lean Horth Yean et Dominique Lenoir du Laboratoire de Recherche Moët & Chandon (Epernay, France).

Christine, Anne, Aurélie, Julie, Laurence, Anne-Valérie, Virginie, Marion, Emilie, Evelyne, Marie-Pascale, Floriane, Vanessa, Pierre-Etienne, Julien, Antoine, Pierre, Yann, Jérôme, Hervé, Mickaël (et Laurence), Emeric, Fabian et Frédéric : tous stagiaires ou ex-stagiaires au Laboratoire de Recherche Moët & Chandon (Epernay, France).

La Fondation du Site Paris-Reims (Chalons-en-Champagne, France) et Europol'Agro (Reims, France) à qui je suis reconnaissant de m'avoir désigné lauréat du prix « Les Millésimés Europol'Agro ».

Avec tous mes remerciements les plus amicaux.

Une mention spéciale pour :

Tante Yvette (fidèle lectrice de Science & Vie)

Qui m'a dit un jour : « Tu sais Laurent, en Science tout n'a pas encore été découvert et il y a encore beaucoup à faire ». A l'époque j'avais 17 ans et je m'interrogeais sur la suite à donner à mes études après le Bac. Je n'y ai pas forcément prêté attention à ce moment-là, mais les circonstances ont fait que j'ai finalement trouvé ma voie et je ne regrette absolument pas d'être là où je suis aujourd'hui (peut-être y as-tu contribué tante !).

A toutes ces personnes,

Je dédie cette thèse

Et si avec après tout ce petit monde, il se trouve que j'ai oublié certaines personnes, qu'ils me pardonnent et trouvent ici toute ma sympathie pour leur témoignage d'amitié.

T ABLE DES MATIERES

<i>Liste des communications</i>	xviii
<i>Liste des abréviations</i>	xx
<i>Liste des Figures</i>	xxiii
<i>Liste des Tableaux</i>	xxv
Introduction	1
Chapitre I. Etat de l'Art	5
I.1 L'ENTREPRISE MOËT & CHANDON	5
I.1.1 Historique	5
I.1.2 Moët & Chandon en quelques chiffres...	5
I.1.3 Le laboratoire de recherche et développement	6
I.2 L'ELABORATION DU CHAMPAGNE	6
I.3 LE VIEILLISSEMENT SUR LIES	9
I.3.1 L'autolyse des levures	10
I.3.2 Libération de métabolites	10
I.3.2.1 Les composés azotés	11
I.3.2.2 Les acides aminés	12
I.3.2.3 Les protéines	12
I.3.2.4 Les peptides	12
I.3.2.5 Origine des peptides du champagne	13
I.3.3 Activités enzymatiques au cours de l'autolyse	14
I.3.3.1 Généralités	14
I.3.3.2 Activités protéolytiques	14
I.3.4 Importance des activités hydrolytiques au cours de l'autolyse	15
I.4 LES ROLES POSSIBLES DES PEPTIDES	15
I.4.1 Implication des peptides au niveau de la saveur des aliments	15
I.4.2 Rôle potentiel des peptides au niveau de l'émulsion	17
I.4.3 Peptides a activité biologique	18
I.4.3.1 Genèse des peptides alimentaires	19
I.4.3.2 Rôles attribués aux peptides biologiquement actifs	20
I.4.3.3 Résorption des peptides	20
I.5 PEPTIDES ALIMENTAIRES ET HYPERTENSION	23

I.5.1	Introduction	23
I.5.2	Rôle du SRAA dans la régulation de la pression artérielle	24
I.5.3	Les peptides antihypertenseurs	26
I.5.3.1	Peptides issus de produits marins	26
I.5.3.2	Peptides retrouvés dans les produits laitiers	31
I.5.3.3	Peptides retrouvés dans les produits végétaux	37
I.5.3.4	Peptides produits à partir du plasma	41
I.5.3.5	Peptides issus d'autres sources naturelles	42
I.5.4	Relation structure activité des peptides inhibiteurs de l'ECA	47
I.5.4.1	Structure de l'ECA	47
I.5.4.2	Structure des peptides inhibiteurs de l'ECA	48
I.6	REGULATION DE LA PRESSION ARTERIELLE	50
I.6.1	Le monoxyde d'azote	50
I.6.2	L'endothéline-1	52
I.6.3	La protéine C-réactive	54
I.6.4	Implications de certains électrolytes	55
I.6.5	Les oligo-éléments	56
I.7	BUT DE L'ETUDE	57
Chapitre II. Matériel et Méthodes		58
II.1	TRAVAUX PRELIMINAIRES	58
II.1.1	Nomenclature	58
II.1.2	Ultrafiltrations	58
II.1.3	Autolyse en milieu modèle	58
II.1.3.1	Composition du milieu modèle	58
II.1.3.2	Conditions d'autolyse	59
II.1.4	Fractionnement de l'extrait < 1 kDa sur chromatographie basse pression	59
II.1.4.1	Le gel Sephadex [®] LH-20	59
II.1.4.2	Matériels	60
II.1.4.3	Conditions opératoires	60
II.1.5	Dosage des peptides par la méthode de Biuret	61
II.1.5.1	Préparation du réactif de Biuret	61
II.1.5.2	Dosage colorimétrique	61
II.1.6	Dosage des acides organiques par électrophorèse capillaire	61
II.1.6.1	Appareillage	62
II.1.6.2	Mode opératoire	62
II.1.7	Mesure de l'activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA	62
II.1.8	Peptides de synthèse	64
II.2	CARACTERISATION DE L'EXTRAIT DE CHAMPAGNE	64
II.2.1	Obtention de l'extrait	64
II.2.2	Obtention des extraits secs	64
II.2.3	Acides organiques, substances minérales et vitamines	65
II.2.3.1	Dosage des acides organiques	65

II.2.3.2	Dosages des minéraux et ions	65
II.2.3.3	Dosage de l'acide ascorbique	65
II.2.4	Les glucides	65
II.2.4.1	Dosage du glucose/fructose	65
II.2.4.2	Dosage du glycérol	65
II.2.5	Les composés azotés	66
II.2.5.1	Dosage de l'azote total	66
II.2.5.2	Dosage des acides aminés libres et totaux	66
II.2.5.3	Dosage de l'urée	67
II.2.6	Les composés phénoliques	67
II.2.7	Dosage de l'acétaldéhyde	67
II.3	EXPERIMENTATION ANIMALE	67
II.3.1	Animaux	67
II.3.1.1	Les souches de rats	67
II.3.1.2	Stabulation des animaux	68
II.3.2	Données expérimentales	68
II.3.2.1	Calcul de la dose à administrer	68
II.3.2.2	Protocole expérimental	69
II.3.3	Détermination de la pression artérielle	69
II.3.4	Prélèvements sanguins	70
II.3.5	Dosages	71
II.3.5.1	Dosage de l'activité ECA	71
II.3.5.2	Dosage des ions et oligo-éléments	72
II.3.5.3	Dosage du monoxyde d'azote	72
II.3.5.4	Dosage de la Big Endothéline-1	72
II.3.5.5	Dosage de l'activité Rénine	73
II.3.6	Evaluation de la toxicité de l'administration de l'échantillon	73
II.3.7	Méthodes statistiques	73
II.4	IDENTIFICATION DES PEPTIDES DU CHAMPAGNE	75
II.4.1	La spectrométrie de masse en tandem	75
II.4.2	Matériels d'analyse	75
II.4.2.1	Spectromètre de masse	75
II.4.2.2	Mode d'ionisation	77
II.4.3	Mode opératoire	77
II.4.3.1	Séparation par chromatographie	78
II.4.3.2	Identification et quantification par ESI-MS/MS	78
II.4.4	Préparation des échantillons	78
	Chapitre III. Résultats Discussion	79
III.1	ETUDES PRELIMINAIRES SUR LE CHAMPAGNE	79
III.1.1	Validation du protocole d'inhibition de l'ECA	80
III.1.1.1	Concentration de la solution stop	80
III.1.1.2	Test de linéarité	80
III.1.1.3	Répétabilité et reproductibilité du test	82
III.1.1.4	Contrôle positif d'inhibition	83

III.1.2	Tests d'inhibition sur le champagne	84
III.1.3	Fractionnement sur gel de Sephadex [®] LH-20	85
III.1.3.1	Extrait < 1 kDa de champagne	85
III.1.3.2	Extrait < 1 kDa d'autolysat	86
III.1.4	Tests d'inhibitions des peptides identifiés dans le vin de base	87
III.1.5	Discussion	87
III.2	CARACTERISATION DE LA FRACTION < 1 KDA	94
III.2.1	Composition en acides aminés libres et liés	94
III.2.2	Composition chimique de la fraction < 1 kDa	95
III.2.3	Discussion	96
III.3	EVALUATION DE L'EFFET ANTIHYPERTENSEUR IN VIVO	102
III.3.1	Tests de toxicité	102
III.3.2	Etude comportementale	102
III.3.3	Administration unique de l'extrait de champagne	103
III.3.4	Administration chronique de l'extrait de champagne	104
III.3.4.1	Suivi quotidien	104
III.3.4.2	Rythme cardiaque	106
III.3.4.3	Pression systolique	106
III.3.4.4	Pression diastolique	109
III.3.4.5	Pression moyenne	109
III.3.5	Recherche du mécanisme impliqué dans l'effet antihypertenseur	112
III.3.5.1	Dosage des ions et métaux dans le sérum	112
III.3.5.2	Détermination de l'activité rénine et activité de l'ECA	113
III.3.5.3	Dosage du monoxyde d'azote et de la Big Endothéline-1	113
III.3.5.4	Dosage de la protéine C-réactive	114
III.3.6	Discussion	114
III.4	IDENTIFICATION DE PEPTIDES DANS LE CHAMPAGNE	124
III.4.1	Peptides retrouvés dans le champagne	124
III.4.2	Evolution des peptides au cours du vieillissement du champagne	125
III.4.3	Discussion	126
	Conclusion et Perspectives	130
	Références bibliographiques	133
	Annexe	156
	ANNEXE. de Person <i>et al.</i> 2004	156
	Characterization of small peptides in champagne wine by LC-ESI-MS/MS.	
	Glossaire	182

LISTE DES COMMUNICATIONS

Communications orales :

- 2004 **Perrot L., Dukic S., Ventéo L., Charpentier M., Duteurtre B., Duchiron F., Garnotel R., Pluot M. & Kaltenbach M.L.** Evaluation de l'effet anti-hypertenseur d'un extrait de champagne.
Séminaire Interne CNRS/MEDIAN, 16 avril 2004, REIMS, France.
- 2003 **Perrot L., Dukic S., Charpentier M., Duteurtre B., Duchiron F. & Kaltenbach M.L.** Antihypertensive effect of a low molecular weight fraction of champagne wine in spontaneously hypertensive rats.
4th Symposium on New Developments in Clinical Pharmacy and Clinical Pharmacology, July 5, 2003, VIENNE, Autriche.
- 2003 **Perrot L., Dukic S., Ventéo L., Charpentier M., Duteurtre B., Duchiron F., Garnotel R., Pluot M. & Kaltenbach M.L.** Evaluation de l'effet anti-hypertenseur de la fraction <1 kDa issue de vin de champagne chez le rat spontanément hypertendu.
Forum Jeunes Chercheurs de la Société de Biologie de Reims, 21 mai 2003, REIMS, France.

Communications affichées :

- 2004 **De Person M., Chaimbault P., Perrot L., Elfakir C., Lafosse M.** Détermination de petits peptides dans le vin de Champagne par CPL-ESI-SM-SM.
Forum Labo et Forum Biotech 2004, 23-26 mars 2004, CNIT PARIS-La Défense, France.
- 2003 **Sevestre A., De Person M., Chaimbault P., Elfakir C., Lafosse M., Perrot L., Charpentier M., and Duchiron F.** Identification and quantification of small peptides by LC-MS-MS in Champagne wine.
1st International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, 5-7 november 2003, PRAGUE, Tchécoslovaquie.
- 2003 **Perrot L., Dukic S., Charpentier M., Duteurtre B., Duchiron F., and Kaltenbach M.L.** Antihypertensive effect of a low molecular weight fraction (< 1 kDa) of champagne wine in spontaneously hypertensive rats.
Actualités Œnologiques 2003, VII^{ème} Symposium International d'Œnologie, 19-21 Juin 2003, BORDEAUX, France.

- 2003 **Perrot L., Dukic S., Charpentier M., Duteurtre B., Duchiron F., and Kaltenbach M.L.** Antihypertensive effect of a low molecular weight fraction (< 1 kDa) of champagne wine in spontaneously hypertensive rats. Journée Jeunes Chercheurs de l'IFR 53, 12 mai 2003, REIMS, France.
- 2001 **Perrot L., Maujean B., Charpentier M., Duteurtre B., Kaltenbach M and Duchiron F.** Inhibitory activity of small peptides found in champagne wine on angiotensin converting enzyme. International Symposium on Functional Foods, Scientific and Global Perspective, 17-19 October 2001, PARIS, France.
- 1999 **Perrot L., Legin E. and Duchiron F.** Isolation and preliminary characterisation of an intracellular aminopeptidase from the hyperthermophilic *Thermococcus hydrothermalis*. *Biochimie* **81** (Suppl. 1), S357. 26th FEBS Meeting, 19-24 June 1999, NICE, France.

Publications :

- 2004 **Perrot L., Charpentier M., Duteurtre B., Duchiron F. and Kaltenbach M.L.** Antihypertensive peptides from foods : a review. *British Journal of Nutrition* **xx**, xxx-xxx (soumis).
- 2004 **De Person M., Sevestre A., Chaimbault P., Perrot L., Duchiron F. and Elfakir C.** Characterization of small peptides in champagne wine by LC-ESI-MS/MS. *Analytica Chimica Acta* (sous-presse).
- 2004 **Perrot L., Dukic S., Ventéo L., Charpentier M., Duteurtre B., Duchiron F., Garnotel R., Pluot M. and Kaltenbach M.L.** Antihypertensive effect of a low molecular weight fraction of champagne wine in spontaneously hypertensive rats after chronic oral administration. *Life Science* (acceptée).
- 2002 **Charpentier M., Perrot L., Kaltenbach M. et Duchiron F.** Des substances libérées par les lies de levures : à la recherche des peptides. *La Vigne* **133** (Juin), 50.
- 2002 **Perrot L., Charpentier M., Charpentier C., Feuillat M. and Chassagne D.** Yeast adapted to wine: Nitrogen compounds released during induced autolysis in a model wine. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **29**, 134-139.

Distinction :

- 2003 **Lauréat du prix scientifique « les Millésimés Europl'Agro » 2003**
 Prix attribué dans le cadre « Prix National du Jeune Chercheur » pour le travail sur le thème : **Recherche d'oligopeptides à activité biologique dans le vin de Champagne. Effet d'un extrait de champagne sur l'hypertension artérielle.**
 Concours organisé par la Fondation du Site Paris-Reims et Europl'Agro (Reims, 51).

LISTE DES ABREVIATIONS

AA Acides Aminés

Acides Aminés :

Ala	Alanine	Ile	Isoleucine
Arg	Arginine	Leu	Leucine
Asn	Asparagine	Lys	Lysine
Asp	Aspartate	Met	Méthionine
Asx	Asn + Asp	Phe	Phénylalanine
Cys	Cystéine	Pro	Proline
Gaba	γ -aminobutyrate	Ser	Sérine
Gln	Glutamine	Thr	Thréonine
Glu	Glutamate	Trp	Tryptophane
Glx	Gln + Glu	Tyr	Tyrosine
His	Histidine	Val	Valine

AOC	Appellation d'origine contrôlée
APC	Acide Protocatéchique
AQC	6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate
α -lg	α -lactalbumine
Ang I	Inhibition de l'effet presseur de l'Angiotensine I
Asp-Phe-OMe	Aspartame
β_2 -m	β_2 -microglobuline
β -lg	β -lactoglobuline
Big ET-1	Big Endothéline 1
Bpm	Battements par minute
$^{\circ}$ C	Degré Celsius
cGMP	Guanosine monophosphate cyclique
EC	Enzymatic Commission
CIVC	Comité Interprofessionnel des Vins de Champagne
cn	Caséine
CO ₂	Dioxyde de carbone
COFRAC	Comité Français d'Accréditation
CRP	Protéine C-Réactive
CV	Coefficient de Variation
DEDL	Détecteur Evaporatif à Diffusion de la Lumière
Delta Psys	Variation de la pression systolique
ECA	Enzyme de Conversion de l'Angiotensine I
ECE	Enzyme de Conversion de l'Endothéline-1
EIA Kit	Kit Elisa
ESI	Ionisation par nébulisation électrostatique
ET-1	Endothéline 1

GRP	Acide 2-S-Glutathionylcaftarique
GTP	Guanosine triphosphate
HAT	Transporteur hétérodimérique basolatéral d'acides aminés
HCl	Acide Chlorhydrique
Hip-His-Leu	Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucine
IC ₅₀	Concentration d'inhibiteur nécessaire pour diminuer de 50 % l'activité ECA
ICOA	Institut de Chimie Organique et Analytique
i.d.	diamètre interne
IL-6	Interleukine-6

Ions :

Ca	Calcium	Mg	Magnésium
Cl	Chlore	Mn	Manganèse
Cu	Cuivre	Na	Sodium
Fe	Fer	Se	Sélénium
I	Iode	Zn	Zinc
K	Potassium		

IP ₃	Inositol triphosphate
INRA	Institut National de Recherche Agronomique
IUPAC-IUB	International Union of Pure and Applied Chemistry-International Union of Biochemistry
kV	kilovolts
LC	Chromatographie Liquide
LDL	Low density lipoprotein
MMP-9	Métallo-protéinase matricielle n°9

Mode d'administration :

i.p.	intra-péritonéale	p.o.	voie orale
i.v.	intraveineuse	s.c.	sous-cutanée

m.s.	Matière sèche
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
NaCl	Chlorure de sodium
ND	Non Déterminé
NO	Monoxyde d'azote
NS	Non Significatif
p.	Protéine
PM	Poids Moléculaire
PepT1	Transporteur peptidique membranaire T1
PepT2	Transporteur peptidique membranaire T2
PS	Pression Systolique
psi	pounds-force/sq-inch (0,5 psi = 0,034 bar)
Pdia	Pression Diastolique
Pmoy	Pression Moyenne
Psys	Pression Systolique
qsp	quantité suffisante pour
R ²	Coefficient de corrélation/détermination
R&D	Recherche et Développement
RSD1	Déviati on Standard Relative

RSD2	DéviatiOn Standard Relative tenant compte du nombre d'essais
rpm	révolutions par minute
s.d.	DéviatiOn standard (ou écart type)
SHR	Rat Spontanément Hypertendu
SHRc	Groupe de rats hypertendus témoins
SHRt	Groupe de rats hypertendus traités
SO ₂	Dioxyde de soufre
SRAA	Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone
S-Type-KO	Fraction < 3 kDa d'un hydrolysate de bonite (par la thermolysine)
TMC	Triméthoxy-cinnamaldéhyde
UF	Ultrafiltration
UMR	Unité Mixte de Recherche

Unités de mesure :

Da	Dalton	mg N	Milligramme d'azote
g	Gramme	mL	Millilitre
L	Litre	mm Hg	Millimètre de mercure
µg	Micro-gramme	mmole	Millimole
µL	Micro-litre	mU	Milli-unité
µM	Micro-molaire	N	Normalité
M	Mole/Litre	nm	Nanomètre
mg	Milligramme	µm	Micro-mètre

URCA	Université de Reims Champagne Ardenne
UV	Ultraviolet
vs.	<i>versus</i> /contre
$\frac{v}{v}$	volume/volume
WKY	Rat normotendu de type Wistar Kyoto
yscA	Protéinase A de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

LISTE DES FIGURES

	Pages	
Figure 1	Traditionnellement, le champagne est élaboré par l'assemblage de ces 3 cépages	7
Figure 2	Formation et action des peptides issus de différents aliments	19
Figure 3	Système de transport des peptides dans un modèle épithélial de cellules intestinales et/ou rénales	22
Figure 4	Représentation schématique du Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (SRAA)	25
Figure 5	Modèle de fixation sur le site actif de l'ECA avec l'inhibiteur captopril (N-[(S)-3-Mercapto-2-methylpropionyl]-L-Proline)	48
Figure 6	Mécanisme vasodilatateur du monoxyde d'azote (NO)	51
Figure 7	Mécanisme régulateur de la synthèse du monoxyde d'azote (NO) et de l'endothéline-1	53
Figure 8	Réaction catalytique de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) avec son substrat synthétique hippuryl-L-histidyl-L-leucine (Hip-His-Leu)	63
Figure 9	Représentation schématique de la mesure de la pression artérielle chez le rat avec un système de mesure non-invasif	70
Figure 10	Principe de la spectrométrie de masse en tandem	76
Figure 11a	Variation de l'absorbance à 228 nm des solutions stop incubées ou non incubées à 37°C pendant 30 minutes en fonction des différentes concentrations en HCl	81
Figure 11b	Variation de l'absorbance à 228 nm des solutions stop suivant le temps d'incubation	81
Figure 12	Cinétique d'hydrolyse du substrat Hip-His-Leu par l'ECA	81
Figure 13	Inhibition de l'ECA par le captopril	83
Figure 14	Activité de l'ECA dans le champagne et ses différentes fractions	84
Figure 15	Activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA mesurée dans des champagnes d'âges différents	85
Figure 16	Concentration en peptides et activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA des différentes fractions issues de la chromatographie du champagne sur gel de Sephadex® LH-20	86
Figure 17	Concentration en peptides et activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA des différentes fractions issues de la chromatographie de l'autolysat sur gel de Sephadex® LH-20	86

Figure 18	Détermination de la vitesse initiale d'une réaction enzymatique et de sa vitesse à l'instant t	89
Figure 19	Coupe histologique du foie d'un rat	102
Figure 20	Cinétique de l'effet antihypertenseur chez le rat SHR après administration unique de l'extrait < 1 kDa	103
Figure 21	Suivi du poids des animaux (a et b), et de leur consommation en granules (c et d) et eau (e et f)	105
Figure 22	Variation du rythme cardiaque chez les rats SHR (a) et WKY (b) au cours de l'administration chronique de l'extrait de champagne	107
Figure 23	Variation de la pression systolique chez les rats SHR et WKY au cours de l'administration chronique de l'extrait de champagne	108
Figure 24	Variation de la pression diastolique chez les rats SHR et WKY au cours de l'administration chronique de l'extrait de champagne	110
Figure 25	Variation de la pression moyenne chez les rats SHR et WKY au cours de l'administration chronique de l'extrait de champagne	111
Figure 26	Mesure de l'activité rénine plasmatique après 28 jours de traitement avec l'extrait de champagne	113
Figure 27	Mesure de l'activité ECA sérique après 28 jours de traitement avec l'extrait de champagne	113
Figure 28	Concentrations sériques en nitrites retrouvées dans le sérum des animaux après 28 jours de traitement avec l'extrait de champagne	114
Figure 29	Concentrations sériques de Big Endothéline-1 après 28 jours de traitement avec l'extrait de champagne	114
Figure 30	Variation des concentrations de Val-Ile au cours du vieillissement du champagne	125
Figure 31	Variation des concentrations de Tyr-Arg au cours du vieillissement du champagne	125

LISTE DES TABLEAUX

	Pages	
Tableau 1	Hydrolysats issus de produits marins et montrant des propriétés antihypertensives	28
Tableau 2	Peptides antihypertenseurs isolés d'hydrolysats de produits marins	29
Tableau 3	Peptides antihypertenseurs isolés d'hydrolysats de produits laitiers	36
Tableau 4	Peptides antihypertenseurs isolés de céréales et de plasmas	40
Tableau 5	Hydrolysats alimentaires montrant une activité antihypertensive	43
Tableau 6	Peptides antihypertenseurs isolés de sources naturelles	44
Tableau 7	Coefficient de corrélation (R^2) vérifiant la linéarité des points à différents temps	82
Tableau 8	Pente des droites établies à différents intervalles de temps	82
Tableau 9	Test de reproductibilité pour le dosage de l'ECA	82
Tableau 10	Test de répétabilité pour le dosage de l'ECA	82
Tableau 11	IC ₅₀ du captopril	84
Tableau 12	Activité inhibitrice de l'ECA des peptides identifiés dans le vin de base	87
Tableau 13	Activité inhibitrice de l'inhibiteur compétitif, captopril	91
Tableau 14	Concentrations en acides aminés de la fraction < 1 kDa (en mmole/L ; extrait concentré 10 fois)	94
Tableau 15	Composition chimique de la fraction < 1 kDa de champagne (concentré 10 fois)	95
Tableau 16	Effet de l'administration chronique de l'extrait de champagne < 1 kDa sur le contenu plasmatique en ions et métaux	112
Tableau 17	Comparaison de la composition du lait écrémé et du lait aigre par rapport à l'extrait de champagne (valeurs calculées pour 100 g)	122
Tableau 18	Peptides inhibiteurs de l'ECA retrouvés dans des champagnes âgés de 1 à 20 ans	124
Tableau 19	Suivi des peptides au cours du vieillissement	125

I NTRODUCTION

L'attachement de l'Homme pour le vin est un fait qui remonte à des temps ancestraux. Les historiens estiment que l'apparition des premiers produits alcoolisés date de l'ère néolithique (9000 ans avant J.C.). Cette époque concorde avec l'apparition des premières sociétés ayant vécu d'agriculture et d'élevage. Les produits alcoolisés furent sûrement la conséquence de fermentations spontanées de végétaux riches en sucres fermentescibles. La « domestication » de la vigne pour en faire du vin est plus récente et débuta en Géorgie sur le rivage oriental de la Mer Noire, au pied des montagnes Caucasiennes (7000 ans avant J.C.).

L'utilisation du vin en tant que remède clinique est apparue un peu plus tard et, déjà dans l'Antiquité, ses vertus médicinales et antiseptiques étaient reconnues. Il a ainsi été retrouvé sur des papyrus égyptiens des ordonnances médicales à base de vin, voire même à base de lies de vin (le papyrus d'Ebers est un des plus anciens manuscrits : 1500 ans avant J.C.). Pour les Grecs, les boissons fermentées étaient quasiment présentes dans tous les régimes prescrits aux malades. Le vin a notamment été utilisé pour faire baisser la fièvre liée à certaines maladies telle que la malaria. Au temps d'Homère (IX^{ème} siècle avant J.C.), les Grecs mélangeaient le natron (carbonate de soude) au vin ou au vinaigre pour obtenir un détergent alcalin et antiseptique afin de nettoyer les plaies. Pour calmer les rhumatismes ou avoir un effet anesthésiant, les Égyptiens avaient recours à une pierre « magique » provenant du désert de Memphis (au Nord de l'Égypte) qui, écrasée et mélangée au vin, produisait de l'acide carbonique. Vers 400 avant J.C., Hippocrate prescrivait le vin à des fins diurétiques et antipyrétiques.

Au Moyen Âge, il arrivait qu'au vin soient incorporées des herbes, des épices et des sécrétions animales pour élaborer des remèdes. En 1471, un ouvrage médical de référence, l'Antidotaire (*Antidotarium Nicolai*), mentionne le vin dans de nombreuses préparations médicamenteuses et le recommande comme adjuvant à l'absorption de près d'un remède sur trois. Lors de la grande épidémie de peste en 1665, le médecin Nathaniel Hodges buvait du vin comme antidote, et affirmait qu'il lui avait sauvé la vie par deux fois lorsqu'il était malade. En 1772, Heberden (un éminent physicien anglais) préconisait de boire du vin pour traiter l'angine de poitrine. En 1892, le professeur Alois Pick, de l'institut de l'hygiène de

Vienne, recommandait d'ajouter du vin à l'eau pour la stériliser et ainsi prévenir les épidémies de choléra. A cette même époque, les vieux vins rouges étaient préconisés pour lutter contre la typhoïde, et le vin blanc contre les maladies du cœur (Norrie 2003). Les effets cardioprotecteurs de la consommation de vin sont donc connus de longue date, mais c'est l'étude de St-Leger *et al.*, publiée en 1979, qui a marqué le début de l'essor considérable des recherches dans le domaine du vin et de son utilisation au niveau médicinal. De fait, St-Leger *et al.* ont mis en évidence pour la première fois, l'existence d'une corrélation inverse entre la consommation de vin dans 18 pays et la mortalité cardiovasculaire. De nos jours, les études épidémiologiques ont montré qu'une consommation régulière et modérée de vin avait un effet bénéfique sur la mortalité, toutes causes confondues (Thun *et al.*, 1997).

Toutefois, il est à noter que les produits alcoolisés peuvent être à l'origine d'effets délétères si leur consommation est excessive. Au XIX^{ème} siècle, Louis Pasteur disait « Le vin est la plus saine et la plus hygiénique des boissons ». Aux époques antiques et médiévales, Pasteur aurait paru inattaquable par les médecins. En effet, cela ne signifie pas que le vin n'est censé avoir que de bons effets. Déjà au temps de l'Ecole de Salerne (célèbre école de médecine italienne du IX^{ème}–XII^{ème} siècle), comme aujourd'hui, on préconisait la sagesse dans la consommation du vin. Comme l'a dit Paracelse (*Philipp Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim* de son nom d'origine, philosophe, alchimiste et médecin suisse diplômé de l'Ecole de Salerne, 1493-1541) : « *Dosis Sola Facit Venenum* », signifiant que seule la dose fait le poison (Norrie 2003).

A l'heure actuelle, différents types de maladies liées à une consommation excessive d'alcool ont été répertoriés :

- ↳ Maladies alcooliques du foie (stéatose, hépatite, cirrhose...),
- ↳ Affections du système nerveux (troubles du comportement, accidents, violences...),
- ↳ Atteintes du système cardiovasculaire (hypertension artérielle, insuffisance cardiaque, troubles circulatoires...),
- ↳ Retards de croissance lors d'une exposition prénatale, mais aussi dysmorphie cranofaciale, troubles neuro-comportementaux... comme décrits par le syndrome fœtal alcoolique,
- ↳ Cancers (voies aérodigestives supérieures, estomac...).

Une alcoolisation chronique (> 30 g d'alcool/jour) est responsable d'une augmentation de morbidité et de mortalité par les maladies précédemment citées. Ainsi, il nous est régulièrement rappelé que « l'abus d'alcool est dangereux pour la santé ». En France en 1998, l'alcool représentait la cause de 4,3 % de l'ensemble des décès (hors mort violente : accidents, suicides...), soit 23 000 décès. Les conséquences de l'usage de boissons alcooliques sur la santé dépendent, toutefois, de la susceptibilité du consommateur, de son mode de consommation et surtout des quantités consommées (Rimm *et al.*, 1999 ; Inserm, 2001).

Bien avant que la médecine ne se soit engagée dans les campagnes anti-alcooliques, elle avait prêché pendant des millénaires les vertus médicinales du vin car cet « élixir » a longtemps été considéré comme la substance précieuse dont l'Homme disposait pour lutter contre ses maux. La découverte des propriétés biologiques du vin n'est donc pas récente et les recherches actuelles se focalisent notamment sur la compréhension des mécanismes entourant cette ancienne médecine et sur les quantités à ne pas dépasser afin d'obtenir les effets bénéfiques sans les effets indésirables.

D'après la littérature récente, certains auteurs rapportent que les effets biologiques du vin seraient plutôt dus à un effet éthanol prépondérant (Schlienger 2001). Une consommation modérée d'éthanol serait associée à une diminution du risque de maladies cardiovasculaires. Ces propriétés protectrices sont liées aux changements à la fois des paramètres lipidiques et hémostatiques sanguins, ainsi qu'à une prévention des phénomènes conduisant à l'athérosclérose (Martin *et al.* 2001). Malheureusement, les mécanismes par lesquels l'alcool exerce ces effets protecteurs ne sont pas encore élucidés.

De par sa composition complexe, le vin serait capable de conférer des bénéfices supplémentaires, grâce notamment aux composés phénoliques et aux polyphénols. Les polyphénols sont les molécules anti-oxydantes les plus abondantes de notre alimentation et sont présents dans le vin (800-4000 mg/L pour les vins rouges et 50-350 mg/L pour les vins blancs, Cheynier *et al.* 1998). Ces agents réducteurs ont montré qu'ils pouvaient protéger l'organisme contre le stress oxydatif et certaines pathologies associées, telles que les maladies cardiovasculaires et l'inflammation (Tapiero *et al.* 2002). Ces composés auraient aussi d'autres effets : ils pourraient prévenir la formation de plaques d'athérosclérose, posséder des effets antithrombotique, antihypertenseur et antiarythmique, et induire une diminution de l'agrégation et de l'adhésion plaquettaire (Formica & Regelson 1995 ; German & Walzem 2000 ; Wallerath *et al.* 2003). Il semble de plus en plus évident que les propriétés cardio-

protectrices du vin soient essentiellement dues à la présence prépondérante des composés phénoliques (acides phénols, polyphénols, flavonoïdes...).

D'autres composés, tels que les vitamines, sont présents dans les vins et peuvent être à l'origine de certaines propriétés biologiques. L'acide ascorbique et la pyridoxine, présents à des concentrations variables suivant les vins (Cabanis & Flanzy 1998), sont capables de diminuer l'hypertension des rats spontanément hypertendus (SHR) ainsi que celle de patients (Duffy *et al.* 1999 ; Vasdev *et al.* 2002). La supplémentation diététique en ces deux vitamines a permis de mettre en évidence leur association avec une diminution du risque de survenue de maladies cardiovasculaires (Vasdev *et al.* 2002). Des peptides, pouvant présenter différentes activités biologiques, sont aussi retrouvés dans le vin. Les peptides bioactifs ont d'ailleurs été très étudiés au cours de ces 20 dernières années, et notamment ceux possédant un effet anti-hypertenseur (Yamamoto 1997).

Très sensible à la qualité de ses champagnes, la société Moët & Chandon porte un intérêt tout particulier à l'actualité scientifique du domaine vin et santé. Des travaux réalisés en interne ont rapporté que le champagne disposerait d'une activité antioxydante due à la présence de certains composés phénoliques. Bien qu'en faible concentration dans le champagne (42-77 mg/L, Chamkha *et al.* 2003), une meilleure connaissance de ces molécules a suscité l'intérêt de la société. A l'heure actuelle, une thèse, traitant des propriétés biologiques des composés phénoliques du champagne, est en cours de réalisation (thèse réalisée au Laboratoire de Pharmacognosie de Montpellier sous la responsabilité de Mr Vercauteren et commanditée par le C.I.V.C.).

Les peptides, présentant un grand intérêt par leurs propriétés biologiques, sont particulièrement bien représentés dans les vins de Champagne tant par leur diversité que par leur concentration (518-767 mg/L, Desportes 1999). Les études sur les peptides ont débuté chez Moët & Chandon en 1995 pour tenter de montrer leur implication dans la saveur des champagnes. Leurs nombreuses propriétés biologiques décrites dans la littérature ont suscité un nouvel axe de recherche qui fait aujourd'hui, l'objet de cette thèse.

C

HAPITRE I. ETAT DE L'ART

1 L'ENTREPRISE MOËT & CHANDON

1.1 HISTORIQUE

Avant d'être mondialement connue pour ses vins effervescents, la région de Champagne a longtemps été réputée pour ses vins tranquilles blancs, gris et rouges. C'est officiellement en 1743 que Claude Moët, descendant d'une vieille famille champenoise, négociant et commissionnaire en vin, crée à Epernay la maison Moët. Lui succèdent son fils, Claude-Louis Nicolas, puis son petit-fils Jean-Rémy Moët. Ce dernier prend la direction de la maison en 1792 et la cède en 1832 à son fils, Victor, et à son gendre, Pierre-Gabriel Chandon. Elle prend alors la dénomination de Moët & Chandon. Les générations suivantes ont poursuivi le développement de la maison en améliorant les techniques vitivinicoles tout en tissant un réseau commercial en France et à l'étranger.

1.2 MOËT & CHANDON EN QUELQUES CHIFFRES...

La société Moët & Chandon contrôle à la fois la production des champagnes Moët & Chandon, Mercier, Dom Pérignon et Ruinart. Elle est le leader mondial de la profession et occupe la première place sur les marchés de l'exportation (38 % des parts de marché aux Etats-Unis et au Japon et 56 % en Espagne en 1999).

Moët & Chandon est également :

- ↳ Le vignoble le plus important de la Champagne avec 772 hectares en exploitation,
- ↳ 1047 personnes en France,
- ↳ 54 km de caves (toutes marques confondues),
- ↳ 270 000 visites des caves (toutes marques confondues),
- ↳ 34 millions de bouteilles vendues annuellement,
- ↳ 850 millions € de chiffre d'affaire en 2002.

1.3 LE LABORATOIRE DE RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT

A l'heure actuelle, l'entreprise Moët & Chandon est la seule maison de champagne à disposer d'un laboratoire de Recherche et Développement (R&D) qui lui est propre.

Les principales thématiques scientifiques actuelles du laboratoire sont les suivantes :

- ↳ La stimulation des défenses naturelles de la vigne,
- ↳ L'étude des maladies du bois et la protection contre ces maladies,
- ↳ La maîtrise de l'oxydation des champagnes,
- ↳ L'effervescence des vins de Champagne,
- ↳ L'identification de souches de bactéries et de levures dans les moûts et vins,
- ↳ La maîtrise du taux de carbamate d'éthyle dans champagne,
- ↳ L'étude des propriétés biologiques des vins de Champagne.

Pour l'entreprise, le rôle du laboratoire de R&D est primordial afin d'aider celle-ci à maîtriser au mieux chaque étape du processus d'élaboration du champagne et améliorer la qualité de ses produits.

2 L'ELABORATION DU CHAMPAGNE

Le champagne est une exception parmi les vins d'appellation d'origine contrôlée (AOC) français. En effet, il est le seul qui ne porte pas cette mention sur son étiquette, le seul nom de champagne étant censé être une garantie.

A vin d'exception, terroir unique : ainsi climat, sol et cépages s'accordent avec plénitude pour donner le champagne. D'un côté, la douceur atlantique alterne en Champagne avec la rigueur continentale. Le vignoble champenois, le plus septentrional de France, compose avec la nature (orages, grêle, gelées tardives) pour que le raisin parvienne à maturité. Et d'un autre côté, le sol crayeux, dans lequel la vigne plonge ses racines, retient le soleil puis lui restitue la chaleur ou l'humidité, servant ainsi de régulateur au bon développement des trois cépages (issus de la même espèce, *Vitis vinifera*) qui composent le vignoble champenois, à savoir : le chardonnay, le pinot noir et le pinot meunier (Figure 1).

De manière générale, l'élaboration du champagne suit un processus complexe, très exigeant, aux étapes délicates et multiples. Chaque étape du processus est cruciale pour le bon

développement des différents caractères qui donneront au champagne son goût, son bouquet, sa mousse...

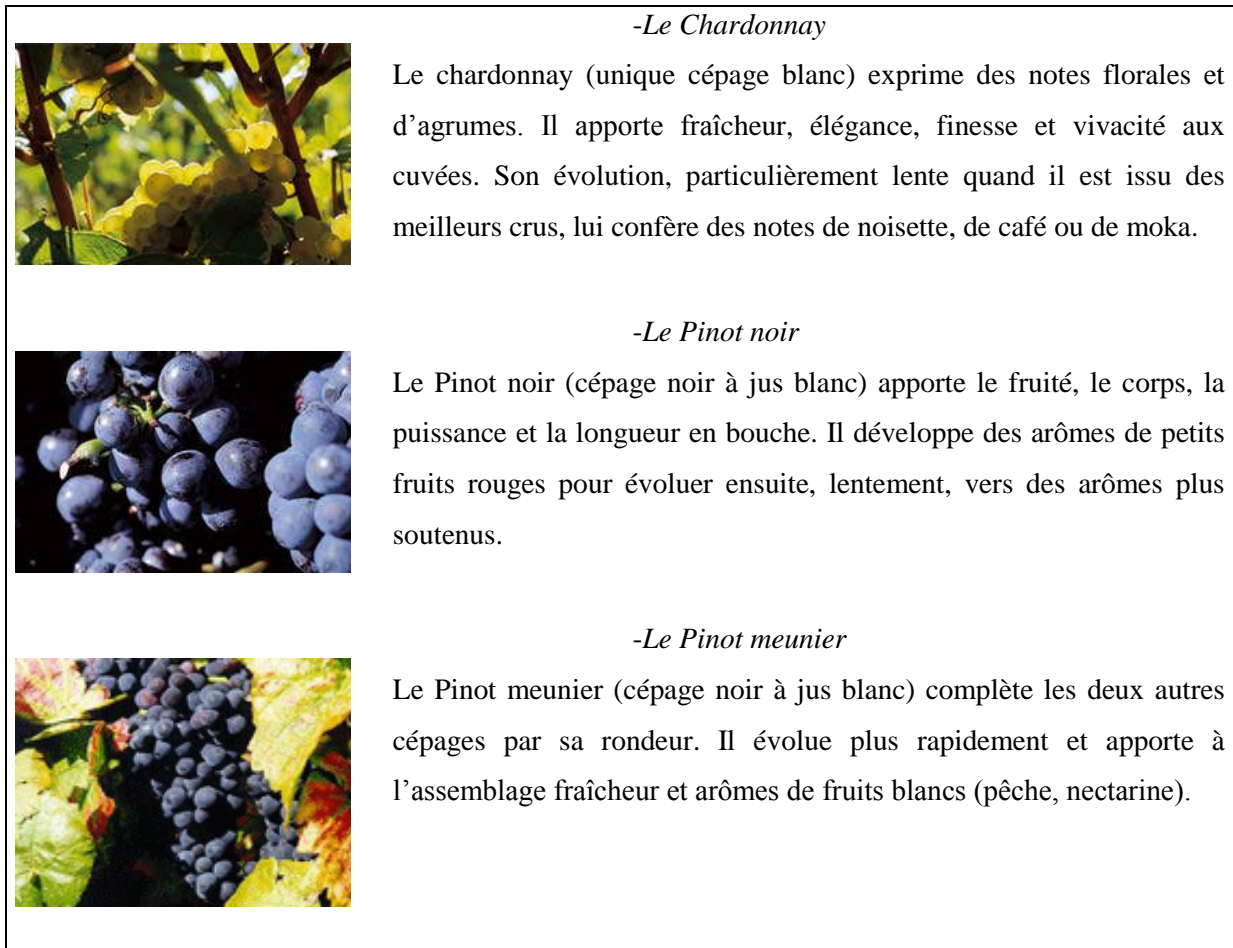


Figure 1. Traditionnellement, le champagne est élaboré par l'assemblage de ces 3 cépages.

Le processus d'élaboration du champagne va suivre les grandes lignes suivantes :

- ↳ **La vendange** : est manuelle, pour éviter toute altération de la baie de raisin qui doit parvenir intacte au pressoir et éviter ainsi une extraction de matières tanniques et/ou colorantes de la pellicule dans le jus de raisin (ou « moût »).
- ↳ **Le pressurage** : est doux (faible pression) et progressif, la pression exercée sur le grain ne doit pas excéder celle exercée entre le pouce et l'index. A l'issue du pressurage, les moûts obtenus sont protégés contre l'oxydation et le développement de la flore endogène par addition d'anhydride sulfureux (SO₂).

- ↳ **La fermentation alcoolique** : les levures sélectionnées, appartenant à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, sont inoculées (2 à 3.10^6 cellules/mL) dans les moûts pour provoquer la fermentation alcoolique. Celle-ci transforme le sucre contenu dans le moût en éthanol et en gaz carbonique conformément au bilan de Pasteur. Cette fermentation conduit à l'obtention d'un vin de base à 10,5-11 % d'alcool en fin de fermentation. Lorsqu'il n'y a pas assez de sucre présent dans le moût, l'AOC champagne tolère la chaptalisation. La fermentation alcoolique est suivie d'un soutirage dans le but d'éliminer les lies constituées de levures mortes.
- ↳ **La fermentation malolactique** : la fermentation malolactique est provoquée quasiment systématiquement. L'acide malique, un diacide, est converti en un monoacide-alcool, l'acide lactique, sous l'action des bactéries lactiques appartenant à l'espèce *Enococcus œni* permettant ainsi de réduire l'acidité et d'obtenir des vins plus souples par une remonté du pH.
- ↳ **L'assemblage** : les vins sont analysés (sucre restant, titre alcoolémique, acidité volatile, SO₂, acides organiques...) puis dégustés systématiquement afin de constituer les pré-assemblages homogènes qui seront utilisés lors de l'assemblage de la cuvée.
- ↳ **Le tirage** : le vin de base est additionné :
- De liqueur de tirage, c'est-à-dire, du sucre dans du vin de base.
 - De levures sélectionnées appartenant à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* (1.10^6 à 2.10^6 cellules/mL). Ces levures ont été préalablement adaptées au milieu vin pour permettre le bon déroulement de la prise de mousse,
 - D'adjuvants de remuage (bentonite, alginate).
- Ensuite, le vin sera mis en bouteille et les bouteilles seront entreposées en cave, à l'horizontale (dit aussi « sur lattes »).
- ↳ **La prise de mousse** : sous l'action des levures, le sucre est transformé en éthanol et CO₂ conformément au bilan Pasteur et confère ainsi l'effervescence et la mousse au champagne. La transformation du sucre ajouté permet d'obtenir une pression de 5 à 7 atmosphères dans une bouteille de champagne et d'accroître la teneur en alcool de 1,3 à 1,5 %.
- ↳ **Le vieillissement** : le vieillissement « sur lattes » favorise les échanges entre le dépôt de levures (ou « lies ») et le vin. La durée du vieillissement est de 15 mois minimum (comme l'exige la législation) pour les cuvées courantes et

de 36 mois minimum pour les millésimes. Les propriétés sensorielles du vin évoluent lors du vieillissement sur lies. Des arômes spécifiques de brioche, de miel, de fruits secs, de grillé, de torréfaction apparaissent alors.

↳ **Le dégorgement et la commercialisation** : lors de la prise de mousse, les levures forment un léger dépôt à l'intérieur de la bouteille. Le remuage permet de concentrer ce dépôt et de le faire glisser jusqu'au goulot, afin de clarifier le vin. Le dépôt de levure est ensuite éliminé au cours du dégorgement, par expulsion, grâce à la pression interne, dès l'ouverture des bouteilles. Les bouteilles sont ensuite dosées par ajout d'une liqueur d'expédition composée de vins de réserve et de sucre. Les quantités de liqueur ajoutées sont fonction du type de champagne (sec, demi-sec, brut, extra-dry). Un bouchon de liège, coiffé d'une plaque de muselet et d'un muselet en fil métallique, vient fermer la bouteille et protéger le vin en préservant la richesse de ses arômes. Les bouteilles sont ensuite parées de leur collerette et de leur étiquette, puis conditionnées pour l'expédition.

A cette succession d'étapes, chaque grande maison de champagne y apportera sa touche personnelle de manière à perpétuer son style, signature de chaque marque.

Si on devait citer les raisons majeures qui font la qualité des champagnes, on citerait la spécificité de son vignoble, l'art de l'assemblage et plus particulièrement le long vieillissement sur lies car il apporte au champagne des arômes spécifiques et permet l'épanouissement progressif des arômes de maturité et de plénitude, mais l'évolution du bouquet n'est ici que la partie émergente de l'iceberg.

3 LE VIEILLISSEMENT SUR LIES

Le traditionnel élevage sur lies de levures se pratique depuis longtemps pour le champagne. Ce mode d'élevage consiste à faire vieillir le champagne en présence de ses lies. Au cours du vieillissement, sa composition chimique et biochimique va évoluer de manière significative grâce à l'autolyse des levures et aux phénomènes d'oxydo-réductions.

3.1 L'AUTOLYSE DES LEVURES

L'autolyse, selon Arnold (1981), correspond à la solubilisation des substances cellulaires après la mort des levures et est due à l'action d'enzymes endogènes. Pour Babayan *et al.* (1981), l'autolyse est suivie de la libération de composés de faible masse moléculaire. Lors de ce lent processus, il n'y a pas rupture de la paroi cellulaire, mais des modifications de composition et de structure apparaissent (Vosti & Joslin 1954). Ainsi, après 12 mois de vieillissement, les levures d'un vin effervescent espagnol (cava) ont montré de forts changements au niveau morphologique sans, toutefois, solubiliser complètement leur contenu cytoplasmique (Martínez-Rodríguez *et al.* 2001). Dans les champagnes, les études ont montré qu'après 15 ans de vieillissement sur lies, l'épaisseur des parois levuriennes se trouvait fortement diminuée et que leur composition lipidique se trouvait réorganisée, mais qu'il n'y avait pas rupture de celle-ci (Piton *et al.* 1988 ; Troton *et al.* 1989).

3.2 LIBERATION DE METABOLITES

Au cours du vieillissement sur lies, suite à la perte de viabilité des cellules, l'autolyse des levures s'accompagne d'une libération de composés intracellulaires et pariétaux. Ce relargage est régi suivant 3 composantes principales :

- ↳ **La protéolyse** : il s'agit d'une des conséquences des plus manifestes de l'autolyse. Elle correspond à l'hydrolyse des protéines *via* les protéases levuriennes libérées et permet l'enrichissement du vin en métabolites azotés, tels que les peptides et les acides aminés (Lurton 1988 ; Lurton *et al.* 1989 ; Sato *et al.* 1997).
- ↳ **La dégradation de la paroi** : elle résulte de l'action directe de la protéolyse sur des composantes pariétales de la levure et notamment sur les mannoprotéines qui composent la paroi (Feuillat 2003).
- ↳ **La diminution du poids sec** : ce phénomène de relargage de composés cellulaires est lié à la déstructuration des parois et il est corrélé à une diminution de la teneur en matière sèche totale des lies au cours du temps (Ferrari & Feuillat 1988 ; Leroy *et al.* 1990 ; Fornairon-Bonnefond *et al.* 2001 ; Perrot *et al.* 2002).

Ces trois composantes régissent le phénomène appelé « capacité d'autolyse » des levures. Cette capacité autolytique est exprimée en quantité d'azote soluble libérée par gramme d'extrait sec de levure pendant 48 heures, en milieu hydroalcoolique et à 37°C (Charpentier *et al.* 1986 ; Leroy *et al.* 1990).

Selon les études réalisées sur le sujet (Hough & Maddox, 1970 ; Arnold 1981 ; Babayan & Bezrukov 1985 ; Kelly-Treadwell 1988 ; Charpentier & Feuillat 1993 ; Aussenac *et al.* 2001 ; Fornairon-Bonnefond *et al.* 2001), les macromolécules dégradées au cours de l'autolyse sont les protéines, les polysaccharides, les lipides et les acides nucléiques. Les produits d'hydrolyse correspondants sont des peptides, acides aminés, mannoprotéines, oligosaccharides, diglycérides, monoglycérides, acides gras, oligonucléotides, nucléotides et nucléosides.

3.2.1 Les composés azotés

La fraction azotée contenue dans le raisin et le vin est connue pour ses variations plus ou moins importantes suivant la région, le cépage, les amendements, les conditions climatiques, le degré de maturité et le mode de vinification (Bourdet & Herard 1958 ; Cordonnier 1966 ; Feuillat 1974 ; Carnevillier *et al.* 1999 ; Fukui *et al.* 2002 ; Yokotsuka & Fukui 2002 ; Soufleros *et al.* 2003 ; Pozo-Bayón *et al.* 2004). Cette fraction comprend l'azote minéral (sels ammoniacaux) et l'azote organique (acides aminés, protéines, peptides, vitamines et nucléotides).

Au cours de l'autolyse dans le champagne, la libération des composés azotés a été mise en relation avec des activités protéolytiques intracellulaires (Feuillat & Charpentier 1982). Leroy *et al.* (1990) ont corrélé la perte de biomasse sèche au cours de l'autolyse dans les vins avec une diminution en composés azotés contenus dans cette matière sèche et l'activité protéolytique intracellulaire. L'étude des constituants libérés a montré une augmentation en composés azotés (dont les acides aminés) au cours du vieillissement. Une autre étude a confirmé la libération lente d'azote, provenant de protéines et d'acides aminés, au cours de l'autolyse des levures dans les vins effervescents (Todd 1996). L'étude de la libération des composés azotés au cours de l'autolyse, sur milieu modèle et sur milieu vin, a permis de mettre en évidence, en premier lieu, un relargage des protéines et des peptides, suivi plus tard d'une hydrolyse enzymatique extracellulaire de ces composés en acides aminés libres (Babayan & Bezrukov 1985 ; Moreno-Arribas *et al.* 1996, 1998b ; Martínez-Rodríguez & Polo 2000).

3.2.2 Les acides aminés

L'azote aminé libre, présent dans le vin, constitue 20 à 32% de l'azote total (Poux & Ournac 1970 ; Feuillat 1973). Au cours du vieillissement sur lies, une augmentation de la quantité d'acides aminés est observée, et il a été clairement démontré que cette augmentation continue était due à une faible activité protéasique stable mais persistante dans le vin (Sato *et al.* 1997).

3.2.3 Les protéines

Les protéines sont présentes dans les vins en faible concentration. L'azote protéique constitue 3 à 10 % de l'azote total des vins (Feuillat 1976 ; Ferreira *et al.* 2002). Les concentrations protéiques des vins de Champagne sont situées aux alentours de 25 mg/L (Gizy Andriamanantena 1984). Les protéines du vin proviennent aussi bien du raisin que des levures. Les protéines du raisin sont des molécules de masse moléculaire supérieure à 10 kDa, à caractère colloïdal. Dans les vins, les protéines issues des levures sont principalement associées à des polysaccharides (mannoprotéines pariétale).

La libération de protéines et d'acides aminés au cours du vieillissement sur lies est généralement considérée comme étant l'un des aspects les plus importants de l'autolyse des levures (Hough & Maddox 1970). La présence d'une activité protéasique intracellulaire se retrouve au cours de l'autolyse (Kelly-Treadwell 1988 ; Perrot *et al.* 2002).

3.2.4 Les peptides

Peu d'études ont été réalisées sur les peptides du vin. Pourtant, cette fraction représente 25 à 40 % de l'azote total d'après Feuillat (1973, 1976). Leur présence dans les vins de Koshu, Neomuscato et Muscato Bailey A est respectivement de 137, 904 et 325 mg/L (Yokotsuka *et al.* 1975a). L'analyse structurale des peptides de vin de Koshu a montré que ceux-ci étaient de petite taille (Yokotsuka *et al.* 1975b). Dans les champagnes, l'étude de la fraction peptidique < 3000 Da (pour des cuvées âgées de 3 à 19 ans) a révélé la présence de ces composés à des concentrations allant de 70 à 100 mg/L d'azote peptidique (Desportes 1999). Les études sur les vins effervescents espagnols ont montré la présence de 56 mg/L d'azote peptidique pour des vins de cépage Chardonnay ayant vieilli de 9 à 18 mois (Moreno-Arribas *et al.* 1996). Dans les vins effervescents de cépage Parellada, la taille des peptides n'excède pas 25 résidus

(Moreno-Arribas *et al.* 1998a). Plus récemment, Martínez-Rodríguez & Polo (2000) ont montré que la majorité des peptides libérés au cours de l'autolyse en milieu vin modèle étaient de poids moléculaire inférieur à 700 Da.

3.2.5 Origine des peptides du Champagne

Trois hypothèses ont été proposées sur l'origine des peptides du vin :

- ↳ Ils peuvent provenir du raisin, dont certains doivent être partiellement ou totalement métabolisés au cours des fermentations,
- ↳ Ils peuvent être excrétés par les levures vivantes en fin de seconde fermentation ou libérés lors de l'autolyse des levures par le phénomène de protéolyse,
- ↳ Ils peuvent être issus de la dégradation enzymatique des protéines du vin, à condition que celles-ci soient hydrolysables.

Des études récentes sur le sujet (Moreno-Arribas *et al.* 1996 ; Desportes 1999) tendent à montrer que l'origine des peptides serait levurienne. Au cours de l'élaboration des vins selon la méthode champenoise, Moreno-Arribas *et al.* (1996) remarquent que la quantité d'azote peptidique augmente au contact des levures lors de la prise de mousse. Cette variation serait plus particulièrement due à une augmentation de la quantité d'oligopeptides (2 à 10 résidus acides aminés) car les quantités de polypeptides et de protéines restent stables (Colagrande *et al.* 1984). Carnevillier (1999) montre que les vins sont beaucoup plus riches que les moûts en peptides, ces derniers étant essentiellement d'origine levurienne et commençant à être libérés en fin de fermentation alcoolique. Lors du vieillissement, ce relargage peptidique s'intensifie avec le processus d'autolyse et est corrélé à une activité protéolytique (Feuillat & Charpentier 1982 ; Silva *et al.* 1987 ; Lurton & Guerreau 1988 ; Kelly-Treawell 1988 ; Alexandre *et al.* 2001).

Les protéines retrouvées dans les vins sont considérées comme étant résistantes aux enzymes protéolytiques. La diminution de leur quantité au cours du vieillissement est imputée à leur insolubilisation du fait de la forte concentration en éthanol et de la bentonite ajoutée dans les bouteilles (Luguera *et al.* 1997 ; Ferreira *et al.* 2002). De ce fait, à moins d'être infirmée, cette hypothèse sur l'origine des peptides ne peut donc pas être prise en compte.

3.3 ACTIVITES ENZYMATIQUES AU COURS DE L'AUTOLYSE

3.3.1 Généralités

Saccharomyces cerevisiae dispose d'un équipement d'enzymes hydrolytiques très diversifié (Achstetter & Wolf 1985) dont certaines sont susceptibles d'intervenir au cours de l'autolyse.

Parmi ces enzymes, deux β -glucanases joueraient un rôle important dans la dégradation de la paroi de la levure (Arnold 1972). Ces deux enzymes ont une action endo-, l'une est spécifique des liaisons β -1,6, et l'autre des liaisons β -1,3 des glucanes. D'autres enzymes sont impliquées dans le processus de relargage. Parmi celles-ci, il y a des protéases, des lipases, des phospholipases et/ou des ribonucléases (Todd 1996). Le relargage de peptides au cours de l'autolyse pourrait donc être imputé aux activités protéolytiques de la levure.

3.3.2 Activités protéolytiques

La levure *Saccharomyces cerevisiae* dispose d'un grand nombre de protéases localisées dans différents compartiments (cytosol, vacuoles, mitochondries, réticulum endoplasmique et appareil de Golgi) et dans les membranes. Les protéases sont de plusieurs natures. Elles regroupent les endoprotéinases, les carboxypeptidases, les aminopeptidases et les dipeptidyl-aminopeptidases (Achstetter *et al.* 1981, 1983, 1984 ; Achstetter & Wolf 1985 ; Jones 1984). Le compartiment vacuolaire permet de stocker certaines protéases impliquées dans le métabolisme peptidique de la levure (carboxypeptidases S et Y) ainsi que dans l'activation et/ou la dégradation des protéines (protéinases A et B, aminopeptidases I et Y ; Jones *et al.* 1997).

Parmi cet équipement se trouve la protéinase yscA, laquelle, selon Lurton (1987), jouerait un rôle déterminant au cours de l'autolyse dans la libération de peptides et, indirectement, d'acides aminés. La protéinase A est une endoprotéinase acide (EC : 3.4.23.25, enzyme de type aspartyl-endoprotéinase), glycosylée qui transite *via* le réticulum et l'appareil de Golgi jusqu'à la vacuole où elle est stockée (Klionsky *et al.* 1988). Sa masse moléculaire est de 42 kDa et son rôle dans la cellule est de catalyser (au même titre que la protéinase B) des clivages protéolytiques requis pour la maturation des hydrolases vacuolaires. Elle peut participer à la dégradation des protéines lors de la croissance ou en état de carence végétative des cellules lorsqu'elles sont sporulantes (Zubenko & Jones 1981 ; Teichert *et al.* 1989).

Actuellement, aucune activité enzymatique extracellulaire n'a pu être détectée chez *Saccharomyces cerevisiae* en cours de fermentation. Cette levure n'est pas reconnue comme

étant productrice de protéases extracellulaires (Lagace & Bisson 1990 ; Charoenchai *et al.* 1997). Les seules fois où une activité a été détectée furent lorsqu'une protéase était surexprimée (Wolff *et al.* 1996).

3.4 IMPORTANCE DES ACTIVITES HYDROLYTIQUES AU COURS DE L'AUTOLYSE

L'autolyse implique une diminution du maillage pariétal de la levure qui va laisser apparaître des pseudo canaux assez grands pour permettre l'échange de petites molécules, comme par exemple, des peptides (Babayán & Bezrukov 1985). L'éthanol favorise la désorganisation de la membrane vacuolaire et la libération des protéases dans le milieu intracellulaire. Les inhibiteurs protéiques (qui sont des polypeptides de taille comprise entre 7 et 9 kDa) sont dégradés par les protéases elles-mêmes (Jones 1983) et elles deviennent alors actives. Cependant, au pH acide des vins, seule la protéase A semble être active (Jones, 1991). Celle-ci est capable de réguler sa propre activation *via* la combinaison de différents facteurs, pH bas, concentrations en sels, etc..... (van den Hazel *et al.* 1996). Selon Lurton (1988), la protéase A joue un rôle déterminant dans le processus protéolytique au pH du vin. Son action se traduit par une libération intense de peptides au cours de l'autolyse lors de l'élevage des vins sur lies. Il semble donc établi que la protéase A est l'enzyme responsable de la dégradation des protéines de levures en peptides au cours de l'autolyse.

4 LES ROLES POSSIBLES DES PEPTIDES

Au regard de la littérature scientifique existante sur les peptides et l'alimentation, plusieurs rôles leur ont été attribués. Ainsi, de nombreuses études ont montré leur part de responsabilité dans la saveur des aliments, les phénomènes d'émulsion et certaines activités biologiques.

4.1 IMPLICATION DES PEPTIDES AU NIVEAU DE LA SAVEUR DES ALIMENTS

La saveur (ou le goût) est définie par la perception d'un composé chimique mis en contact avec les bourgeons gustatifs de la langue. A l'heure actuelle, la saveur peut être décrite suivant 5 caractères : sucré, salé, acide, amer et « umami ». Le goût umami, qui signifie

délicieux en japonais, est comparable à un goût de bouillon et est représenté par la saveur du glutamate de sodium (Roudot-Algaron 1996).

Les études réalisées sur les peptides ont montré que ces derniers semblent avoir une influence sur le goût d'un grand nombre de denrées alimentaires. Il a notamment été montré que le goût amer, apparaissant au cours de l'affinage des fromages et pendant la fermentation de produits traditionnels japonais (miso, sauce de soja), était dû aux peptides présents dans les hydrolysats de protéines (Roudot-Algaron 1996). L'étude de composition des peptides amers a permis de mettre en évidence la présence d'acides aminés hydrophobes en relation avec l'amertume (Wieser & Belitz 1976 ; Ishibashi *et al.* 1987*a,b*). D'après Ishibashi *et al.* (1988), les peptides composés d'acides aminés ayant une longue chaîne latérale (supérieure à 3 atomes de carbone) montrent des saveurs amères.

D'après Kirimura *et al.* (1969) et Kato *et al.* (1989) des peptides contenant des acides aminés acides (Asp ou Glu) sont reconnus acides. D'autres peptides de synthèses, ont montré des saveurs proches de celle du glutamate de sodium, composé de référence de la saveur umami (Ohyama *et al.* 1988). Concernant la saveur sucrée, le peptide « sucré » le plus connu est l'aspartame (Asp-Phe-OMe), découvert par Mazur *et al.* en 1969. L'aspartame dispose d'un pouvoir sucrant 180 fois supérieur à celui du saccharose et par conséquent, se trouve être beaucoup moins calorique.

Bien que la saveur individuelle des peptides soit aisée à caractériser, il semble cependant moins évident de démontrer leur contribution respective dans la saveur des aliments. Les études réalisées sur les fromages montrent que, d'un côté, les oligopeptides ne contribueraient qu'à la production d'arômes (Molina *et al.* 1999 ; McSweeney & Sousa 2000), et, d'un autre côté, les oligopeptides ne présenteraient pas de relation directe avec l'activité gustative, notamment ceux < 500 Da (Engel *et al.* 2000 ; Salles *et al.* 2000). Néanmoins, des pistes en faveur d'effets de synergie entre les peptides, les acides aminés et certains sels minéraux sont encore à prendre en considération pour leur effet sur la saveur (Wang *et al.* 1996).

Les saveurs engendrées par les peptides peuvent donc être amère, sucrée, acide ou umami. A l'exception du salé, toutes ces saveurs se retrouvent dans les vins. Récemment, huit oligopeptides isolés du vin de base ont été identifiés. La dégustation de ces peptides dans l'eau a permis de reconnaître trois saveurs, quatre peptides se sont montrés amers, un tripeptide a montré une saveur acide et un autre tripeptide une saveur umami (Desportes *et al.* 2001). Concernant les champagnes, Leroy *et al.* (1990) ont montré que l'activité protéasique maximale des levures est atteinte pour un temps de vieillissement de six ans, ce qui coïncide avec l'obtention d'un vin de Champagne aux qualités organoleptiques optimales. Ces travaux

établisent une relation possible entre l'activité protéolytique, la libération de peptides et leur probable implication au niveau organoleptique.

4.2 ROLE POTENTIEL DES PEPTIDES AU NIVEAU DE L'EMULSION

Quoique beaucoup d'études aient été réalisées sur les propriétés organoleptiques des peptides alimentaires, la nécessité d'informations sur les propriétés physico-chimiques de ces peptides et leur influence sur la fonctionnalité des protéines est apparue nécessaire. De fait, la compréhension des mécanismes stabilisateurs et des propriétés rhéologiques des peptides dans les aliments multiphasiques (de type yaourt, glace, crème fouettée, mayonnaise, etc...) est importante afin d'appréhender au mieux la formulation et la nature des interactions qui existent entre les différents constituants moléculaires. Pour les industriels de l'agroalimentaire, les peptides montrent des propriétés émulsifiantes et moussantes intéressantes (Lakkis & Villota 1990 ; Haque 1991 ; Sánchez-Vioque *et al.* 2001, 2004). Les considérations structurales et compositionnelles des peptides permettraient ainsi de mieux comprendre certains effets de texture et de goût.

L'émulsion et la mousse sont deux termes assez similaires en théorie or, en pratique, leur comportement est différent. Une émulsion est une dispersion stable d'un liquide dans un deuxième liquide non miscible (tel que l'huile dispersée dans l'eau pour citer un exemple connu), alors que la mousse est un système biphasique de type émulsion où la phase dispersée est un gaz et la phase non miscible un liquide, un solide ou un gel (définitions selon l'IUPAC, sur le site www.iupac.org).

Au regard de la littérature, de nombreuses études ont été réalisées sur les peptides et leurs propriétés physico-chimiques dans les produits laitiers. Ils ont été très étudiés pour leur effet stabilisateur de l'activité émulsifiante vis-à-vis des propriétés d'interface de certaines protéines, telle la β -lactoglobuline (Haque 1991 ; Turgeon *et al.* 1992). Jusqu'à aujourd'hui, les recherches effectuées sur différents produits alimentaires (produits laitiers, céréales, bières et vins, etc...) ont montré que ces peptides doivent avoir une longueur de chaîne minimale supérieure à 20 résidus acides aminés (ou > 2 kDa) et disposer de zones distinctes d'acides aminés hydrophobes et hydrophiles (propriétés amphipatiques) pour montrer des aptitudes stabilisatrices d'émulsion et des propriétés d'interface favorables. Les prédispositions de ces molécules pour les phénomènes d'émulsion dépendent de certaines conditions environnementales (force ionique et température) mais aussi de l'addition d'éléments stabilisateurs (minéraux) si l'hydrolyse protéique est trop importante (Turgeon *et al.* 1991, 1992 ; Gauthier

et al. 1993 ; Simpson & Hughes 1994 ; Caessens *et al.* 1999 ; Ramkumar *et al.* 1999 ; Smulder *et al.* 1999 ; Girardet *et al.* 2000 ; van der Ven *et al.* 2001 ; Popineau *et al.* 2002).

L'hydrolyse enzymatique des protéines alimentaires induit des modifications des propriétés fonctionnelles telles que la solubilité, la tensioactivité, le pouvoir émulsifiant et le pouvoir moussant. Cette connaissance des propriétés fonctionnelles des peptides issus de la protéolyse contrôlée est donc importante pour le développement de nouvelles applications, par exemple (Caessens *et al.* 1999 ; Girardet *et al.* 2000 ; van der Ven *et al.* 2001 ; Popineau *et al.* 2002 ; Sánchez-Vioque *et al.* 2001, 2004) :

- ↳ Pour la formulation d'aliments pour enfants,
- ↳ Pour la formulation d'aliments hypoallergéniques,
- ↳ Pour la formulation de suppléments nutritifs pour les sportifs,
- ↳ Pour la formulation de suppléments diététiques pour des patients atteints de troubles digestifs ou de malnutrition,
- ↳ Pour la formulation de certains produits cosmétiques ou pharmaceutiques avec les protéines dites « non alimentaires ».

4.3 PEPTIDES A ACTIVITE BIOLOGIQUE

De manière générale, les peptides biologiquement actifs (ou peptides fonctionnels ou bioactifs) sont de petite taille, ils comportent entre 3 et 10 résidus acides aminés dans leur structure (Seki *et al.* 1996 ; Tomé 1998). Ces petits peptides sont aussi appelés oligopeptides (González de Llano *et al.* 1996).

Cependant, il existe des exceptions concernant la taille des peptides bioactifs, par exemple :

- ↳ Le caséinomaclopeptide (un peptide issu de la κ -caséine induisant la production de cholécystokinine, hormone liée à l'état de satiété) est composé de 64 acides aminés (Tomé 1998),
- ↳ Les peptides cationiques antibactériens qui ont une taille variant entre 11 et 50 résidus acides aminés (Hancock 1997 ; Hancock & Rozek 2002 ; Powers & Hancock 2004).
- ↳ Certaines hormones peptidiques telles que l'insuline (51 résidus acides aminés), et l'hormone adrénocorticotrope, 39 résidus.

4.3.1 Genèse des peptides alimentaires

Les peptides peuvent être produits soit naturellement soit par hydrolyse protéique ou polypeptidique. Au cours du processus digestif des protéines, les enzymes protéolytiques gastro-intestinales vont libérer des peptides. Par la suite, ces derniers seront, à leur tour, hydrolysés par des peptidases en acides aminés qui seront résorbés au niveau de la muqueuse intestinale (Figure 2). Cependant, certains fragments partiellement résistants aux processus d'hydrolyse sont susceptibles d'être résorbés intacts à condition qu'ils soient de taille oligopeptidique (chapitre 4.3.3 ci-après).

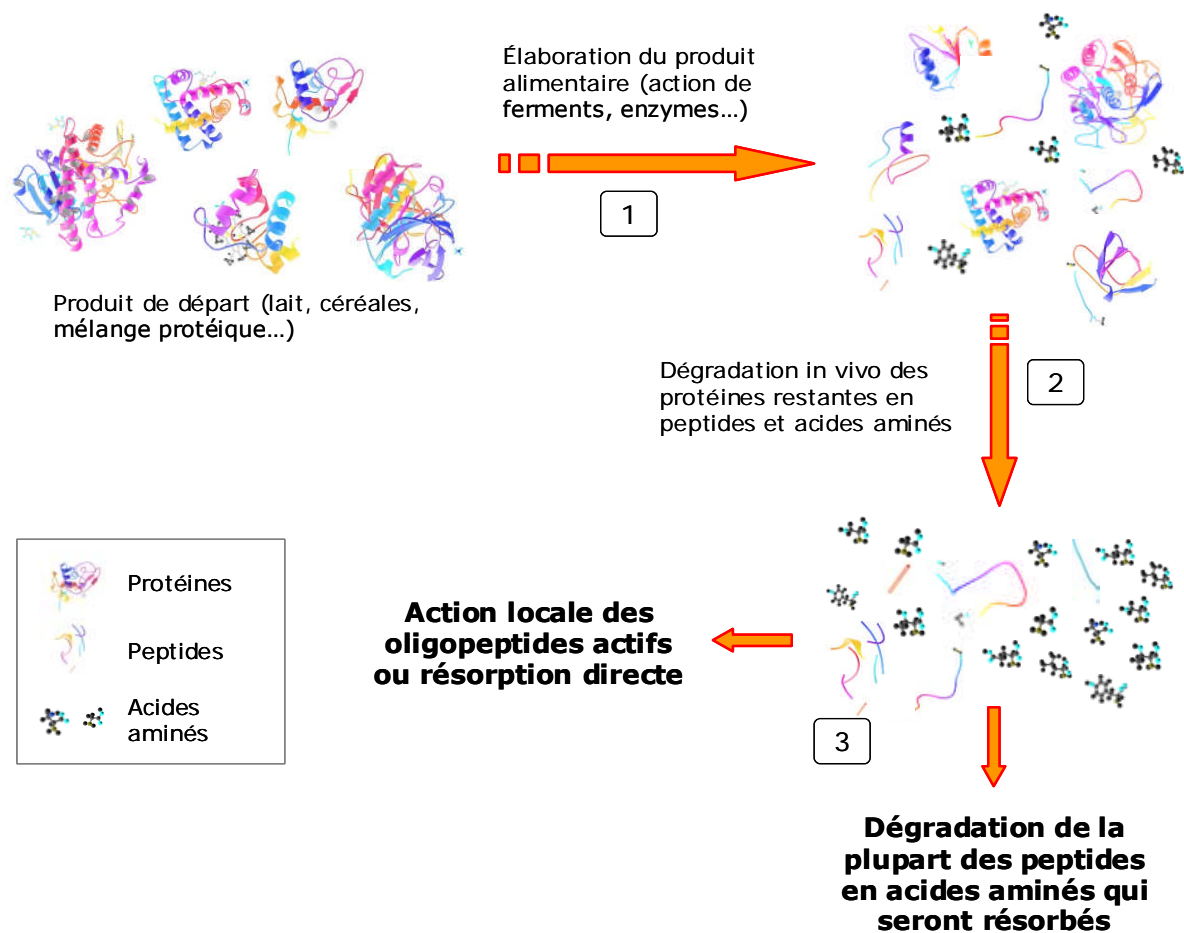


Figure 2. Formation et action des peptides issus de différents aliments. Lors du processus d'élaboration d'un aliment, les protéines présentes sont dégradées *via* différents mécanismes chimiques et/ou enzymatiques (étape 1). Par la suite, les macromolécules protéiques (protéines, peptides et acides aminés) présentes dans les aliments sont dégradées en oligopeptides et acides aminés lors du processus digestif (étape 2). L'étape 3 propose alors deux alternatives au devenir des oligopeptides, ils pourront, soit agir localement et/ou être résorbés intacts, soit être dégradés en acides aminés. Les schémas des protéines ont été repris sur le site Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>).

Lors du processus d'élaboration alimentaire, les microorganismes, peuvent produire des peptides à partir des protéines présentes *via* leurs enzymes hydrolytiques extracellulaires. Pour citer un exemple, le lait subit l'action des ferments lactiques qui dégradent une partie des protéines en peptides (Tomé 1998).

4.3.2 Rôles attribués aux peptides biologiquement actifs

Depuis près de 30 ans maintenant, les études sur les peptides biologiquement actifs issus des aliments n'ont cessé de susciter un intérêt croissant. Ces recherches ont conduit à la mise en évidence de nombreux types d'activités physiologiques liés aux peptides (dont certains peuvent combiner plusieurs de ces biofonctionnalités) :

- ↪ Rôle sur le système digestif (effet antisécrétoire ; Tomé 1998 ; Dziuba *et al.* 1999),
- ↪ Rôle antithrombotique (effet sur la coagulation ; Rutherford & Gill 2000),
- ↪ Rôle antihypertenseur (Yamamoto 1997),
- ↪ Rôle immunomodulateur (Meisel 1997),
- ↪ Rôle antimicrobien (Hancock 1997),
- ↪ Rôle analgésique (Zioudrou *et al.* 1979 ; Nyberg *et al.* 1997),
- ↪ Rôles dans la réponse allergique (Gallo *et al.* 2002).

Ces études ont montré que les peptides bioactifs étaient partiellement résistants à l'hydrolyse et capables d'exercer un effet soit localement dans le tube digestif, soit à distance dans l'organisme, après diffusion dans l'organisme *via* la circulation sanguine (Tomé 1998). Une attention toute particulière a été portée sur les di- et tripeptides car, du fait de leur petite taille, ils seraient plus facilement résorbés au niveau du tube digestif (Dziuba *et al.* 1999).

4.3.3 Résorption des peptides

Des études récentes ont montré que la résorption des peptides au niveau du lumen intestinal dépendait de transporteurs spécifiques jouant un rôle important au niveau nutritionnel et/ou pharmacologique. Au cours du processus digestif, les aliments subissent une multitude de réactions chimiques et enzymatiques. Les enzymes présentes dans la salive, l'estomac, le pancréas et l'intestin solubilisent et dégradent ces composés en plus petits éléments qui seront plus aisément résorbés par les cellules épithéliales l'intestin grêle. Les

protéines seront ainsi converties en peptides, oligopeptides et acides aminés dans le lumen gastro-intestinal.

La découverte de la résorption du dipeptide Gly-Gly a contribué à mettre en évidence la présence de transporteurs spécifiques de petits peptides (Matthews & Adibi 1976). Aujourd'hui, deux transporteurs peptidiques, désignés sous le nom de PepT1 et PepT2, ont été identifiés chez les mammifères. Ces transporteurs sont principalement présents au niveau de la bordure en brosse de l'intestin mais aussi dans d'autres tissus (glandes mammaires, poumons, colon, pancréas et reins). PepT1 et PepT2 permettent le transport cellulaire des dipeptides, des tripeptides et de composés peptidomimétiques *via* un gradient électrochimique. Les di- et tripeptides peuvent ainsi être transportés directement dans les cellules épithéliales où ils sont rapidement hydrolysés par des peptidases cytosoliques ou libérés dans la circulation sanguine *via* des transporteurs basolatéraux (Figure 3). Bien que leur fonction soit similaire, PepT1 et PepT2 présentent des différences majeures au niveau de leur spécificité et de leur affinité vis-à-vis des substrats, ainsi que de leur capacité à transporter. PepT1 peut être considéré comme un système faible-affinité/haute-capacité, alors que PepT2 serait un système de transport haute-affinité/faible-capacité. Leurs substrats physiologiques sont les di- et tripeptides principalement constitués des 20 L- α -aminoacides principaux, permettant des combinaisons possibles de 400 dipeptides et de 8000 tripeptides (Lee 2000 ; Rubio-Aliaga & Daniel 2002). Ces transporteurs permettent aussi la résorption de nombreux composés comme les antibiotiques β -lactame, les inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine I (ECA) ainsi que d'autres composés disposant de liaisons peptidiques tels que l'acide δ -amino-lévulinique (Lee 2000).

Les peptides résistants à l'hydrolyse peuvent donc passer la barrière gastro-intestinale, rejoindre la circulation sanguine sans être dégradés et diffuser vers les tissus ou organes cibles où ils exercent leur activité. Récemment, Matsui *et al.* (2002b) ont montré que le dipeptide antihypertenseur, Val-Tyr, pouvait être résorbé chez l'Homme (étude sur des sujets normotendus). Ce processus de résorption est dose-dépendant et permet une accumulation rapide au niveau de l'aorte et des reins. Satake *et al.* (2002) ont également étudié le transport d'un peptide antihypertenseur, Val-Pro-Pro, mais sur un modèle cellulaire de type Caco-2 humain mono-couche. Ils ont observé que ce tripeptide pouvait être transporté au travers des cellules Caco-2 sans y être dégradé. Les mécanismes par lesquels Val-Pro-Pro a été transporté sont principalement une diffusion para-cellulaire et un transport trans-cellulaire *via* PepT1.

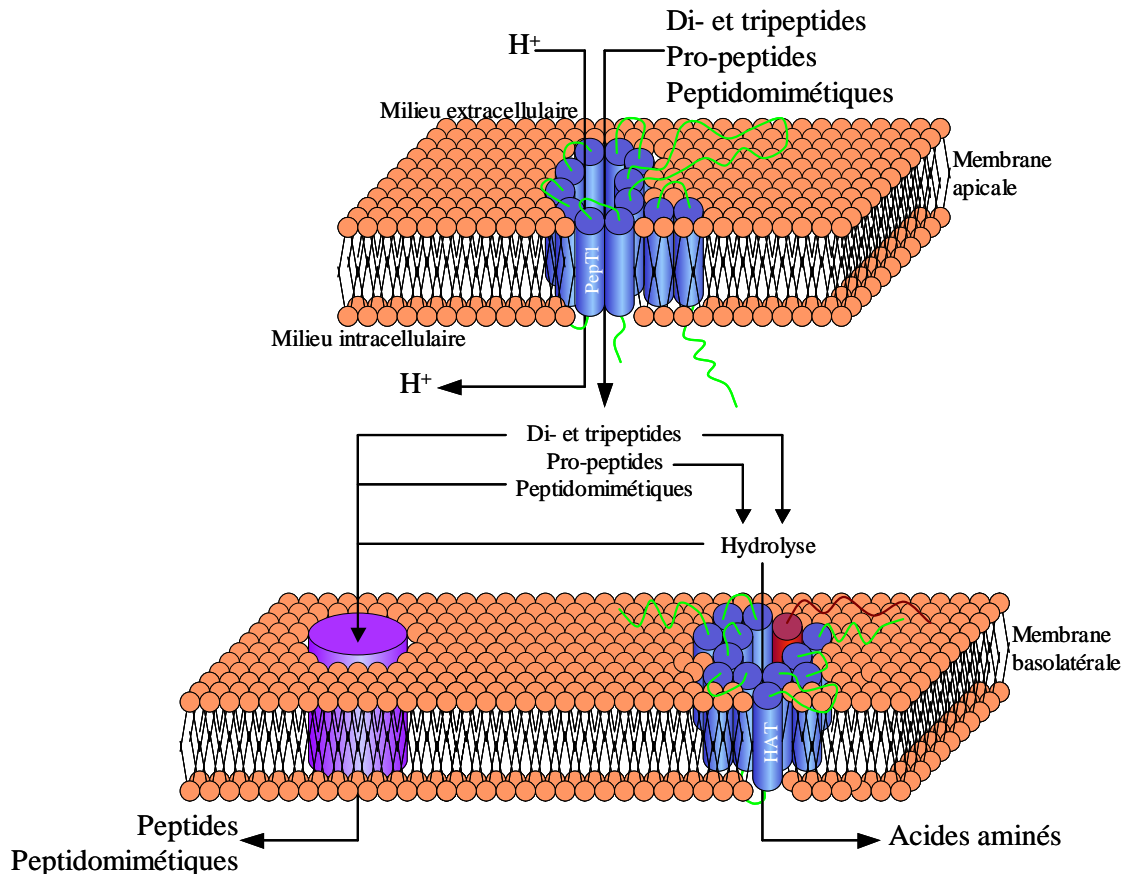


Figure 3. Système de transport des peptides dans un modèle épithélial de cellules intestinales et/ou rénales. Les di- et tripeptides, les pro-peptides ainsi que les peptidomimétiques sont transportés à l'intérieur de la cellule *via* un système de transport actif des peptides (représenté par PepT1 sur la figure). Les di- et tripeptides et les pro-peptides subissent une hydrolyse intracellulaire rapide en acides aminés. Ces derniers sont ensuite expulsés de la cellule *via* un transporteur hétérodimérique basolatéral (représenté par HAT sur la figure). Les substrats résistants à l'hydrolyse intracellulaire (la plupart des peptidomimétiques) sont libérés dans le système sanguin *via* un système de transport basolatéral de type peptidique (non encore identifié). Les structures 3D de PepT1 et HAT schématisées sur la figure ont été basées sur les modèles proposés par Rubio-Aliaga & Daniel (2002) et Wagner *et al.* (2001) respectivement.

La résorption des peptides bioactifs est souvent restreinte par leurs propriétés physico-chimiques défavorables, qui limitent leur perméabilité intestinale et diminuent leur stabilité contre la dégradation enzymatique. Pour surmonter ces problèmes, différentes stratégies ont été explorées afin d'améliorer leur stabilité : les modifications chimiques avec des acides gras (Fujita *et al.* 1997), la préparation de peptides cycliques (Pauletti *et al.* 1996), l'encapsulation (Suetsuna & Osajima 1989) ou l'alkylation de la fonction amide de la chaîne peptidique (Conradi *et al.* 1992). L'encapsulation, au moyen de liposomes utilisant des phospholipides (lécithine) en tant que bicouche lipidique, a été efficace pour améliorer la résorption des peptides. Cette méthode a été appliquée avec succès par Chen *et al.* pour le tripeptide antihypertenseur, Leu-Lys-Pro (Chen *et al.* 2003). En tant que tel, le tripeptide « micro-encapsulé » a diminué significativement la pression systolique des rats spontanément

hypertendus (SHR) et son action antihypertensive a été prolongée, confirmant ainsi le rôle protecteur de l'encapsulation. Une autre étude a rapporté que l'administration orale (500 mg/kg) d'un hydrolysate de caséine de faible poids moléculaire, préparé sous forme d'une émulsion avec 30 % de jaune d'œufs, présentait un meilleur effet antihypertenseur par rapport à l'hydrolysate seul (Kim *et al.* 2002).

A ce jour, la résorption intacte de peptides de taille plus importante reste à démontrer. Récemment, une étude utilisant un peptide inhibiteur de l'ECA (Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg) issu de l'hydrolyse par la trypsine de la β -lactoglobuline, a montré que l'heptapeptide pouvait être transporté intact au travers d'une mono-couche cellulaire de type Caco-2 (modèle *in vitro* de cellules épithéliales de l'intestin grêle). Cependant, les quantités transportées étaient trop faibles pour exercer un effet antihypertenseur (Vermeirssen *et al.* 2002b). Cette première étude mérite donc d'être poursuivie avant de généraliser ce concept.

5 PEPTIDES ALIMENTAIRES ET HYPERTENSION

5.1 INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires représentent la plus grande cause de décès chez l'adulte dans les pays industrialisés (Bonow *et al.* 2002). L'hypertension est un état avec une pression sanguine élevée (> 140 mm Hg pour la pression systolique et > 90 mm Hg pour la pression diastolique selon les limites fixées par l'Organisation Mondiale de la Santé) et cette affection représente le facteur de risque principal sur le plan cardiovasculaire. Les éléments contribuant majoritairement à l'augmentation de la pression sanguine sont le volume sanguin, le débit cardiaque et les résistances périphériques vasculaires (Page *et al.* 1999).

Dans plus de 90 % des cas adultes de plus de 40 ans, les causes de l'élévation de la pression artérielle ne sont pas connues. On parle alors d'hypertension artérielle essentielle (ou primaire). Plusieurs mécanismes biologiques peuvent contribuer au maintien de la pression sanguine à un niveau physiologique. Il est vraisemblable que certains facteurs soient en relation pour augmenter la pression sanguine chez les patients atteints d'hypertension (Beevers *et al.* 2001). Parmi ces facteurs de risque, on retrouve la consommation en sel, l'obésité, la résistance à l'insuline et les dysfonctionnements du système nerveux sympathique et/ou du système endothélial (Garbers & Dubois 1999 ; Beevers *et al.* 2001). Le Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (SRAA) est la cible préférentielle des agents

thérapeutiques utilisés dans le traitement de l'hypertension. Ce système est principalement régulé *via* l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (EC : 3.4.15.1). Il s'agit d'une enzyme clé du SRAA. Elle est ubiquitaire et responsable de la production d'un octapeptide fortement vasopresseur (l'angiotensine II) et de l'inactivation d'un peptide vasodilatateur, la bradykinine (Jackson & Garrison 1996).

Les inhibiteurs spécifiques de l'ECA (captopril, enalapril, etc...) sont considérés comme les principaux agents thérapeutiques pour le traitement de l'hypertension et la prévention des maladies cardiovasculaires. A partir de la découverte de peptides inhibiteurs de l'ECA dans le venin de serpent (Ferreira 1965 ; Ferreira *et al.* 1970 ; Kato & Suzuki 1971), plusieurs analogues structuraux ont été synthétisés et sont devenus les médicaments antihypertenseurs les plus utilisés. En 1979, Oshima *et al.* ont été les premiers à rapporter l'identification de peptides inhibiteurs de l'ECA issus de protéines alimentaires. Depuis cette étude, de nombreuses recherches sur les protéines alimentaires ont montré la présence, dans leur structure, de peptides inhibiteurs de l'ECA capables de montrer un effet antihypertenseur *in vivo*.

5.2 ROLE DU SRAA DANS LA REGULATION DE LA PRESSION ARTERIELLE

Le Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (SRAA) est probablement le système endocrine le plus important dans le contrôle de la pression sanguine (Beevers *et al.* 2001). Il est considéré comme un important régulateur hormonal de l'homéostasie cardiovasculaire. Le SRAA n'est pas seulement un système endocrine, il est aussi présent dans tous les tissus périphériques, le cœur et les poumons inclus (Dostal *et al.* 1994). Les enzymes clés du SRAA sont la rénine et l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (Figure 4). La rénine permet la conversion de l'angiotensinogène en angiotensine I, qui sera ensuite clivée par l'ECA en angiotensine II, un octapeptide fortement vasoconstricteur. L'angiotensine II stimule aussi la libération d'aldostérone et favorise la rétention sodée. Le rôle principal du SRAA semble être la régulation à long terme de la pression artérielle par modification des résistances périphériques et/ou de la balance sel/eau (Shapiro 1987). Les effets de son activation peuvent être locaux ou systémiques, ce qui suggère que la pression sanguine peut être régulée localement (Beevers *et al.* 2001).

Ce rôle clé de l'ECA dans le SRAA combiné au fait qu'elle soit ubiquitaire, justifie qu'elle ait été choisie comme cible privilégiée des agents thérapeutiques à même d'intervenir contre l'hypertension (Maubois *et al.* 1991). En effet, le captopril, premier inhibiteur

synthétique de l'ECA commercialisé, réduit la tension artérielle par diminution des résistances vasculaires systémiques sans affecter le rythme cardiaque. De plus, les inhibiteurs de l'ECA empêchent l'inactivation de la bradykinine (peptide vasodilatateur), contribuant ainsi à augmenter l'effet antihypertenseur. Cependant, l'accumulation de bradykinine au niveau des poumons présente des effets secondaires comme une toux sèche (Sesoko & Kaneko 1985). De manière générale, les inhibiteurs de l'ECA sont responsables de nombreux effets secondaires tels que la perte de goût, des éruptions cutanées, ou encore l'apparition d'œdèmes angioneurotiques (Antonios & MacGregor 1995). A l'heure actuelle, les nouveaux médicaments de synthèse (e.g. losartan) ciblent et bloquent les récepteurs AT_1 de l'angiotensine II et n'ont donc pas d'effet sur le métabolisme de la bradykinine et n'apportent pas les désagréments liés à l'absorption des inhibiteurs de l'ECA (Jackson & Garrison 1996).

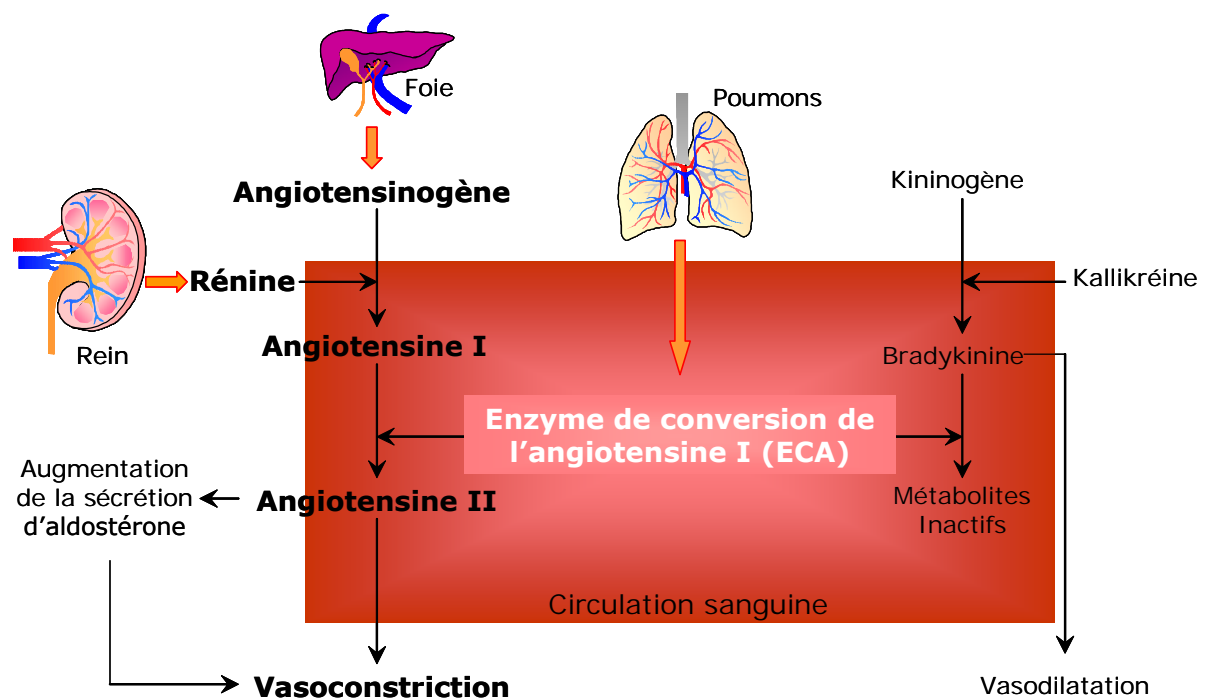


Figure 4. Représentation schématique du Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (SRAA). Le SRAA est un système hormonal jouant un rôle central dans le contrôle de l'excrétion du sodium et du volume sanguin *via* le système nerveux sympathique et la sécrétion d'aldostérone. La rénine est une enzyme protéolytique de type aspartyl-protéase, sécrétée par les reins au niveau des cellules juxtaglomérulaires. Sa synthèse est stimulée par la diminution de la pression artérielle rénale, par la stimulation du système nerveux sympathique et/ou par une diminution du taux de sodium dans le tubule rénal distal (Katzung 2000). La rénine agit sur l'angiotensinogène (synthétisé au niveau du foie) pour donner l'angiotensine I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) qui est ensuite converti en un puissant peptide vasoconstricteur, l'angiotensine II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) *via* l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA). L'ECA est une enzyme de type carboxypeptidyl-dipeptide-hydrolase présente à la surface des cellules endothéliales. Elle permet également l'inactivation de la bradykinine ainsi que d'autres peptides vasodilatateurs. L'angiotensine II agit comme un puissant vasoconstricteur au niveau artériel *via* la sécrétion d'aldostérone, menant à la rétention d'eau et de sodium. L'angiotensine II favorise donc l'augmentation des résistances périphériques et le volume sanguin, deux facteurs qui vont permettre l'augmentation de la pression sanguine.

5.3 LES PEPTIDES ANTIHYPERTENSEURS

Les peptides peuvent être présents naturellement dans les aliments, produits au cours du processus d'élaboration ou formés *in vivo* par hydrolyse enzymatique *via* les enzymes digestives retrouvées dans le tractus gastro-intestinal. Leur principale fonction *in vivo* est l'apport de l'azote et des acides aminés essentiels à la synthèse des protéines retrouvées dans les tissus et les organes. Depuis la découverte des peptides endogènes ayant des propriétés antimicrobienne, immunomodulante, antithrombotique, antihypertensive et/ou analgésique, les études n'ont cessé d'évaluer les propriétés biologiques potentielles des peptides issus des aliments. La plupart des composés biologiquement actifs identifiés jusqu'à maintenant, sont des petits peptides (ou oligopeptides), dont la taille varie de 2 à 10 résidus acides aminés. Leur résorption au niveau de l'appareil digestif est dépendante de leur taille ainsi que de leurs propriétés hydrophiles/hydrophobes. Leur effet peut être local ou systémique, impliquant dans ce dernier cas leur résorption au niveau gastro-intestinal et leur distribution vers un organe ou tissu *via* la circulation sanguine (paragraphe 4.3.3).

En 1979, Oshima *et al.* étaient les premiers à décrire le potentiel thérapeutique que pouvait présenter la gélatine (aliment disposant d'une faible valeur nutritionnelle) dans le traitement de l'hypertension une fois que celle-ci a reçu un traitement approprié. Ces premiers résultats ont ouvert la voie à d'autres recherches en science des aliments. Certains programmes scientifiques, dont le but était de produire des peptides pharmacologiquement actifs, ont ainsi vu le jour. Ces projets se sont concrétisés par la synthèse d'analogues de peptides endogènes et/ou le retraitement des sous-produits obtenus au cours du processus d'élaboration d'aliments. En plus de l'effet bénéfique que pouvait offrir cette approche, elle permettait aussi de recycler certains déchets alimentaires en limitant la pollution/contamination par rejet et en les convertissant en suppléments diététiques (Fujii *et al.* 1993 ; Matsumura *et al.* 1993*a,b* ; Hyun & Shin 2000 ; Hernandez-Ledesma *et al.* 2002). Depuis ces 20 dernières années, de nombreux peptides inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I, présentant des propriétés antihypertensives *in vivo*, ont été identifiés dans de nombreux aliments.

5.3.1 Peptides issus de produits marins

Des peptides inhibiteurs de l'ECA ont été produits *via* différentes digestions enzymatiques de protéines issues des muscles de thon (Kohama *et al.* 1991), des muscles de sardine (Suetsuna & Osajima 1989), de la bonite séchée (Yokoyama *et al.* 1992), de thon séché/salé

(Astawan *et al.* 1995), de saumon (Okamoto *et al.* 1995a), d'algues (Suetsuna 1998a) ou encore de protéines hydrophiles de poisson (Wako *et al.* 1999).

Certains hydrolysats protéiques ont montré des effets *in vitro* (par inhibition de l'ECA) et *in vivo* (effets antihypertenseurs)(Tableau 1). L'hydrolyse par la pepsine de thon indonésien séché/salé (Astawan *et al.* 1995) ainsi que l'hydrolyse par la thermolysine de muscles de bonite (Yokoyama *et al.* 1992) ont donné des produits possédant une activité inhibitrice de l'ECA ($IC_{50} = 0,63$ mg protéine/mL et $29 \mu\text{g}$ d'extrait sec/mL, respectivement). L'hydrolysats pepsique a permis de diminuer la pression sanguine de rats spontanément hypertendus (rats SHR) lorsqu'il était administré de façon chronique par voie orale.

Un autolysat de muscles de bonite (jeune thon) partiellement purifié a montré une activité antihypertensive dose-dépendante (pour des doses allant de 1 à 3 g/kg) lorsqu'il était administré par voie orale à des rats SHR (Fujii *et al.* 1993 ; Tableau 1). L'administration chronique d'un hydrolysats (par la thermolysine) de muscles de bonite à des rats SHR a permis de supprimer le développement de l'hypertension après une à cinq semaines de traitement suivant la dose utilisée (de 15 à 60 mg/kg ; Fujita *et al.* 1995 ; Tableau 1). Une simple administration par voie orale (250 mg/kg) de cet échantillon à des rats SHR a significativement baissé leur pression systolique après 4 heures (Fujita *et al.* 2001). Le fractionnement de cet hydrolysats par ultrafiltration sur membrane de porosité 3 kDa a permis d'obtenir un extrait plus inhibiteur de l'ECA que l'hydrolysats de départ (IC_{50} plus faible, $31,5 \mu\text{g/mL}$ au lieu de $58,3 \mu\text{g/mL}$; Fujita *et al.* 2001 ; Tableau 1). Cet extrait a montré un effet antihypertenseur dose-dépendant chez le rat SHR pour des doses allant de 125 à 500 mg/kg. De plus, l'administration chronique (1500 mg/jour) de cet extrait à des patients atteints d'hypertension a montré un effet antihypertenseur (Fujita *et al.* 2001).

A partir de ces hydrolysats, différents peptides inhibiteurs de l'ECA ont pu être identifiés et ont montré une activité antihypertensive (Tableau 2). Testés sur des rats Sprague-Dawley (rats normotendus), les peptides C111 et C112, isolés par Matsumura *et al.* (1993b), ont montré un effet antagoniste à la réponse de l'angiotensine I 30 minutes après administration orale (500 mg/kg ; Karaki *et al.* 1993). Administrés oralement à des rats SHR, ces peptides ont montré qu'ils pouvaient réduire significativement la pression sanguine à de plus faibles doses (100 et 50 mg/kg p.o. pour C111 et C112 respectivement ; Karaki *et al.* 1993). Un autre peptide inhibiteur de l'ECA a pu être isolé d'un hydrolysats de muscles de bonite par la thermolysine (Leu-Lys-Pro-Asn-Met, $IC_{50} : 2,4 \mu\text{M}$; Fujita & Yoshikawa 1999). Bien que ce pentapeptide ait été démontré comme étant substrat de l'ECA, son hydrolyse a permis d'obtenir un tripeptide huit fois plus inhibiteur (Leu-Lys-Pro, $IC_{50} : 0,32 \mu\text{M}$). Il est alors

Tableau 1. Hydrolysats issus de produits marins montrant des propriétés antihypertensives.

Source	Fraction	IC ₅₀ *	Dose†	Δ PS (mm Hg) ‡	Références
Algues	Hydrolysats peptique	1,52 mg p./mL	200 mg/kg p.o.	-53 après 1h	Suetsuna (1998a)
Bonite	Hydrolyse par la thermolysine	29 µg m.s./mL	15 mg/kg/jour p.o.	-23 après 7 sem.	Fujita <i>et al.</i> (1995)
Bonite	Hydrolyse par la thermolysine	58,3 µg m.s./mL	250 mg/kg p.o.	-5 après 4h	Fujita <i>et al.</i> (2001)
Bonite	Hydrolysats d'intestins	75 µg m.s./mL	1000 mg/kg p.o.	-19 après 3h	Fujii <i>et al.</i> (1993)
Bonite	S-type KO	31,5 µg m.s./mL	125 mg/kg p.o.	-7 après 4h	Fujita <i>et al.</i> (2001)
Bonite	S-type KO	31,5 µg m.s./mL	1500 mg/jour p.o. §	-11,7 après 5 sem.	Fujita <i>et al.</i> (2001)
Sardine	Muscle/hydrolysats peptique	27,1 mg/g	117 mg/kg i.v.	-33,7 après 1h	Suetsuna (1989)
Sardine	Muscle/hydrolysats peptique	27,1 mg/g	500 mg/kg p.o.	-10,6 après 3h	Suetsuna (1989)
Thon	Chair/hydrolysats peptique	0,63 mg p./mL	5000 mg/kg/jour p.o.	-65 après 16 jours	Astawan <i>et al.</i> (1995)
Wakame	Protéase S''Amano'' hydrolysate	86 µg p./mL	10 mg/kg p.o.	-19,3 après 3h	Sato <i>et al.</i> (2002b)
Wakame	Protéase S''Amano'' hydrolysate	86 µg p./mL	0,1%/jour p.o.	-17,1 après 10 sem	Sato <i>et al.</i> (2002b)

* IC₅₀ ; concentration nécessaire pour inhiber 50 % de l'activité enzymatique (m.s. : matière sèche; p. : protéine).

† Dose requise à la production d'un effet significatif chez le rat SHR (p.o. : Administration orale ; i.v. : Injection intraveineuse).

‡ Diminution de la pression systolique (PS) par rapport à la ligne de base (sem. : semaine).

|| S-type KO: Fraction < 3 kDa de bonite hydrolysée par la thermolysine.

§ Etude réalisée chez des patients atteints d'hypertension moyenne.

Tableau 2. Peptides antihypertenseurs isolés d'hydrolysats de produits marins.

Structure	Origine	IC ₅₀ (µM)*	Dose†	Δ PS (mm Hg)‡	Références
Ala-Ile-Tyr-Lys	Wakame	213	50 mg/kg p.o.	-40 après 1h	Suetsuna (2000)
Gly-Trp	Sauce de poisson	35,0	200 mg/kg p.o.	-29 après 6h	Okamoto <i>et al.</i> (1995b)
Gly-Val-Tyr-Pro-His-Lys (C111)	Intestins de Bonite	1,6	100 mg/kg p.o.	-10,3 après 3h	Karaki <i>et al.</i> (1993)
Gly-Val-Tyr-Pro-His-Lys (C111)	Intestins de Bonite	1,6	500 mg/kg p.o.	Ang I	Karaki <i>et al.</i> (1993)
Ile-Arg-Pro-Val-Gln (C112)	Intestins de Bonite	1,4	50 mg/kg p.o.	-7,0 après 3h	Karaki <i>et al.</i> (1993)
Ile-Arg-Pro-Val-Gln (C112)	Intestins de Bonite	1,4	500 mg/kg p.o.	Ang I	Karaki <i>et al.</i> (1993)
Ile-Trp	Bonite	5,1	60 mg/kg p.o.	-22 après 2h	Fujita <i>et al.</i> (2000)
Ile-Trp-His	Bonite	3,5	60 mg/kg p.o.	-30 après 4h	Fujita <i>et al.</i> (2000)
Ile-Tyr	Bonite	2,1	60 mg/kg p.o.	-19 après 2h	Fujita <i>et al.</i> (2000)
Leu-Lys-Val-Gly-Gly-Lys-Gln-Tyr	Muscle de sardine	9,2	10 mg/kg i.v.	-15 après 2h	Suetsuna (1991b)
Leu-Lys-Pro-Asn-Met	Bonite	2,4	8 mg/kg p.o.	-9 après 4h	Fujita <i>et al.</i> (1999)
Leu-Lys-Pro	Bonite	0,32	2.25 mg/kg p.o.	-6 après 2h	Fujita <i>et al.</i> (1999)
Lys-Phe-Tyr-Gly	Wakame	90,5	50 mg/kg p.o.	-40 après 2h	Suetsuna (2000)
Phe-Tyr	Wakame	42,3	10 mg/kg p.o.	-21 après 6h	Sato <i>et al.</i> (2002a)
Tyr-Asn-Lys-Leu	Wakame	21	50 mg/kg p.o.	-50 après 2h	Suetsuna (2000)
Tyr-Lys-Tyr-Tyr	Wakame	64,2	50 mg/kg p.o.	-50 après 2h	Suetsuna (2000)
Val-Trp	Sauce de poisson	2,0	200 mg/kg p.o.	-38 après 3h	Okamoto <i>et al.</i> (1995a)
Val-Tyr	Wakame	35,2	1 mg/kg p.o.	-21,5 après 9h	Sato <i>et al.</i> (2002a)

* IC₅₀ ; concentration nécessaire pour inhiber 50 % de l'activité enzymatique.

† Dose requise à la production d'un effet significatif chez le rat SHR (p.o. : Administration orale ; i.v. : Injection intraveineuse).

‡ Diminution de la pression systolique (PS) par rapport à la ligne de base (Ang I: Inhibition de l'effet presseur de l'angiotensine I).

possible de considérer Leu-Lys-Pro-Asn-Met comme un pro-médicament de la forme la plus active Leu-Lys-Pro. Administré oralement à des rats SHR (8 mg/kg), ce pro-peptide agit aussi rapidement que le captopril (1,25 mg/kg), soit 4 heures après administration, pour une activité équivalente à 66 % de celle du captopril. Le tripeptide a montré un effet maximal sur la pression systolique 2 heures après administration et son efficacité (à mode opératoire identique) était équivalente à 91 % de celle du captopril (Fujita & Yoshikawa 1999).

D'autres peptides antihypertenseurs ont été identifiés dans des hydrolysats de poissons tels que, Ile-Trp-His, Ile-Trp et Ile-Tyr issus de la bonite (Fujita *et al.* 2000), Leu-Lys-Val-Gly-Gly-Lys-Gln-Tyr issu des muscles de sardine (Suetsuna 1991a) et Gly-Trp et Val-Trp issus du saumon (Okamoto *et al.* 1995a). Les fragments peptidiques, Ile-Lys-Pro et Val-Tyr, isolés des muscles de sardine et de bonite ont été synthétisés et testés *in vivo* (Yokoyama *et al.* 1992 ; Matsufuji *et al.* 1994). Administré *en i.v.*, Ile-Lys-Pro (10 mg/kg) a supprimé l'effet hypertenseur de l'angiotensine I (Yokoyama *et al.* 1992) et Val-Tyr (50 mg/kg) a permis de diminuer les pressions systolique et diastolique chez le Rat SHR (Matsufuji *et al.* 1995). Une autre étude a montré que l'administration orale de Val-Tyr à ces mêmes rats SHR avait baissé significativement la pression artérielle de manière dose-dépendante (doses de 1 à 10 mg/kg). Sur un traitement à long terme, Val-Tyr a démontré sa capacité à produire un effet antihypertenseur puissant et durable chez le Rat SHR (10 mg/kg p.o. pendant 10 jours ; Seki *et al.* 1999).

De études récentes ont montré que les digestions par la pepsine d'une algue rouge, *Porphyra yezoensis* (Suetsuna 1998a), d'algues brunes *Hizikia fusiformis* (Suetsuna & Chen 2001) et *Undaria pinnatifida* (Suetsuna & Nakano 2000) ainsi que de deux micro-algues *Chlorella vulgaris* et *Spirulina platensis* (Suetsuna & Chen 2001) pouvaient diminuer la pression sanguine des rats SHR. Les peptides issus de l'hydrolyse pepsique de *Porphyra yezoensis* (aussi appelés Nori-peptides) ont montré un effet antihypertenseur significatif aussi bien chez des rats SHR que chez des patients atteints d'hypertension. De plus, cette étude a montré que les Nori-peptides ne présentaient pas d'effets délétères hypotenseurs lorsqu'ils étaient administrés à des sujets sains (Saito *et al.* 2002). Une autre étude, utilisant le wakame (*Undaria pinnatifida*), a aussi montré un effet antihypertenseur chez des patients (Hata *et al.* 2001). Un extrait de wakame, obtenu à partir de la digestion enzymatique par la protéase S « Amano » de *Bacillus stearothermophilus*, a permis de diminuer l'hypertension des rats SHR aussi bien après administration orale unique qu'après administration orale répétée (Sato *et al.* 2002a). Ces hydrolysats d'algues sont donc une source importante de peptides biologiquement actifs, dont certains ont été identifiés et ont présenté des activités inhibitrices

de l'ECA (Tableau 2). Ces résultats pourraient expliquer, en partie, les effets antihypertenseurs observés chez les rats SHR (Suetsuna 1998a ; Suetsuna & Nakano 2000 ; Sato *et al.* 2002b).

D'autres peptides inhibiteurs de l'ECA ($IC_{50} < 10 \mu M$) ont été identifiés dans des hydrolysats de poisson mais très peu ont été évalués *in vivo* (Kohama *et al.* 1988, 1991 ; Matsufuji *et al.* 1994, 1995 ; Matsumura *et al.* 1993a,b ; Yokoyama *et al.* 1992).

5.3.2 Peptides retrouvés dans les produits laitiers

De nombreux peptides inhibiteurs de l'ECA ont été isolés à partir des produits laitiers (fromage, lait, lait fermenté...). Plusieurs d'entre eux ont montré des effets antihypertenseurs chez le Rat spontanément hypertendu ainsi que chez des patients atteints d'hypertension.

Le lait est composé de deux classes de protéines, les caséines (α_{S1} -, α_{S2} -, β - et κ - caséines), qui sont la principale source d'acides aminés dans les fromages, et les protéines du lactosérum, telles que les immunoglobulines, la lactoferrine et le lysozyme, plus connues pour leur rôle protecteur anti-infectieux chez le jeune mammifère (Léonil & Maubois, 2002). Chez le bovin, la fraction protéique du lait est constituée de caséines (80 %), de protéines solubles (lactalbumine, lactoglobuline, immunoglobulines, 19 %) et d'autres protéines (enzymes, 1 %). Maruyama & Suzuki (1982), ont été les premiers à isoler un peptide inhibiteur de l'ECA (appelé CEI 12) à partir d'un hydrolysat tryptique de caséine bovine (un dodécapeptide, $IC_{50} = 77 \mu M$). Administré *in vivo* à des rats, CEI 12 a permis de prévenir la réponse à l'angiotensine I (Tableau 3 ; Maruyama *et al.* 1987). Par la suite, deux autres peptides inhibiteurs de l'ECA ont pu être isolés de la caséine bovine et, comme CEI 12, ont montré une activité de type bradykinine dans la contraction de l'utérus et de l'iléum du rat (Maruyama *et al.* 1985). Depuis ces études, de nombreux peptides antihypertenseurs ont pu être isolés de différents produits laitiers (Tableau 3).

Le lait fermenté, commercialisé sous le nom de calpis, est un lait traditionnellement consommé au Japon. Il est préparé par fermentation de lait écrémé avec une souche de bactérie lactique (*Lactobacillus helveticus*) et une souche de levure (*Saccharomyces cerevisiae*). Les bactéries lactiques disposent d'un important système protéolytique pour leur croissance cellulaire et la production de petits peptides dans le lait. Ces oligopeptides vont pénétrer dans la cellule pour être progressivement dégradés par les peptidases et ainsi contribuer à la nutrition azotée de la bactérie (Novel 1996). Les protéases extracellulaires ont montré une faculté à produire des peptides biologiquement actifs. Comme l'ont démontré

Nakamura *et al.* (1995a), l'hydrolyse par ces protéases est nécessaire pour libérer des peptides inhibiteurs de l'ECA dans le calpis. Le taux d'activité inhibitrice augmente au cours du processus fermentaire de ce lait aigre. Deux peptides ont été identifiés comme principaux responsables de cette activité inhibitrice dans le calpis, Val-Pro-Pro et Ile-Pro-Pro, dont les IC₅₀ sont 9 et 5 µM, respectivement (Tableau 3; Nakamura *et al.* 1995a). Administrés oralement à raison de 1 à 5 mg/kg, ces peptides ont montré un effet antihypertenseur chez les rats SHR, et aucun effet chez le Rat normotendu (Nakamura *et al.* 1995b), suggérant que l'activité du calpis est purement antihypertensive et non hypotensive. Les mesures d'activité de l'ECA dans différents organes, après administration orale du calpis, ont montré des diminutions significatives de l'activité de l'ECA au niveau de l'aorte, du rein et des poumons. Cependant, Val-Pro-Pro et Ile-Pro-Pro n'ont été retrouvés qu'au niveau de l'aorte (Masuda *et al.* 1996). Il semblerait que ces tripeptides soient directement résorbés sans être dégradés par les enzymes gastro-intestinales. Leur bio-disponibilité est estimée à 4 et 5 % pour Val-Pro-Pro et Ile-Pro-Pro, respectivement, leur permettant ainsi d'atteindre leur site d'action pour produire leur effet antihypertenseur. Dans une autre étude, le calpis a aussi montré un effet sur la pression sanguine, après administration chronique orale chez le Rat SHR (Nakamura *et al.* 1996). Un des mécanismes possibles à l'origine de cet effet antihypertenseur a été attribué aux peptides inhibiteurs de l'ECA contenus dans ce lait fermenté, à savoir Val-Pro-Pro et Ile-Pro-Pro (Sipola *et al.* 2001). De plus, ces deux peptides ont montré un effet dose-dépendant (Sipola *et al.* 2002).

L'administration orale et chronique, pendant 4 semaines, de 95 mL de calpis à des patients hypertendus a diminué significativement leurs pressions systolique et diastolique (Hata *et al.* 1996). De plus, très récemment, deux études ont montré que la supplémentation diététique avec un lait fermenté par *L. helveticus* LBK-16H (souche permettant la production de grandes quantités des peptides Val-Pro-Pro et Ile-Pro-Pro), pouvait potentiellement être utilisée pour le traitement de certaines formes d'hypertension modérée (Seppo *et al.* 2002; Seppo *et al.* 2003). En dépit du faible nombre de sujets (17 et 39 patients atteints d'hypertension), ces premiers résultats sont à prendre en considération et d'autres recherches sont nécessaires pour confirmer ces résultats préliminaires.

L'effet antihypertenseur attribué au lait fermenté par *L. helveticus* et aux hydrolysats de caséines obtenus à partir des protéases de *L. helveticus* est relativement bien documenté dans la littérature. De fait, l'hydrolyse de la caséine par une protéase très active issue de *L. helveticus* CP 790 (connue pour hydrolyser préférentiellement les caséines α_{S1} - et β -) permet la libération d'un grand nombre de peptides inhibiteurs de l'ECA (Yamamoto *et al.*

1994a). Administrés oralement, les hydrolysats, préparés à partir de la fermentation de cette dernière souche ou par action directe de la protéase, ont montré une activité antihypertensive chez les rats SHR. A l'inverse, l'hydrolysat obtenu à partir de la fermentation de *L. helveticus* CP 791 (une souche déficiente en activité protéasique), n'a montré aucun effet antihypertenseur chez les rats SHR (Yamamoto *et al.* 1994a). De plus, ces auteurs ont montré que l'activité protéolytique extracellulaire était plus forte dans les laits fermentés avec *L. helveticus* que dans ceux fermentés avec d'autres espèces de *Lactobacillus*. Les souches présentant une faible activité protéolytique extracellulaire sont moins aptes à produire des peptides inhibiteurs de l'ECA et donc potentiellement moins prédisposées à montrer une activité antihypertensive (Yamamoto *et al.* 1994b).

Un heptapeptide (Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln), obtenu par hydrolyse de la β -caséine par une protéase extracellulaire issue d'une culture de *L. helveticus* CP 790, a montré un effet antihypertenseur après administration orale (2 mg/kg) chez des rats SHR (Maeno *et al.* 1996). Bien que son activité inhibitrice soit relativement faible (Tableau 3), la diminution de la pression artérielle a été maintenue de 2 à 10 heures après administration orale. Mais il a été observé que ce peptide pouvait être converti *in vivo*, *via* digestion pancréatique, en un hexapeptide d'activité inhibitrice plus forte (Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro) possédant une activité antihypertensive aussi importante que celle obtenue avec l'heptapeptide. Le cas de cet heptapeptide fait qu'il peut être considéré comme une forme pro-peptidique de l'hexapeptide, plus actif, libéré par l'action des enzymes gastro-intestinales.

Dans une autre étude, le dipeptide Tyr-Pro a été identifié dans un lactosérum de yogourt fermenté par *L. helveticus* CPN 4. Ce composé actif a montré une activité antihypertensive dose-dépendante (de 0,1 à 10 mg/kg) lorsqu'il était administré oralement à des rats SHR (Yamamoto *et al.* 1999). Comme pour les peptides Val-Pro-Pro et Ile-Pro-Pro isolés dans le calpis, Tyr-Pro a été considéré comme la principale molécule impliquée dans l'effet antihypertenseur observé chez les rats SHR.

L'administration orale d'un hydrolysat trypsique de caséine a induit un effet antihypertenseur chez des rats SHR (Karakaki *et al.* 1990). L'administration biquotidienne de 10 g de ce même hydrolysat sur une période de 4 semaines à des sujets modérément hypertendus a permis de réduire significativement la pression artérielle sans affecter le rythme cardiaque et sans montrer d'effet hypotenseur (Sekiya *et al.* 1992).

Plusieurs peptides inhibiteurs de l'ECA ont été obtenus à partir de différents produits laitiers (petit lait, caséine α -lactalbumine et β -lactoglobuline) ayant subi soit des traitements enzymatiques (avec la pepsine, la trypsine, la chymotrypsine, la pancréatine, l'élastase, la

carboxypeptidase ou des préparations enzymatiques commerciales), soit des fermentations avec différents micro-organismes (Mullally *et al.* 1997a,b ; Pihlanto-Leppälä *et al.* 1998, 2000 ; Tausin *et al.* 2002). Dans chaque cas, les auteurs ont montré que l'hydrolyse était nécessaire pour produire des peptides inhibiteurs de l'ECA. Cependant, aucune corrélation n'a été établie entre le temps d'hydrolyse et la production de peptides inhibiteurs (Mullally *et al.* 1997a). La plus forte activité inhibitrice a été obtenue après hydrolyse trypsique du petit lait, avec, dans l'ordre décroissant de d'activité, le petit lait > l' α -lactalbumine > la β -lactoglobuline (Mullally *et al.* 1997a ; Pihlanto-Leppälä *et al.* 2000, 2001). Les fractions de faible poids moléculaire (< 1-3 kDa) isolées des hydrolysats de petit lait, α -lactalbumine et β -lactoglobuline se sont montrées les plus riches en peptides présentant des propriétés inhibitrices de l'ECA (Mullally *et al.* 1996, 1997b ; Pihlanto-Leppälä *et al.* 2000). Suite à ces résultats, les auteurs ont préconisé l'enrichissement de certaines préparations laitières en peptides inhibiteurs par ultrafiltration.

Pour Leclerc *et al.* (2002), la caséine semble être meilleur substrat que les protéines du petit lait pour les protéinases extracellulaires de deux souches de *L. helveticus* (R211 et R389). Lors du processus fermentaire du lait, la protéolyse par ces enzymes a permis de libérer des peptides inhibiteurs de l'ECA ayant une activité antihypertensive chez le Rat SHR. Il semblerait que cet effet du lait enrichi en caséine soit en relation avec les peptides inhibiteurs de l'ECA libérés au cours du processus digestif (Leclerc *et al.* 2002).

D'autres peptides aux propriétés inhibitrices ont été identifiés dans les laits fermentés par *Lactobacillus delbrueckii* sbsp. *bulgaricus* ou *Lactobacillus lactis* sbsp. *cremoris* (Gobbetti *et al.* 2000), dans une boisson Masaï obtenue par fermentation du lait de Zébu (Isono, 1996) et dans un hydrolysat de β -lactoglobuline caprin (Hernandez-Ledesma *et al.* 2002), cependant aucun n'a été testé in vivo. Le Kéfir, un lait fermenté préparé à partir d'un bouillon de culture comprenant des bactéries lactiques, une souche de *Saccharomyces kefir* et certaines espèces de bactéries acétiques, a montré des propriétés antihypertensives chez le Rats SHR malgré une faible activité inhibitrice de l'ECA (Kuwabara *et al.* 1995). Mais pour le moment, les peptides retrouvés dans le kéfir ne semblent pas être les substances principales impliquées dans l'effet antihypertenseur.

Les études sur les fromages ont montré qu'une forte activité inhibitrice de l'ECA était observée après un processus de digestion protéasique (Saito *et al.* 2000). Il a ainsi été démontré que la protéolyse ayant lieu lors de l'affinage des fromages, permettait d'augmenter le taux d'activité inhibitrice de l'ECA jusqu'à un certain niveau, au-delà duquel cette activité diminue (Smacchi & Gobbetti 2000). Cette constatation indique que des peptides inhibiteurs

de l'ECA peuvent être naturellement présents dans le fromage, mais pour cela, la protéolyse doit s'effectuer sur une période limitée avant que ces molécules bioactives ne soient converties en peptides inactifs et acides aminés lors de la maturation (Ryhänen *et al.* 2001). Il a été observé que le temps de maturation optimal pour la production de cette activité était de 13 semaines pour les fromages de type « Festivo » (un fromage allégé) et de 8 mois pour un fromage de type « Manchego » (Ryhänen *et al.* 2001 ; Gomez-Ruiz *et al.* 2002).

La diversité de composition des laits fait que les différents fromages sont une source de peptides antihypertenseurs (Abubakar *et al.* 1996, 1998 ; Saito *et al.* 2000) permettant le développement d'un nouveau genre de produit lacté fermenté aux propriétés antihypertensives (Abubakar *et al.* 1998). Plusieurs peptides inhibiteurs de l'ECA ont été isolés de fromages : 5 oligopeptides issus d'une hydrolyse par la protéinase K, et 2 nonapeptides retrouvés dans le Gouda ont pu être ainsi identifiés (Tableau 3 ; Abubakar *et al.* 1998 ; Saito *et al.* 2000). Administrés oralement à des rats SHR, ces peptides se sont montrés antihypertenseurs bien qu'ayant une IC_{50} relativement élevée. Les auteurs en ont déduit que dans le cas des nonapeptides, composés de relativement haut poids moléculaire, ces derniers devaient être métabolisés *via* des peptidases et/ou protéases spécifiques avant de passer la barrière gastro-intestinale et d'exercer leur activité antihypertensive (Saito *et al.* 2000).

Dans le lait, les caséines forment la principale classe de protéines. Elles représentent environ 40 % des protéines du lait chez l'Homme et 80 % chez le ruminant (Kim *et al.* 1999). Parmi cette catégorie de protéines, on retrouve la β -caséine qui est, quantitativement, la plus importante chez l'Homme. Dans sa structure primaire sont retrouvés des fragments conservés de proline. La proline est un acide aminé relativement important dans la structure des peptides inhibiteurs de l'ECA, surtout si elle se retrouve en position C-terminale (Cheung *et al.* 1980 ; paragraphe 5.4.2). Ainsi, Kohmura *et al.* (1989) ont testé 69 fragments peptidiques issus de β -caséine humaine et identifié 2 peptides fortement inhibiteurs de l'ECA et actifs *in vivo* (Tableau 3).

Récemment, une étude a été menée sur l' α_{S1} -caséine issue de lait humain. Cette sous-unité de l' α -caséine, identifiée en 1994, représente seulement 0,06 % des protéines totales du lait humain. Trois peptides inhibiteurs de l'ECA ont été identifiés dans un hydrolysats tryptique d' α_{S1} -caséine (IC_{50} = 25 à 133 μ M). L'étude de leur fragment C-terminal a montré que le tripeptide Leu-Gln-Trp (IC_{50} = 3,8 μ M) était résistant à l'hydrolyse par la pepsine et la pancréatine. Dans le cas où ce peptide puisse être produit naturellement, les auteurs ont émis l'hypothèse qu'il pourrait être résorbés directement dans le tractus gastro-intestinal pour produire un effet physiologique chez l'Homme (Kim & Chung 1999).

Tableau 3. Peptides antihypertenseurs isolés d'hydrolysats de produits laitiers.

Structure	Origine	IC ₅₀ (µM)*	Dose†	Δ PS (mm Hg)‡	Références
Gly-Lys-Pro	Lactosérum/β ₂ -m	352	8 mg/kg p.o.	-26 après 6h	Abubakar <i>et al.</i> (1998)
Ile-Pro-Ala	Lactosérum/β-Ig	141	8 mg/kg p.o.	-31 après 6h	Abubakar <i>et al.</i> (1998)
Ile-Pro-Pro	Lait/β et κ-cn	5	1 mg/kg p.o.	-15,1 après 6h	Nakamura <i>et al.</i> (1995a,b)
Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro	β-cn	5	1 mg/kg p.o.	-32,2 après 6h	Maeno <i>et al.</i> (1996)
Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln	β-cn	1000	0,5 mg/kg p.o.	-20 après 6h	Maeno <i>et al.</i> (1996)
Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys	Lait/cn	77	14,2 mg/kg i.v.	Ang I	Maruyama <i>et al.</i> (1987)
Phe-Pro	Lactosérum/β-cn	315	8 mg/kg p.o.	-27 après 6h	Abubakar <i>et al.</i> (1998)
Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro	Lait/β-cn	4,4	4-8 mg/kg i.v.	Ang I	Kohmura <i>et al.</i> (1989)
Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp	Lait/α _{S1} -cn	16	31,8 mg/kg i.v.	Ang I	Maruyama <i>et al.</i> (1987)
Tyr-Gly-Leu-Phe	Lactosérum/α-la	733	0,1 mg/kg s.c.	-23 après 1h	Nurminen <i>et al.</i> (2000)
Tyr-Pro	Lactosérum/α,β and κ-cn	720	0,1 mg/kg p.o.	-10,2 après 6h	Yamamoto <i>et al.</i> (1999)
Val-Pro-Pro	Lait/β-cn	9	0,4 mg/kg p.o.	-11,2 après 6h	Nakamura <i>et al.</i> (1995a,b)
Val-Tyr-Pro	Lactosérum/β-cn	288	8 mg/kg p.o.	-21 après 6h	Abubakar <i>et al.</i> (1998)
Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly	Lactosérum/β-cn	221	8 mg/kg p.o.	-22 après 6h	Abubakar <i>et al.</i> (1998)

|| Note : cn : caséine ; β₂-m : β₂-microglobuline ; β-Ig : β-lactoglobuline ; α-la : α-lactalbumine.

* IC₅₀ ; concentration nécessaire pour inhiber 50 % de l'activité enzymatique.

† Dose requise à la production d'un effet significatif chez le rat SHR (p.o. : Administration orale ; i.v. : Injection intraveineuse ; s.c. : Injection Sous-cutanée).

‡ Diminution de la pression systolique (PS) par rapport à la ligne de base (Ang I: Inhibition de l'effet presseur de l'angiotensine I).

5.3.3 Peptides retrouvés dans les produits végétaux

Plusieurs peptides inhibiteurs de l'ECA ont été retrouvés dans des végétaux comme le soja (Suetsuna 1991b), le germe de blé (Matsui *et al.* 1999), la dioscorine d'igname de Chine (Hsu *et al.* 2002), la légumine de pois chiche (Yust *et al.* 2003), le gluten (Suh *et al.* 1999) ainsi que dans des hydrolysats d' α - et γ -zéine (Maruyama *et al.* 1989a ; Miyoshi *et al.* 1991a).

Les premières études sur les hydrolysats de γ -zéine ont montré la présence de peptides inhibiteurs de l'ECA (Maruyama *et al.* 1989a). La protéine zéine, identifiée pour la première fois dans l'endosperme de maïs en 1821, est devenue rapidement le sujet de nombreuses recherches. Déficiente en acides aminés lysine et tryptophane, cette protéine est considérée comme de faible valeur nutritionnelle. Les études réalisées sur la zéine se sont alors plus focalisées sur sa possible utilisation en tant que polymère industriel. La zéine est une protéine hétérogène constituée d'agrégats (de poids moyen 44 kDa) reliés entre eux par des ponts disulfures (Shukla & Cheryan 2001). Les différentes fractions isolées ont été nommées α -, β - et γ -zéine en fonction de leur solubilité dans l'isopropanol. Suivant le génotype du maïs, l' α -zéine représente 75-85 % de la zéine totale, la β -zéine 10-15 % et la γ -zéine 5-10 % (Esen 1987). Maruyama *et al.* (1989a) ont étudié l'activité d'une séquence répétée 6 fois et retrouvée dans la γ -zéine (Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro). L'activité inhibitrice de cet hexapeptide ($IC_{50} = 200 \mu M$) était plus faible que celle de deux fragments synthétiques (Val-His-Leu-Pro-Pro, $IC_{50} = 18 \mu M$; Leu-Pro-Pro, $IC_{50} = 9,6 \mu M$). L'administration i.v. de ces fragments synthétiques a montré un effet antihypertenseur chez les rats normotendus (Tableau 4), effet vraisemblablement médié par l'inhibition de l'ECA. Bien que l'hexapeptide soit retrouvé dans les hydrolysats de γ -zéine, sa conversion en fragments plus actifs reste encore à vérifier. En effet, la seule présence de deux prolines en C-terminal doit rendre cet hexapeptide résistant à l'hydrolyse enzymatique par l'ECA et les carboxypeptidases.

L'hydrolyse de l' α -zéine par différentes enzymes (thermolysine, chymotrypsine, subtilisine, trypsine, papaine et pepsine) a permis de produire des peptides fortement inhibiteurs de l'ECA (IC_{50} allant de 21 à 230 $\mu g/mL$, Tableau 4). La plus forte activité a été obtenue avec la digestion par la thermolysine. Cet hydrolysat a induit un effet antihypertenseur significatif 3 à 6 heures après administration unique par voie intraveineuse (2 g/kg) ou p.o. (5 g/kg) chez le Rat SHR (Miyoshi *et al.* 1991a,b). Plusieurs autres peptides ont été isolés de l' α -zéine mais ils restent encore à être testés *in vivo* (Yano *et al.* 1996).

Dans le gluten de blé, un hexapeptide (Pro-Ser-Gly-Gln-Tyr-Tyr) a été isolé suite à l'hydrolyse par la pascalase (protéase à sérine issue de *Bacillus licheniformis*) et a montré un

effet antagoniste vis-à-vis de l'angiotensine I in vivo. Cependant, par rapport à son IC₅₀ (0,1 mM), la dose requise pour observer un effet était élevée (30 mg/kg i.v.). Les auteurs en ont alors déduit que ce peptide devait être rapidement inactivé lors du processus digestif comme c'est souvent le cas avec les grands peptides (Suh *et al.* 1999). Une autre explication peut être aussi une mauvaise résorption du peptide. Récemment, un hydrolysate de gluten a permis de diminuer la pression sanguine des rats SHR 2 heures après administration i.p. (Saiga *et al.* 2003).

L'hydrolyse des protéines de graines de colza par la protéase subtilisine (de *Bacillus licheniformis*) a révélé la présence de peptides inhibiteurs de l'ECA capables de montrer un effet antihypertenseur in vivo (Tableau 4). Cet hydrolysate, administré à des rats SHR a permis de diminuer significativement leur pression sanguine 2 heures après administration orale (0,15 g/kg ; Marczak *et al.* 2003).

En Extrême-Orient, le soja est la principale source de protéines d'alimentation humaine. La valeur nutritionnelle du soja étant relativement faible, ce produit est consommé fermenté. Plusieurs études ont montré que des aliments à base de soja avaient des propriétés biologiques. Ainsi une solution de tripeptides issue d'un hydrolysate de soja a montré un effet antihypertenseur significatif 30 minutes après administration orale chez le Rat SHR (à 600 et 1200 mg/kg ; Suetsuna, 1991b). D'autres produits fermentés à base de soja, tels que le natto, ont montré une capacité à inhiber l'ECA (Kinoshita *et al.* 1993 ; Okamoto *et al.* 1995b) qui s'est traduite par une activité antihypertensive in vivo (Kinoshita *et al.* 1993). De même, un régime à base de soja a récemment montré un effet antihypertenseur lorsqu'il était administré à des rats femelles SHR (Martin *et al.* 2001a).

Deux études récentes ont montré que des oligopeptides (< 1 kDa) obtenus après digestion alcaline de graines de soja fermentées diminuaient la tension artérielle chez le Rat SHR (Wu & Ding 2001 ; Shin *et al.* 2001). L'hydrolyse des protéines de soja par l'alcalase a permis de libérer des petits peptides (PM < 954 Da) inhibiteurs de l'ECA (Wu & Ding 2001). Administré oralement à des rats SHR (aux doses de 100, 500 et 1000 mg/kg/jour pendant 30 jours), l'hydrolysate a permis de diminuer significativement leur pression systolique à partir du 6^{ème} jour de traitement (pour les doses de 500 et 1000 mg/kg) et du 12^{ème} jour (pour la dose de 100 mg/kg). A l'inverse, le même protocole suivi avec des rats normotendus et avec la dose la plus élevée n'a pas permis d'observer d'effet (Wu & Ding, 2001). Les tests sérologiques et histologiques réalisés sur les rats SHR traités (comparés aux rats SHR témoins) ont montré une natrémie réduite, alors que l'activité de l'ECA est restée inchangée dans le sérum, l'aorte et les poumons. Un tripeptide inhibiteur de l'ECA (His-His-Leu) a été

isolé d'une pâte de soja coréenne fermentée. Ce peptide a montré un fort pouvoir inhibiteur ($IC_{50} = 2,2 \mu\text{g/mL}$) ainsi qu'une activité antihypertensive in vivo (Shin *et al.* 2001). L'administration unique par voie intraveineuse (5 mg/kg) à des rats SHR a significativement baissé leur pression systolique après 10 minutes. De plus, l'injection répétée (trois fois) de His-His-Leu (5 mg/kg à 20 minutes d'intervalle) a significativement diminué l'activité de ECA dans l'aorte mais pas dans le sérum (Shin *et al.* 2001).

Un hydrolysate de germe de blé, produit par la protéase alcaline de *Bacillus licheniformis* a montré une activité inhibitrice de l'ECA ($IC_{50} = 0,67 \text{ mg/mL}$). Seize oligopeptides, dont l' IC_{50} est $< 20 \mu\text{M}$, ont pu être isolés. Parmi eux, le tripeptide (Ile-Val-Tyr) a été considéré comme le principal protagoniste de l'activité inhibitrice retrouvée dans l'hydrolysate, en raison notamment de sa prédominance (21,6 mg/100 g) ainsi qu'à son activité inhibitrice ($IC_{50} = 0,48 \mu\text{M}$; Matsui *et al.* 1999). Ce peptide s'est montré résistant à la digestion par les enzymes gastro-intestinales (Matsui *et al.* 1999). De plus, il dispose dans sa structure de la séquence Val-Tyr ($IC_{50} = 5,2 \mu\text{M}$) connue pour ses propriétés antihypertensives chez l'Homme (Kawasaki *et al.* 1998, 2000). Après administration i.v., Ile-Val-Tyr a diminué la pression artérielle systolique chez le Rat SHR (Tableau 4). Le suivi métabolique de ce tripeptide et de ses produits de dégradation (Val-Tyr et Tyr) chez le Rat et chez l'Homme, a montré une forte accumulation de Val-Tyr au niveau plasmatique. Dans chaque cas, ce tripeptide a été complètement métabolisé en 24 heures par les aminopeptidases plasmatiques et l'effet antihypertenseur observé in vivo a été attribué à l'effet combiné de Ile-Val-Tyr et Val-Tyr (Matsui *et al.* 2000).

Plusieurs peptides ont été isolés de produits végétaux autres que le soja, le blé ou le maïs. La dioscorine, est une protéine de réserve retrouvée dans le tubercule d'igname de Chine (*Dioscorea alata cv. Tainong No.1*). Des hydrolysats pepsiques de cette protéine ont montré une activité inhibitrice de l'ECA in vitro (Hsu *et al.* 2002). De la même manière, la digestion de la légumine, principale protéine de réserve des graines de pois chiche, a produit des peptides inhibiteurs de l'ECA (Yust *et al.* 2003). Pour ces deux derniers cas, l'étude in vivo reste à faire pour démontrer leur possible action antihypertensive. Récemment, une étude réalisée sur les graines de sarrasin hydrolysées par la pepsine puis par la chymotrypsine et la trypsine a montré la présence d'une activité inhibitrice de l'ECA dans l'hydrolysate ($IC_{50} = 0,14 \text{ mg protéine/mL}$). L'administration unique par voie orale de cet hydrolysate a permis de réduire la pression artérielle systolique des rats SHR (Li *et al.* 2002 ; Tableau 5) ce qui laisse supposer que les protéines de sarrasin peuvent produire naturellement des peptides antihypertenseurs *via* le processus de digestion gastro-intestinale.

Tableau 4. Peptides antihypertenseurs isolés de céréales et de plasmas.

Structure	Origine	IC ₅₀ (µM)*	Dose†	Δ PS (mm Hg)‡	Références
Arg-Ile-Tyr	Graine de colza	28	7,5 mg/kg p.o.	-10,8 après 2h	Marczak <i>et al.</i> 2003
Gly-Lys-Lys-Val-Leu-Gln	Hémoglobine de porc	1,9	50 mg/kg p.o.	-30 après 3h	Mito <i>et al.</i> (1996)
Gly-Lys-Lys-Val-Leu-Gln	Hémoglobine de porc	1,9	500 mg/kg p.o.	Ang I	Mito <i>et al.</i> (1996)
His-His-Leu	Soja	2,2 µg/mL	5 mg/kg i.v.	-32 après 30 min	Shin <i>et al.</i> (2001)
Ile-Tyr	Graine de colza	3,7	7,5 mg/kg p.o.	-9,8 après 2h	Marczak <i>et al.</i> 2003
Ile-Val-Tyr	Blé	0,48	5 mg/kg i.v.	-19,2 après 8 min	Matsui <i>et al.</i> (2000)
Leu-Pro-Pro	Endosperme de maïs	9,6	160 mg/kg i.v.	Ang I	Maruyama <i>et al.</i> (1989a)
Leu-Thr-Ala	Plasma de cochon	85	50 mg/kg i.v.	-19,6 après 2h	Suetsuna (1991a)
Leu-Thr-Pro	Plasma de cochon	138	50 mg/kg i.v.	-28,2 après 2h	Suetsuna (1991a)
Phe-Gln-Lys-Val-Val-Ala	Hémoglobine de porc	5,8	50 mg/kg p.o.	-30 après 30 min	Mito <i>et al.</i> (1996)
Phe-Gln-Lys-Val-Val-Ala	Hémoglobine de porc	5,8	500 mg/kg p.o.	Ang I	Mito <i>et al.</i> (1996)
Pro-Ser-Gly-Gln-Tyr-Tyr	Gluten de blé	100	30 mg/kg i.v.	Ang I	Suh <i>et al.</i> (1999)
Ser-Leu-Tyr	Plasma de cochon	45	50 mg/kg i.v.	-29,5 après 2h	Suetsuna (1991a)
Tyr-Thr-Lys	Plasma de cochon	82	50 mg/kg i.v.	-28,9 après 2h	Suetsuna (1991a)
Val-His-Leu-Pro-Pro ^c	Endosperme de maïs	18	125 mg/kg i.v.	Ang I	Maruyama <i>et al.</i> (1989a)
Val-Trp	Graine de colza	1,6	7,5 mg/kg p.o.	-10,8 après 2h	Marczak <i>et al.</i> 2003
Val-Trp-Ile-Ser	Graine de colza	30	12,5 mg/kg p.o.	-12,5 après 2h	Marczak <i>et al.</i> 2003

* IC₅₀ ; concentration nécessaire pour inhiber 50 % de l'activité enzymatique.

† Dose requise à la production d'un effet significatif chez le rat SHR (p.o. : Administration orale ; i.v. : Injection intraveineuse).

‡ Diminution de la pression systolique (PS) par rapport à la ligne de base (Ang I: Inhibition de l'effet presseur de l'angiotensine I).

|| Pression artérielle moyenne

5.3.4 Peptides produits à partir du plasma

Le sang animal est une source notoire de protéines. Elles sont couramment utilisées pour leurs propriétés émulsifiantes, stabilisatrices, clarifiantes ou encore en tant que suppléments nutritionnels. Dans les abattoirs, seulement une petite fraction du sang animal est conservée pour être utilisée, le reste étant retraité et éliminé. Les recherches se sont donc focalisées sur l'utilisation de ces sous-produits comme une source de protéines et peptides bioactifs.

Le sang est constitué de cellules (leucocytes, érythrocytes, lymphocytes et thrombocytes) baignant dans un milieu complexe, le plasma. Son principal rôle est de transporter l'oxygène, les nutriments, les hormones et les électrolytes vers les organes et les cellules et d'en récupérer le dioxyde de carbone et les déchets. Suivant les espèces, le plasma représente 55-70 % du volume total du sang. Il est principalement constitué d'eau (90 %), d'électrolytes, d'hydrates de carbone, de lipides et de protéines. Les protéines du sang sont essentiellement constituées d'albumines (50 % environ) et de globulines (23-27 %). A partir de ces données, les protéines plasmatiques ont été utilisées pour produire des peptides inhibiteurs de l'ECA, et de fait, 6 ont été isolés du plasma porcin (Hazato & Kase 1986 ; Park *et al.* 1996 ; Suetsuna 1991a). Parmi ces peptides, 4 ont montré une activité antihypertensive après administration unique par voie intraveineuse chez le Rat SHR (Tableau 4).

L'hydrolyse enzymatique de plasma bovin et de ses protéines principales (albumines et globulines) a permis de produire des peptides inhibiteurs de l'ECA. Selon les protéases utilisées, l'hydrolyse des protéines plasmatiques bovines avec l'alcalase a favorisé la production de peptides à activité inhibitrice de l'ECA, avec une plus forte activité obtenue lors de l'hydrolyse de l'albumine (Hyun & Shin 2000). Dans chaque cas, la fraction peptidique de faible poids moléculaire (< 1 kDa) a été la plus active pour inhiber l'ECA, comme l'avaient précédemment remarqué par Pihlanto-Leppälä *et al.* (2000, 2001) en référence aux hydrolysats de certains produits laitiers.

Quatre peptides inhibiteurs ont été isolés suite à la digestion d'hémoglobine de Porc. Deux d'entre eux ont montré des propriétés antihypertensives chez le Rat SHR après administration orale unique (à la dose de 50 mg/kg ; Tableau 4). L'utilisation d'une plus forte dose (500 mg/kg) de ces mêmes peptides, sur des rats normotendus, a inhibé l'effet vasopresseur de l'administration d'angiotensine I, renforçant ainsi l'hypothèse du mécanisme d'action de ces peptides par inhibition de l'ECA (Mito *et al.* 1996).

Les études sur des hydrolysats pepsiques d'hémoglobine ont révélé la présence de peptides biologiquement actifs appelés hémorphines. Les hémorphines sont des molécules

endogènes produites dans le plasma au cours du processus physiologique et pathologique de la dégradation de l'hémoglobine. Ces peptides ont la particularité de posséder une forte affinité pour les récepteurs opioïdes, et seuls quelques-uns ont montré un effet inhibiteur de l'ECA (Lantz *et al.* 1991 ; Zhao *et al.* 1994 ; Zhao & Piot 1997). D'autres peptides aux propriétés inhibitrices ont été isolés à partir de plasma humain. Ainsi, Nakagomi *et al.* (1998, 2000a,b) ont évalué différents peptides en partant du principe que le corps humain était la meilleure source de molécules biologiquement actives pour leur utilisation en tant que médicament, car les substances isolées du corps sont censées être « non toxiques ». Cette dernière affirmation reste entre guillemets car le sang n'est pas seulement un réservoir de molécules saines, c'est aussi le système épurateur du corps humain par où transitent les déchets qui doivent être éliminés. Pour le moment, 4 peptides inhibiteurs de l'ECA ont été isolés du plasma humain, l'acein 1 (Tyr-Leu-Tyr-Glu-Ile-Ala-Arg), l'acein 2 (Leu-Ile-Tyr), Ala-Trp et l'albutensine A (Ala-Phe-Lys-Ala-Trp-Ala-Val-Ala-Arg) dont les IC₅₀ sont 16 ; 0,82 ; 12 et 1,7 µM respectivement (Nakagomi *et al.* 1998, 2000a,b). Leur effet *in vivo* reste cependant à évaluer.

5.3.5 Peptides issus d'autres sources naturelles

De nombreux autres aliments ont montré qu'ils pouvaient contenir et/ou produire des peptides inhibiteurs de l'ECA. Par exemple, des peptides inhibiteurs sont retrouvés dans les muscles de poulet et de porcs, les œufs, l'ail, la gélatine, le latex de figuier, le saké, le vin, les autolysats bactériens, le foie de calmar, les muscles de mante, les champignons, la gelée royale d'abeille, les haricots nains ainsi que certains fruits et thés (Arihara *et al.* 2001 ; Ariyoshi 1993 ; Choi *et al.* 2001 ; Fujita *et al.* 2000 ; Furushiro *et al.* 1990 ; Lee *et al.* 1999 ; Maruyama *et al.* 1989b ; Matsui *et al.* 2002a ; Oshima *et al.* 1979 ; Saito *et al.* 1994a ; Suetsuna 1998b ; Takayanagi & Yokotsuka 1999 ; Wako *et al.* 1996). Les hydrolysats ainsi que les peptides isolés de ces différentes sources ayant montré des effets antihypertenseurs *in vivo* sont représentés dans les Tableaux 5 et 6 respectivement.

Oshima *et al.* (1979) ont été les premiers à rapporter l'identification de peptides inhibiteurs de l'ECA issus de protéines alimentaires. Neufs peptides d'une longueur allant de trois à douze résidus acides aminés ont été isolés à partir d'une digestion de gélatine par une collagénase. Leur pré-incubation avec l'ECA a permis de mettre en évidence que certains de ces peptides étaient des substrats plutôt que des inhibiteurs de l'enzyme.

Tableau 5. Hydrolysats alimentaires montrant une activité antihypertensive.

Source	Fraction	IC ₅₀ *	Dose†	Δ PS (mm Hg)‡	Références
Œufs	Jaunes d'œufs < 1 kDa	1,22 mg m.s./mL	20 mg/kg/jour p.o.	-11,3 après 5 sem.	Yoshii <i>et al.</i> (2001)
Porc	Hydrolysats de muscles	n.d.	210 mg/kg p.o.	-15,8 après 6h	Nakashima <i>et al.</i> (2002)
Porc	Hydrolysats de myosine	n.d.	30 mg/kg p.o.	-24,9 après 6h	Nakashima <i>et al.</i> (2002)
Lies de saké	Hydrolyse par la Thermoase	n.d.	1000 mg/kg p.o.	-21 après 4h	Saito <i>et al.</i> (1994a)
Saké	Peptides Présents	n.d.	1000 mg/kg p.o.	-22 après 6h	Saito <i>et al.</i> (1994a)
Porc	Hydrolysats de myofibrilles	3,7 mg %	1 g/kg i.p.	-22 après 2h	Saiga <i>et al.</i> (2002)
Blé	Hydrolysats de gluten	3,9 mg %	1 g/kg i.p.	-33 après 2h	Saiga <i>et al.</i> (2002)
Colza	Hydrolysats (subtilisine)	0,16 mg/mL	0,15 g/kg	-10 après 2h	Marczak <i>et al.</i> (2003)
Sarrazin	Hydrolysats PCT §	0,14 mg p./mL	100 mg/kg p.o.	-27 après 2h	Li <i>et al.</i> (2002)
Poulet	Hydrolysats de muscle	1060 mg %	1000 mg/kg p.o.	-45 après 2h	Saiga <i>et al.</i> (2003)
Poulet	Muscle	1,1 mg %	1000 mg/kg p.o.	-50 après 3h	Saiga <i>et al.</i> (2003)
Gelée royale	Hydrolysats PCT §	99 µg p./mL	1000 mg/kg p.o.	-22,7 après 2h	Matsui <i>et al.</i> (2002a)

* IC₅₀ ; concentration nécessaire pour inhiber 50 % de l'activité enzymatique (m.s. : matière sèche; p. : protéine ; n.d. : non déterminé).

† Dose requise à la production d'un effet significatif chez le rat SHR (p.o. : Administration orale).

‡ Diminution de la pression systolique (PS) par rapport à la ligne de base.

§ Hydrolyse peptique puis par la chymotrypsine et la trypsine.

Tableau 6. Peptides antihypertenseurs isolés de sources naturelles.

Structure	Origine	IC ₅₀ (µM)*	Dose†	Δ PS (mm Hg)‡	Références
Arg-Phe	Saké	93	100 mg/kg p.o.	-24 après 4h	Saito <i>et al.</i> (1994a)
Asn-Phe	Extrait d'ail	46,3	200 mg/kg p.o.	-54 après 1h	Suetsuna (1998b)
Asn-Tyr	Extrait d'ail	32,6	200 mg/kg p.o.	-33 après 3h	Suetsuna (1998b)
Gly-Phe	Extrait d'ail	277,9	200 mg/kg p.o.	-21 après 1h	Suetsuna (1998b)
Gly-Tyr	Extrait d'ail	72,1	200 mg/kg p.o.	-54 après 4h	Suetsuna (1998b)
Ile-Ala-Tyr-Lys-Pro-Ala-Gly	Rubisco d'épinards	4,2	100 mg/kg p.o.	-9,8 après 4h	Yang <i>et al.</i> (2003)
Ile-Lys-Trp	Muscles de poulet	0,21	60 mg/kg p.o.	-17 après 4h	Fujita <i>et al.</i> (2000)
Ile-Lys-Trp	Muscles de poulet	0,21	10 mg/kg i.v.	-50	Fujita <i>et al.</i> (2000)
Ile-Thr-Thr-Asn-Pro	Muscles de porc	549,0	1 mg/kg p.o.	-21 après 6h	Nakashima <i>et al.</i> (2002)
Ile-Tyr-Pro-Arg-Tyr	Saké	4,1	100 mg/kg p.o.	-19 après 6h	Saito <i>et al.</i> (1994b)
Leu-Lys-Pro	Muscles de poulet	0,32	60 mg/kg p.o.	-18 après 4h	Fujita <i>et al.</i> (2000)
Leu-Lys-Pro	Muscles de poulet	0,32	10 mg/kg i.v.	-75	Fujita <i>et al.</i> (2000)
Met-Arg-Trp	Rubisco d'épinards	0,6	20 mg/kg p.o.	-20 après 2h	Yang <i>et al.</i> (2003)
Met-Arg-Trp-Arg-Asp	Rubisco d'épinards	2,1	30 mg/kg p.o.	-10 après 2h	Yang <i>et al.</i> (2003)
Met-Asn-Pro-Pro-Lys	Muscle de porc	945,5	1 mg/kg p.o.	-23,4 après 6h	Nakashima <i>et al.</i> (2002)
Phe-Tyr	Extrait d'ail	3,74	200 mg/kg p.o.	-29 après 4h	Suetsuna (1998b)
Ser-Phe	Extrait d'ail	130,2	200 mg/kg p.o.	-33 après 1h	Suetsuna (1998b)
Ser-Tyr	Extrait d'ail	66,3	200 mg/kg p.o.	-50 après 4h	Suetsuna (1998b)
Tyr-Trp	Lies de saké	10,5	100 mg/kg p.o.	-28 après 6h	Saito <i>et al.</i> (1994a)
Val-Trp	Lies de saké	1,4	100 mg/kg p.o.	-26 après 4h	Saito <i>et al.</i> (1994a)
Val-Tyr	Lies de saké	7,1	100 mg/kg p.o.	-31 après 6h	Saito <i>et al.</i> (1994a)

* IC₅₀ ; concentration nécessaire pour inhiber 50 % de l'activité enzymatique

† Dose requise à la production d'un effet significatif chez le rat SHR (p.o. : Administration orale ; i.v. : Injection intraveineuse).

‡ Diminution de la pression systolique (PS) par rapport à la ligne de base.

Les études réalisées sur les hydrolysats de gélatine bovine ont montré que la fraction regroupant les petits peptides (< 1 kDa) était celle qui présentait la plus forte activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec les hydrolysats de certains produits laitiers et de plasma (Hyun & Shin 2000 ; Pihlanto-Leppälä *et al.* 2000, 2001). Deux tripeptides inhibiteurs de l'ECA ont été récemment identifiés dans un hydrolysats de gélatine bovine (Kim *et al.* 2001). De même la digestion de gélatine provenant de merlans jaunes d'Alaska (*Theragra chalcogramma*) par différents traitements protéasiques (alcalase, pronase E et collagénase) a permis d'isoler deux nouveaux tripeptides inhibiteurs de l'ECA (Byun & Kim 2001).

L'hydrolyse d'une protéine d'œuf, l'ovalbumine (par la pepsine), de muscles de poulet et de porcins (par la thermolysine), ou de protéines du jaune d'œuf a permis de mettre en évidence des peptides ayant des propriétés antihypertensives chez le Rat SHR (Fujita *et al.* 2000 ; Arihara *et al.* 2001 ; Yoshii *et al.* 2001 ; Nakashima *et al.* 2002 ; Saiga *et al.* 2003). Par exemple, l'administration chronique (pendant 12 semaines) à des rats SHR d'une fraction oligopeptidique (< 1 kDa) d'un hydrolysats de jaunes d'œufs, a permis de supprimer le développement de l'hypertension pour des doses de 20, 100 et 500 mg/kg administrées quotidiennement par voie orale. La plus forte dose administrée aux animaux a diminué les pressions systolique, diastolique et moyenne d'environ 10 % par rapport à celles des animaux témoins (Yoshii *et al.* 2001). De même, l'administration répétée à long terme (pendant 16 semaines) d'un hydrolysats de poulet a diminué significativement la pression systolique de rats SHR après les six premières semaines de traitement (Chen *et al.* 2002). Par ailleurs, deux extraits préparés à partir de muscles de poulet ont permis de diminuer la pression artérielle lorsqu'ils étaient administrés oralement à des rats SHR (dose 1,0 g/kg ; Saiga *et al.* 2003). L'hydrolyse par la thermolysine de protéines solubles et de la myosine de muscles porcins ont permis de révéler une activité antihypertensive après administration orale unique à des rats SHR (aux doses de 210 et 30 mg/kg respectivement). Deux peptides inhibiteurs de l'ECA ont pu être identifiés dans l'hydrolysats de myosine, l'un appelé myopentapeptide A (Met-Asn-Pro-Pro-Lys), l'autre myopentapeptide B (Ile-Thr-Thr-Asn-Pro). L'administration orale de ces peptides à des rats hypertendus a montré un effet antihypertenseur à la dose de 1 mg/kg (Nakashima *et al.* 2002).

Les vertus nutritionnelles et médicinales de l'ail (*Allium sativum*) et des champignons sont reconnues depuis longtemps dans la plupart des cultures. Il est reconnu que la consommation régulière d'ail permet de diminuer les pressions systolique et diastolique chez des patients atteints d'hypertension (Ernst 1987). Suetsuna (1998a) a isolé, de l'ail, 7 dipeptides

inhibiteurs de l'ECA ayant des propriétés antihypertensives *in vivo*. Un extrait de Maitake (*Grifola frondosa*), champignon poussant dans l'hémisphère nord et régulièrement retrouvé au Japon, en Europe et en Amérique du Nord, a montré la plus forte activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA par rapport à d'autres extraits de champignons (Choi *et al.* 2001). Les peptides inhibiteurs de l'ECA isolés de cet extrait se sont montrés partiellement résistants à l'hydrolyse enzymatique par la trypsine.

Certaines boissons fermentées, telles le saké (alcool japonais obtenu par fermentation de riz) et le vin rouge contiennent des peptides dont certains ont été identifiés comme inhibiteurs de l'ECA (Saito *et al.* 1994a ; Takayanagi & Yokotsuka 1999). Les peptides isolés du saké et de lies de saké ont montré d'une part, une activité *in vitro* par inhibition de l'ECA et, d'autre part, une activité *in vivo* par diminution de la tension artérielle de Rats SHR (Saito *et al.* 1994a,b). Dans le vin rouge (élaboré à partir du cépage Muscat Bailey A), une activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA a été retrouvée et attribuée aux peptides formés au cours du processus fermentaire. Plusieurs peptides (dont les IC₅₀ sont comprises entre 17,5 et 83 µM) ont pu être identifiés, mais leur potentiel antihypertenseur *in vivo* n'a pas été testé (Takayanagi & Yokotsuka 1999).

Furushiro *et al.* (1990) ont décrit les propriétés antihypertensives d'un autolysat de *Lactobacillus casei* dans les rats SHR. L'administration unique par voie orale d'une fraction spécifique de l'autolysat (< 6-8 kDa) a significativement diminué la pression artérielle systolique chez le Rat SHR, et n'a montré aucun effet chez le Rat normotendu. L'administration répétée sur une longue période (5 à 17 semaines) a permis de supprimer le développement de l'hypertension chez le Rat SHR. Les travaux de Furushiro *et al.* (1990) ont permis de mettre en évidence que les fractions polysaccharidiques et protéiques de cet extrait étaient les plus à même à diminuer significativement la pression artérielle.

La RuBisCo (EC : 4.1.1.39) est une protéine relativement abondante dans les plantes. Sa fonction est de catalyser la fixation photosynthétique du CO₂. L'hydrolyse de la protéine Rubisco (issue d'épinards), par la pepsine et la pancréatine, a permis d'obtenir 4 peptides fortement inhibiteurs de l'ECA. Trois d'entre eux (Met-Arg-Trp, Met-Arg-Trp-Arg-Asp et Ile-Ala-Tyr-Lys-Pro-Ala-Gly) ont montré un effet antihypertenseur après administration orale à des rats SHR (Tableau 6 ; Yang *et al.* 2003).

La gelée royale d'abeille (*Apis mellifera* L.) est une substance laiteuse sécrétée par les jeunes travailleuses dans l'unique but de stimuler la croissance et le développement des reines. Cette gelée a été utilisée pendant des années pour le traitement et la prévention de la plupart des maux. Par exemple, la gelée royale a été utilisée pour ses divers effets bénéfiques

et notamment, contre la chute des cheveux, les problèmes de vue, l'hypertension, le diabète, les varices, le syndrome de fatigue chronique, l'anémie, le cancer, la dépression et l'anxiété. L'hydrolyse pepsique de gelée royale, suivie d'un traitement par la trypsine et la chymotrypsine a permis de produire des peptides fortement inhibiteurs de l'ECA ($IC_{50} < 10 \mu M$). Une administration unique par voie orale de cet hydrolysate (1 g/kg) à des rats SHR a diminué leur pression systolique de manière significative après 2 heures (Matsui *et al.* 2002a). Il semblerait donc que ces peptides soient formés *in vivo* au cours du processus de digestion dans le tractus gastro-intestinal.

5.4 RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE DES PEPTIDES INHIBITEURS DE L'ECA

Les relations structure-activité des peptides inhibiteurs de l'ECA et des inhibiteurs synthétiques de l'ECA ont été très étudiées depuis 30 ans. Des modèles de sites actifs ont été proposés dans le but de synthétiser l'inhibiteur de l'ECA le plus puissant et le plus sélectif possible.

5.4.1 Structure de l'ECA

L'enzyme de conversion de l'angiotensine I est une zinc-métallopeptidase capable de cliver les dipeptides C-terminaux de courtes hormones peptidiques. Elle joue un rôle dans la régulation de la pression sanguine *via* la production de l'angiotensine II (paragraphe 5.2). La structure tridimensionnelle de l'ECA, complexée avec le lisinopril (un inhibiteur de l'ECA) a été récemment élucidée par cristallographie aux rayons X (Natesh *et al.* 2003). Schématiquement, son domaine C-terminal (impliqué dans la régulation de la pression sanguine) inclut un site de fixation du Zn^{++} (motif His-Glu-x-x-His) et des sous-sites (ou poches) appelés S_1 , S'_1 et S'_2 , impliqués dans les interactions avec les substrats ou inhibiteurs de l'ECA (Figure 5).

Pour les substrats peptidiques, la poche S'_1 semble interagir avec l'acide aminé situé à l'avant-dernière position, et la poche S_1 avec l'acide aminé situé en antépénultième position. La fonction carboxylique de la liaison peptidique située entre l'avant-dernier et l'antépénultième acide aminé, interagit avec le motif fixant le Zn^{++} et forme aussi une liaison hydrogène avec le groupement carboxylique de la chaîne du glutamate en position 384 (Brew 2003). L'ECA est alors capable de cliver la liaison entre les résidus occupant les poches S_1 et S'_1 du substrat.

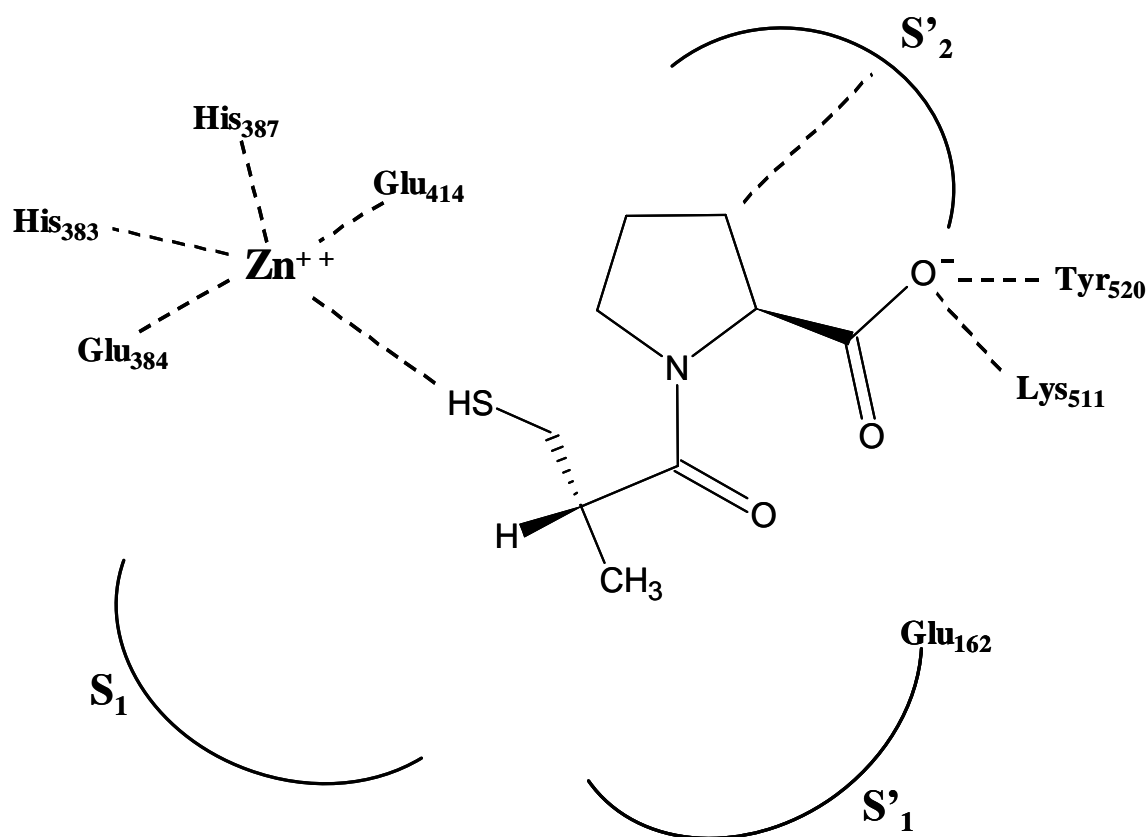


Figure 5. Modèle de fixation sur le site actif de l'ECA avec l'inhibiteur captopril (N-[(S)-3-Mercapto-2-méthylpropionyl]-L-Proline). Le site catalytique de l'ECA comprend un atome de zinc et son motif de fixation His₃₈₃-Glu₃₈₄-X-X-His₃₈₇. Les interactions non-covalentes entre l'enzyme et le captopril sont représentées en pointillé. Les sites S₁, S'₁ et S'₂ sont des poches qui interagissent avec les chaînes latérales des acides aminés constituant les substrats ou inhibiteurs de l'ECA. Pour les substrats, l'ECA clive la liaison peptidique entre les résidus aminoacides situés au niveau des sites S₁ et S'₁. Cette représentation schématique a été réalisée selon les modèles proposés par Cushman & Ondetti (1999) et Brew (2003).

5.4.2 Structure des peptides inhibiteurs de l'ECA

L'étude réalisée par Cheung *et al.* en 1980 a montré que la séquence dipeptidique C-terminale était importante pour la fixation des peptides inhibiteurs à l'ECA. Selon ces auteurs, les acides aminés aromatiques (Trp, Tyr et Phe) et la proline en position C-terminale sont les plus favorables à la fixation. Toujours selon ces mêmes auteurs, les acides aminés à chaîne latérale aliphatique (comme Val et Ile) favorisent la fixation des dipeptides s'ils sont situés en N-terminal du dipeptide. Par contre, une proline en N-terminal ou un acide aminé dicarboxylique en C-terminal diminuent fortement les capacités de fixation des dipeptides à l'ECA (Cushman *et al.* 1973 ; Cheung *et al.* 1980).

En regardant au-delà de la séquence dipeptidique, les résidus situés en amont peuvent aussi jouer un rôle dans la fixation à l'ECA. Ainsi, les acides aminés aromatiques situés en

antépénultième position (du côté C-terminal) améliorent la capacité de fixation à l'ECA (Cushman *et al.* 1973 ; Cheung *et al.* 1980). Kawakami *et al.* (1995) ont observé que certains tripeptides de synthèse, différents par leur acide aminé N-terminal, montraient une grande variabilité dans les valeurs d'IC₅₀. Les acides aminés aliphatiques (tels que Ala, Val, Leu ou Ile) sont les plus favorables pour montrer une activité inhibitrice (Leu-Lys-Tyr > Met-Lys-Tyr ; Kawakami *et al.* 1995 ; Suetsuna 1998a). Au regard de la littérature, ces résultats ont été corroborés par ceux de Matsumura *et al.* (1993a) et de Nakamura *et al.* (1995b) qui ont étudié des tripeptides synthétiques. De la même manière, Matsui *et al.* (1999) ont montré que 2 tétrapeptides (Thr-Ala-Pro-Tyr et Thr-Val-Pro-Tyr), différents par leur antépénultième résidu, avaient des valeurs d'IC₅₀ distinctes (13,6 et 2,0 µM, respectivement). Pour Miyoshi *et al.* (1991a), une leucine en antépénultième position est plus favorable à la fixation à l'ECA qu'une valine.

Les petits peptides peuvent exister sous différentes conformations et peuvent adopter des configurations spatiales variables. La configuration des acides aminés est un des facteurs déterminant l'affinité de fixation. Par exemple, le tripeptide L-Val-Ala-Pro dispose d'une IC₅₀ de 2 µM, alors que le D-Val-Ala-Pro à une IC₅₀ proche de 550 µM (Maruyama *et al.* 1987). De la même manière, L-Phe-Val-Ala-Pro et D-Phe-Val-Ala-Pro ont montré des valeurs d'IC₅₀ différentes, 10 et 17 µM, respectivement (Maruyama *et al.* 1987).

Toutefois, il est à noter que ces relations structure-activité sont basées sur des expériences *in vitro*. Les études *in vivo* (lorsqu'elles ont été réalisées) ont montré que ces caractéristiques structurales étaient souvent retrouvées pour les peptides ayant une activité antihypertensive. Par exemple, les dipeptides isolés d'hydrolysate d'ail et administrés oralement à des rats SHR (200 mg/kg), ont induit une diminution significative de leur pression systolique (Suetsuna 1998b). En regardant la structure de ces peptides, chacun d'eux disposait d'un résidu Tyr ou Phe en C-terminal. De plus, ceux disposant du résidu Tyr se sont montrés plus efficaces que ceux disposant du résidu Phe. Matsufuji *et al.* (1995) ont noté que le dipeptide Val-Tyr avait une forte activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA ainsi qu'une activité antihypertensive après injection *i.v.* à des rats SHR (20 et 50 mg/kg). De même, ce dipeptide a montré une activité antihypertensive chez l'Homme après administration chronique orale (6 mg/jour ; Matsui *et al.* 1998). Récemment dans une revue (Fujita *et al.* 2000), la plupart des peptides antihypertenseurs cités, ont montré des caractéristiques structurales similaires à celles mentionnées ci-dessus, à savoir :

- ↳ un résidu hydrophobe et aliphatique en avant-dernière position,
- ↳ et un résidu aromatique ou une proline en position C-terminale.

La plupart des peptides représentés dans les Tableaux 2, 3, 4 et 6 présentent ces caractéristiques structurales, suggérant ainsi que leur effet antihypertenseur semble être lié à l'inhibition de l'ECA.

6 REGULATION DE LA PRESSION ARTERIELLE

Deux systèmes vasopresseurs jouent un rôle prépondérant dans la régulation de la pression artérielle et peuvent être à l'origine de l'hypertension. Ces deux systèmes sont d'une part, le système nerveux sympathique, qui innerve de manière ubiquitaire les vaisseaux sanguins artériels et veineux ainsi que le cœur, et d'autre part, le Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone, cascade enzymatique qui, une fois activée, conduit à la formation d'une hormone aux propriétés vasopressives très puissantes, l'angiotensine II (chapitre 5.2). Cependant, d'autres systèmes ou molécules peuvent influencer la pression sanguine. Par exemple, les électrolytes (Na^+ , K^+ , ...) et dans une moindre mesure, certains oligo-éléments (Zn^{++} , Cu^{++}) peuvent influencer la tension artérielle. Les cellules endothéliales peuvent libérer un facteur de contraction particulier, l'endothéline-1 (ET-1), peptide vasoconstricteur très puissant (Waeber *et al.* 1992). Une autre molécule, le monoxyde d'azote (ou facteur de relaxation dérivé de l'endothélium) peut aussi réguler la pression sanguine (Marin & Rodriguez-Martinez 1997).

6.1 LE MONOXYDE D'AZOTE

Dans la plupart des modèles d'hypertension, l'augmentation de la pression artérielle est associée à une réduction de la capacité de relaxation de l'endothélium. Cependant, ce dysfonctionnement endothélial semble plus être une conséquence de l'hypertension plutôt qu'une cause (Lüscher & Barton 1997). Découvert en 1980 sous le nom « d'endothelium-derived relaxing factor », le monoxyde d'azote (NO) est une molécule endogène, sécrétée sous forme gazeuse et vasodilatatrice. Il entraîne une vasodilatation et module la distensibilité des vaisseaux. Une modification de la régulation de la synthèse de NO a montré un rôle dans la pathogenèse de certaines maladies comme l'hypertension essentielle, l'athérosclérose, l'angine et les vasospasmes (Marin & Rodriguez-Martinez 1997).

Le monoxyde d'azote est le seul médiateur gazeux connu à l'heure actuelle. Il a un rôle de régulateur allant du contrôle de la pression sanguine à la neurotransmission. Mais c'est aussi

un composé toxique qui se retrouve dans l'air pollué et la fumée de cigarette, réagissant avec l'oxygène dans un environnement aérobie pour générer de nombreuses espèces réactives de l'oxygène capables de produire des effets délétères sur les systèmes biologiques (dommages aux niveaux protéique et désoxyribonucléique). Lorsqu'il est produit en excès, le monoxyde d'azote peut aussi engendrer une dégénérescence cellulaire rapide par induction de l'apoptose (Bosca & Hortelano 1999).

Compte tenu de sa simplicité de structure et de sa synthèse très rapide, le temps de réponse est donc bref. La production endogène de monoxyde d'azote est réalisée à partir de la conversion de l'arginine en citrulline, formation médiée par l'enzyme « monoxyde d'azote synthétase » (EC : 1.14.13.39 ; Figure 6). Soixante-dix fois plus soluble dans des solvants hydrophobes qu'en solution aqueuse, le monoxyde d'azote est capable de transmettre l'information et/ou d'infliger des dommages cellulaires sans nécessiter de transporteur spécifique. Sa réactivité avec les composés oxygénés (O_2 , superoxyde...) a pour conséquence une demi-vie extrêmement courte de 5-15 secondes.

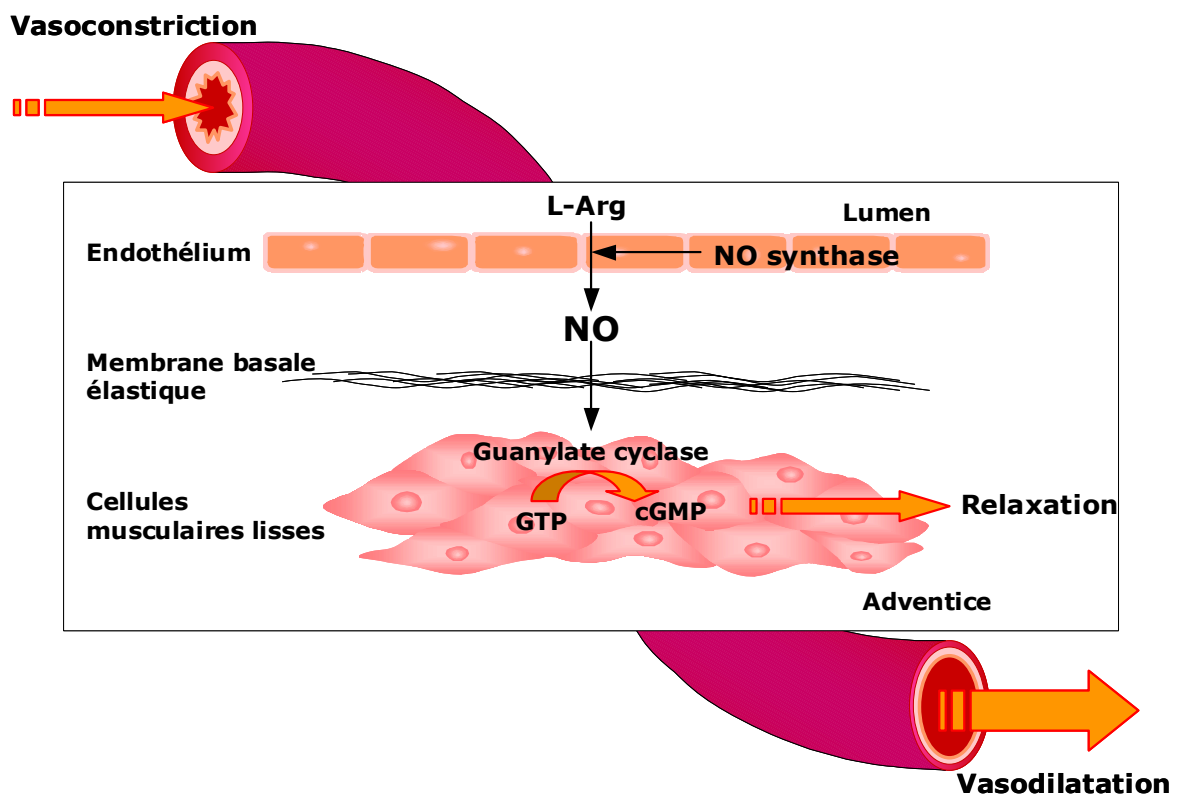


Figure 6. Mécanisme vasodilatateur du monoxyde d'azote (NO). Le NO est produit par les cellules endothéliales vasculaires à partir de la L-Arginine et *via* la NO synthétase. Puis, le NO stimule la formation de cGMP qui agira en diminuant les taux de calcium intracellulaire favorisant ainsi la relaxation vasculaire. Dans le système vasculaire, le NO maintient le tonus vasodilatateur nécessaire pour la régulation de la circulation sanguine et le contrôle de la pression artérielle.

Récemment, une étude a mis en évidence que les polyphénols de vin avaient une action sur la production de monoxyde d'azote et sur la vasorelaxation de l'endothélium par augmentation de la synthèse de monoxyde d'azote au niveau de l'aorte de rat (Andriambelason *et al.* 1997 ; Mendès *et al.* 2003). Le mécanisme vraisemblablement à l'origine de cet effet semble lié à une augmentation de l'expression et de l'activité de l'enzyme endothéliale monoxyde d'azote synthétase d'après Wallerath *et al.* (2003). La relaxation est abolie en absence de calcium extracellulaire, suggérant ainsi que les polyphénols peuvent induire un signal calcique dans les cellules endothéliales et, de ce fait, modifier directement la production de NO (Andriambelason *et al.* 1999). L'administration chronique à long terme de polyphénols modifie également la motricité vasculaire. En effet, le gavage de rats normotendus avec une solution polyphénolique (20 mg/kg) pendant 7 jours a permis d'améliorer la fonction endothéliale, reflétée par une relaxation plus importante à l'acétylcholine liée à une augmentation de la production de NO endothélial. De manière concomitante, une réduction de la pression artérielle sans induction d'un stress oxydatif a été observée (Diebolt *et al.* 2001).

6.2 L'ENDOTHELIN-1

L'endothéline-1 a été identifiée pour la première fois en 1988 comme une substance potentiellement vasoconstrictrice (Yanagisawa *et al.* 1988). L'endothéline-1 (ET-1) est formée de 21 acides aminés et semble jouer un rôle dans la médiation de la pathogenèse et/ou dans la maintenance de l'hypertension (Marin & Rodriguez-Martinez 1997). Cette molécule appartient à la famille des « endothelium-derived contracting factors » duquel certains composés du SRAA, comme l'angiotensine II, font partie (Lüscher & Barton 1997). Il existe 3 isoformes de l'endothéline, ET-1, ET-2 et ET-3, dont les structures et fonctions sont très proches (Miyachi & Masaki 1999). L'endothéline-1 est produite à partir de la Big Endothéline-1 (Big ET-1) *via* l'action de l'enzyme de conversion de l'endothéline-1 (Figure 7 ; Lüscher & Barton 1997). L'endothéline-1 est le facteur contracturant le plus puissant produit par l'endothélium vasculaire (Martin & Andriantsitohaina 2002).

L'importance du rôle physiologique de l'endothéline au niveau du système cardiovasculaire reste encore assez floue. Présente à faible concentration dans le plasma, elle n'est pas considérée comme une hormone circulante mais plutôt comme un médiateur paracrine ou autocrine. D'après Yanagisawa *et al.* (1988), ET-1 influence la vasoconstriction

et prolonge l'élévation de la pression sanguine. L'ET-1 endogène pourrait aussi jouer un rôle dans le maintien du tonus basal vasculaire (Miyachi & Masaki 1999).

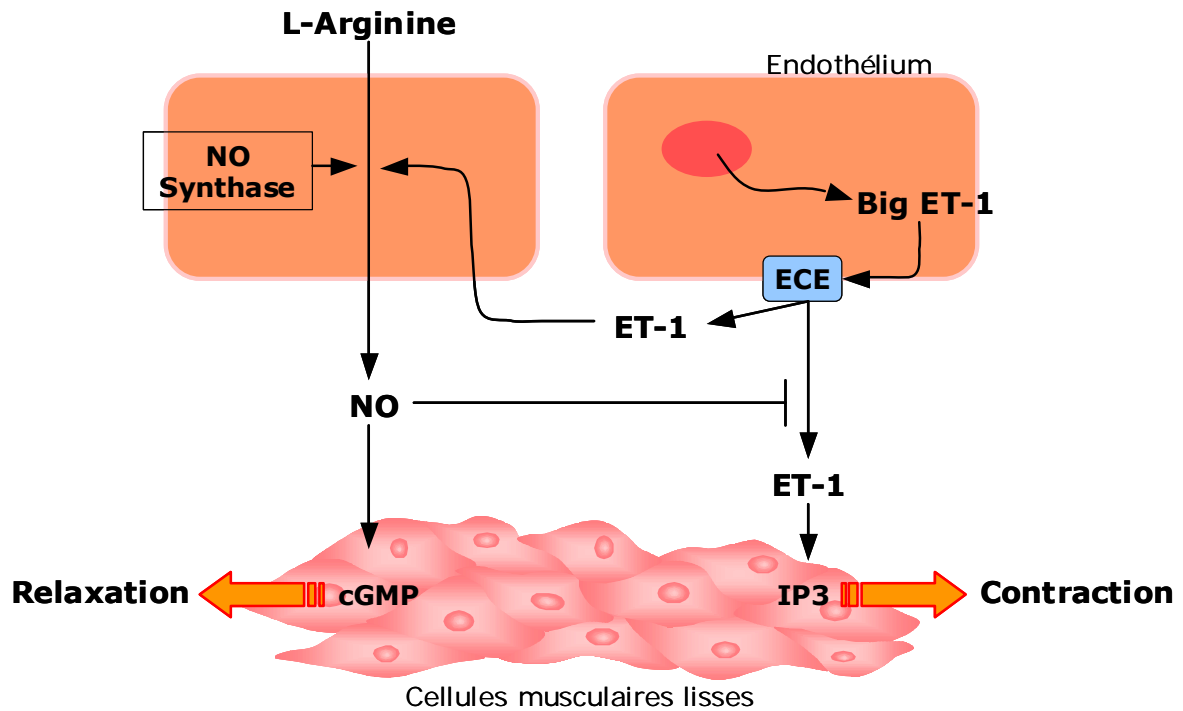


Figure 7. Mécanisme régulateur de la synthèse du monoxyde d'azote (NO) et de l'endothéline-1 (ET-1). La synthèse d'ET-1 dépend de l'activité de l'enzyme de conversion de l'endothéline-1 (ECE) qui clive son précurseur, la Big Endothéline-1 (Big ET-1).

Dans la plupart des modèles d'hypertension, la forte pression sanguine est associée à une diminution de la capacité de relaxation de l'endothélium (Lüscher & Vanhoutte 1990). Le dysfonctionnement endothélial dans l'hypertension pourrait donc contribuer à une augmentation des résistances périphériques vasculaires et/ou aux complications vasculaires de cette maladie (Lüscher & Barton 1997). La relation entre le taux d'ET-1 plasmatique et la sévérité de l'hypertension chez l'Homme reste mal définie. Cependant, l'endothéline pourrait contribuer à élever la pression sanguine chez certains patients atteints d'hypertension essentielle (Miyachi & Masaki 1999).

Très récemment, une équipe a mis en évidence les effets des polyphénols sur la transduction du signal engendré par ET-1 (Corder *et al.* 2001). Ainsi, de très petites quantités de polyphénols de vin rouge suffisent à abolir la synthèse d'ET-1 dans les cellules endothéliales d'aorte de bœuf ($IC_{50} = 5 \mu\text{L/mL}$). Cependant, le composé à l'origine de cet

effet n'a pas pu être caractérisé par les auteurs. A l'inverse, Zhao *et al.* (1999) ont mis en évidence que la quercétine (à 5 et 50 μM) avait la capacité d'inhiber la production d'ET-1 dans les cellules endothéliales de veine ombilicale humaine. Pour le moment, les effets du vin ou des composés du vin sur la synthèse d'endothéline ne sont pas très détaillés dans la littérature scientifique.

6.3 LA PROTEINE C-REACTIVE

La protéine C-réactive (CRP) est une protéine utilisée comme marqueur de l'inflammation aiguë. Elle est synthétisée au niveau des hépatocytes et principalement régulée *via* l'action des cytokines telles que l'interleukine 6 (IL-6), l'interleukine 1 et le facteur α de nécrose tumoral. Son apparition dans le plasma s'effectue immédiatement après l'entrée d'un antigène dans l'organisme et disparaît plus tard, lors de la formation des anticorps.

Les mécanismes moléculaires par lesquels l'augmentation de la pression artérielle mènerait aux maladies cardiovasculaires restent encore à éclaircir, cependant, il semble que l'hypertension favorise l'expression de cytokines et les réactions inflammatoires (par synthèse d'IL-6 et de la molécule-1 d'adhésion intracellulaire notamment) au niveau de l'endothélium. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la pression sanguine peut être un stimulus pour l'apparition de ces molécules impliquées dans le processus inflammatoire (Chae *et al.* 2001). Les variations du taux de CRP plasmatique ont été corrélées à la pression sanguine sans toutefois préciser son intérêt dans la prévention, le diagnostic et la régulation de l'hypertension (Rohde *et al.* 1999 ; De Ferranti & Rifai 2002 ; Sung *et al.* 2003). De même, il a récemment été démontré que le dysfonctionnement endothélial était associé à un taux élevé de CRP (Bajo-Martinez *et al.* 2003). Mais pour l'heure, seuls Dodson & Shine (1984) ont montré une relation causale entre l'élévation de la concentration en CRP et le risque de développer une hypertension artérielle essentielle (De Ferranti & Rifai 2002).

Il semblerait que la consommation modérée de boissons alcoolisées diminue le taux de CRP sanguin par rapport une non-consommation ou une consommation excessive (Imhof *et al.* 2001). Indépendamment de l'effet exercé sur les lipides, l'alcool semble atténuer la mortalité cardiovasculaire *via* un mécanisme anti-inflammatoire (Albert *et al.* 2003).

6.4 IMPLICATION DE CERTAINS ELECTROLYTES

Le dosage des principaux électrolytes sanguins fait partie du dépistage et de la surveillance de l'équilibre acido-basique, de l'état d'hydratation, et de certaines pathologies essentiellement rénales et hépatiques. Le rein est soumis à un contrôle hormonal pour assurer l'homéostasie hydrosodée. Cet équilibre peut être perturbé en cas d'atteinte rénale (le rein est en partie responsable des désordres hydroélectrolytiques) ou en cas de pathologies extra-rénales (déperditions digestives, cutanées, respiratoires, surcharges excessives).

Les troubles de l'hydratation nécessitent l'exploration des ions les plus importants quantitativement : Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} et Cl^- . La somme des anions et des cations est une constante. Le sodium est le principal cation extracellulaire. Il permet le maintien de la pression osmotique et de l'équilibre acido-basique. Il représente un facteur important de l'hydratation tissulaire (l'eau suit le sodium). Les processus qui régulent l'osmolarité extracellulaire déterminent les variations de la natrémie et des anions qui lui sont associés : chlore et bicarbonates. Le potassium est le principal cation intracellulaire. Il assure le maintien de l'osmolarité des cellules et intervient dans la transmission de l'influx nerveux (Dieusaert 2002). Le calcium joue plusieurs rôles au sein de l'organisme, il rentre dans la constitution osseuse, il intervient dans la régulation du pH de l'organisme (sur son acidité générale) et il joue un rôle essentiel dans la perméabilité entre les cellules de l'organisme. Le calcium joue également un rôle fondamental dans la contraction musculaire car cet ion en est le médiateur. Le magnésium est un cation bivalent doté d'un important pouvoir réducteur. Il est un cofacteur de nombreuses enzymes intracellulaires localisées au niveau des mitochondries. Il intervient également au niveau de l'excitabilité neuro-musculaire (anti-tétanisant), au niveau de l'agrégation plaquettaire, dans la réduction de l'athérosclérose et comme antagoniste de certains effets du calcium (Dieusaert 2002).

Le calcium, le sodium, le potassium et le magnésium sont impliqués dans la régulation de la tension artérielle. Ces ions influencent la pression sanguine en agissant sur la volémie et le tonus vasculaire (état de contraction des vaisseaux) par régulation des protéines contractiles et des transports de substances au travers des membranes. Ils régulent aussi l'activité des muscles lisses (contraction et relâchement) situés au niveau des vaisseaux sanguins (Gurr 1999). La pression sanguine peut donc être influencée par les apports alimentaires en Na^+ mais également en K^+ , Mg^{++} et Ca^{++} (Kotchen *et al.* 1998).

6.5 LES OLIGO-ELEMENTS

Parmi les oligo-éléments nécessaires aux besoins de l'organisme, certains peuvent jouer un rôle dans la régulation de la pression artérielle.

Le manganèse est un oligo-élément indispensable à l'organisme humain. Il joue le rôle de cofacteur enzymatique pour des hydrolases et des transférases. Il intervient dans le fonctionnement cérébral, dans la coagulation, dans le métabolisme glucidique, thyroïdien et dans la croissance (Dieusaert 2002).

Le fer est un oligo-élément qui entre dans la composition de l'hémoglobine, de la myoglobine et des enzymes respiratoires. Dans le sang, le fer est transporté par la transferrine qui le cède aux érythroblastes en voie de maturation. La synthèse de la transferrine par l'hépatocyte est inversement proportionnelle à la quantité de fer intracellulaire (Dieusaert 2002).

Le cuivre est un oligo-élément cofacteur de certaines enzymes intervenant dans l'érythropoïèse, la respiration cellulaire, la pigmentation et les processus oxydatifs. Il est lié à 98 % à la céruléoplasmine, alpha-2 globuline synthétisée par le foie permettant le stockage du cuivre en évitant la toxicité des ions libres. Il existe aussi sous forme diffusible (2 %), faiblement lié à l'albumine et à certains acides aminés (Dieusaert 2002).

Le zinc est un oligo-élément qui intervient au niveau de nombreuses fonctions physiologiques. Le zinc existe dans les hématies (85 %), les leucocytes (5 %) et les plaquettes (1 %). Environ 10 % du zinc se trouvent dans le sérum et sont liés à l'alpha-2 macroglobuline (40 % du zinc, non échangeables), l'albumine et la transferrine (50 % du zinc, plus labiles) ainsi qu'aux acides aminés libres (5 % du zinc, dialysables et échangeables) (Dieusaert 2002).

Le sélénium est un oligo-élément d'origine alimentaire (céréales, viandes, poissons), dont certains sels sont utilisés en thérapeutique. Il interagit avec différentes enzymes intervenant dans les phénomènes d'oxydoréduction cellulaire, en jouant le rôle, par exemple, de cofacteur de la glutathion peroxydase. Son action protectrice au niveau des lipides membranaires est synergique avec celle de la vitamine E. Le sélénium est capable de se complexer avec certains métaux et il intervient dans la détoxification du cadmium, du mercure et de l'argent. Une carence en sélénium favorise l'athérogénèse, les atteintes cardiovasculaires, les nécroses tissulaires (Dieusaert 2002).

L'iode est un oligo-élément d'origine alimentaire. Il intervient *via* les hormones thyroïdiennes dans le métabolisme cellulaire (augmentation du métabolisme cellulaire basal et

de la consommation tissulaire en oxygène). Sa présence est indispensable à la croissance staturo-pondérale et au développement du système nerveux central (Dieusaert 2002).

Certains de ces oligo-éléments peuvent avoir un rôle au niveau de l'hypertension. La présence de cuivre inhibe notamment l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I. Le zinc, en interrelation avec le cuivre, supprime l'effet presseur du cadmium (Loyke 1991). Ainsi, chez les rats hypertendus, la concentration de Zn^{++} est plus élevée que celle de Cu^{++} , et ce ratio Zn^{++}/Cu^{++} élevé est caractéristique de l'hypertension chez les rats hypertendus (Klevay 1980). Le cuivre, le zinc et le sélénium sont trois oligo-éléments susceptibles d'avoir un rôle dans l'hypertension soit directement, en tant que composés des métallo-enzymes impliquées dans l'hypertension, soit indirectement, lors des processus de biosynthèse de composés tels que des peptides, catécholamines, hormones stéroïdiennes et prostaglandines associés au développement de l'hypertension (Berthelot *et al.* 1987).

7 BUT DE L'ETUDE

Le but de cette étude est d'évaluer les propriétés biologiques des peptides présents dans le champagne. Les travaux vont s'axer, dans un premier temps, sur la recherche d'une activité inhibitrice vis-à-vis de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) dans le champagne et d'évaluer quelle fraction du champagne est la plus active.

Dans un deuxième temps, l'effet antihypertenseur de la fraction présentant le plus d'activité inhibitrice sera évalué sur un modèle animal d'hypertension, le Rat spontanément hypertendu (SHR).

Puis, dans une dernière partie, les essais se porteront sur la caractérisation et l'identification de peptides dans le champagne.

C

CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES

1 TRAVAUX PRELIMINAIRES

1.1 NOMENCLATURE

La nomenclature des acides aminés et des peptides suit les recommandations établies par l'IUPAC-IUB (1971). Dans ce manuscrit, les acides aminés sont représentés suivant leur code international à trois lettres.

1.2 ULTRAFILTRATIONS

Un champagne (assemblage composé de 28 % Pinot Noir, 26 % Pinot Meunier, 46 % Chardonnay), vieilli 15 mois sur lies, est dégazé et ultrafiltré en deux étapes afin de limiter le phénomène de colmatage. Cette phase d'ultrafiltration est réalisée en chambre froide à 4°C sur deux supports différents : cellules AMICON, 180 mL et 450 mL (systèmes sous pression avec agitation interne, Millipore, St Quentin en Yvelines, France). Les membranes utilisées sont des modèles AMICON en triacétate de cellulose, types YM1 (63,5 mm de diamètre, seuil de coupure 1 kDa, Millipore, St Quentin en Yvelines, France) et YM10 (76 mm de diamètre, seuil de coupure 10 kDa, Millipore, St Quentin en Yvelines, France). La première ultrafiltration sur membrane YM10 permet de séparer la fraction dite peptidique (< 10 kDa) de la fraction dite protéique (> 10 kDa). Puis cette fraction < 10 kDa est ultrafiltrée sur membrane YM1 pour récupérer la fraction < 1 kDa. Entre chaque étape d'ultrafiltration, l'ultrafiltrat est concentré à l'évaporateur sous vide (bain marie à 25-30°C). Au final, la fraction oligopeptidique est concentrée 20 fois puis conservée à -80°C.

1.3 AUTOLYSE EN MILIEU MODELE

1.3.1 Composition du milieu modèle

Les levures (2 souches de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées par Moët & Chandon sous la dénomination MC001 et MC002), réhydratées et lavées, sont inoculées dans un tampon vin

modèle (0,5 g de matière sèche pour 100 mL de tampon) contenant de l'éthanol (11,5 %), de l'acide malique (3 g/L), de l'acide acétique (100 mg/L), du sulfate de potassium (100 mg/L) et du sulfate de magnésium (25 mg/L), le tout est ajusté à pH 3,5 avec une solution de soude 1 N. Tous les réactifs utilisés au cours des expérimentations sont de catégorie analytique (Prolabo, Fontenay ^s/_s Bois, France).

Les conditions d'autolyse suivent les règles établies à partir du brevet d'invention déposé par Feuillat (1986). Ce brevet prévoyait d'ajouter de l'acide tartrique, mais il a été choisi de le supprimer afin d'éviter tout risque de précipitation des sels.

1.3.2 Conditions d'autolyse

L'autolyse est réalisée avec un mélange de levures MC001 et MC002 (1:1).

L'autolyse, réalisée en triplicata, est conduite dans une étuve à 30°C, sous agitation à 200 rpm pendant 8 jours. Puis l'autolysat est préparé suivant le même mode opératoire que l'extrait de champagne < 1 kDa.

1.4 FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT < 1 kDA SUR CHROMATOGRAPHIE BASSE PRESSION

La chromatographie basse pression joue souvent un rôle important dans la séparation de peptides comme première étape de fractionnement d'un mélange complexe. Cette étape de fractionnement reprend la méthode séparative de filtration sur gel de Sephadex[®] LH-20 utilisée par Desportes *et al.* (2000) avec quelques modifications.

1.4.1 Le gel Sephadex[®] LH-20

Le gel de dextrane Sephadex est un polymère linéaire de glucoses liés en α_{1-6} . Ce gel semi-rigide est soumis à une réaction d'hydroxypropylation pour donner le gel Sephadex[®] LH-20. Les groupements fonctionnels confèrent au gel des propriétés à la fois hydrophile et lipophile.

Ce gel permet la séparation de molécules de taille comprise entre 200 et 4000 Da. La limite d'exclusion peut varier suivant le type d'éluant utilisé. Des solvants tels que le toluène, l'acétone, le dichlorométhane ou l'éthanol agissent sur l'état de gonflement du gel et modifient ainsi cette limite d'exclusion. De même, ces éluants peuvent jouer sur la sélectivité de la séparation. Ce gel est stable sur une large gamme de pH (2-13) et dans la plupart des

solvants aqueux et organiques. Il est instable dans les solvants oxydants ainsi qu'aux pH inférieurs à 2. La température d'utilisation peut varier de 4 à 40°C.

Toutefois, le gel de Sephadex[®] LH-20 ne permet pas seulement de séparer les composés de petite taille (< 1000 Da) dans l'ordre décroissant de leur masse moléculaire, mais de plus, les propriétés d'interactions sélectives du gel confèrent à ce dernier des caractéristiques proches de la chromatographie d'adsorption (Henke 1995).

1.4.2 Matériels

- ↳ Gel Sephadex[®] LH-20 en poudre (référence : 17-0090-01, distribué par Pharmacia Biotech, Orsay, France).
- ↳ Colonne de type VL, 500 x 16 mm (Amicon, Epernon, France), pour un volume de gel de 100 mL.
- ↳ Système de chromatographie Gradifrac[™] composé d'une pompe péristaltique P-1, d'un injecteur IV-7, d'un détecteur UV-1 et d'un enregistreur REC 102 (Pharmacia Biotech, Orsay, France).

1.4.3 Conditions opératoires

Le gel de Sephadex[®] LH-20 en poudre est gonflé au préalable dans une solution d'eau/méthanol à 30 % (v/v) sous légère agitation pendant une nuit. Le gel est ensuite dégazé sous vide, puis coulé dans la colonne en une seule fois. La pompe est mise en route et le gel est laissé à stabiliser pendant la nuit à un débit de 18 mL/heure (soit 0,30 mL/minute) afin qu'il puisse s'agréger correctement.

Le volume mort de la colonne (V_0) est déterminé par injection de bleu dextrane 2000 (PM = 2000 kDa, Pharmacia Biotech, Orsay, Paris) à la concentration de 1 mg/mL. Le V_0 mesuré est de 38 mL.

La procédure de fractionnement consiste à passer 1 mL d'ultrafiltrat < 1 kDa (concentré 20 fois) en chromatographie basse pression. L'élution est réalisée à température ambiante avec un tampon acétate (0,3 M ; pH 4,0) préalablement dégazé sous vide, à un débit de 20 mL/heure. L'absorbance est suivie à 280 nm et des fractions de 5 mL sont collectées, lyophilisées puis resuspendues dans 1 mL d'eau déionisée sur système milli-Q (Millipore) pour les tests d'inhibition et l'analyse quantitative des peptides.

1.5 DOSAGE DES PEPTIDES PAR LA METHODE DE BIURET

Le protocole de dosage utilisé par Gornall *et al.* (1949) a été repris et légèrement modifié pour doser les peptides dans les échantillons (Desportes, 1999).

1.5.1 Préparation du réactif de Biuret

Trois grammes de sulfate de cuivre et 12 g de tartrate double de potassium et de sodium sont dissous dans 1 L d'eau déionisée sur système milli-Q (Millipore). Puis 600 mL de soude à 10 % (non carbonatée) sont ajoutés et le volume ajusté à 2 L. Tous les réactifs utilisés au cours des expérimentations sont de catégorie analytique (Prolabo).

Les pastilles de soude, à l'air libre, réagissent avec les particules de CO₂ et se « carbonatent » en surface. Pour limiter l'importance de ce phénomène, les pastilles de soude sont lavées à l'eau 2 à 3 fois. Dix pour-cent de soude sont pesés en plus de la quantité initiale. Les rinçages ont permis de faire précipiter les carbonates à l'interface et de les éliminer. La manipulation est rapide pour éviter trop de pertes et une nouvelle réaction des pastilles. Le rôle de la soude est d'alcaliniser le milieu réactionnel.

1.5.2 Dosage colorimétrique

Tous les dosages sont réalisés en triplicata. Dans une cuve de spectrophotomètre (Prolabo ; trajet optique 1 cm), 4 mL de réactif de biuret sont mélangés à 0,5 mL de l'échantillon à analyser. Après 15 minutes de réaction, l'absorbance est mesurée à 540 nm sur un spectrophotomètre (UVIKON 930, Kontron Instruments, St Quentin en Yvelines, France).

Le dosage de Biuret se caractérise par une coloration bleu foncé, voire violette, du complexe formé par les ions cuivre et les liaisons peptidiques en milieu alcalin. L'intensité de la couleur est proportionnelle au nombre de liaisons peptidiques présentes dans les molécules. Cependant, cette méthode de dosage a l'inconvénient d'interagir avec les composés phénoliques (Moreno-Arribas *et al.* 2002).

1.6 DOSAGE DES ACIDES ORGANIQUES PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE

L'électrophorèse capillaire a permis de détecter les acides organiques dans les fractions issues de la chromatographie basse pression.

1.6.1 Appareillage

Les dosages par électrophorèse capillaire sont réalisés sur un appareil P/ACE-5500 muni d'un détecteur UV mono-longueur d'onde (Beckman, Gagny, France). Le logiciel Beckman Gold System 8.0 permet la commande de l'appareil ainsi que le traitement et l'enregistrement des données. Un capillaire en silice fondue de longueur totale 57 cm (50 cm de longueur effective) et de diamètre interne 75 μm est monté sur une cartouche, dont la fenêtre de détection est de dimension : 100 x 800 μm .

1.6.2 Mode opératoire

Tous les réactifs utilisés au cours des expérimentations sont de catégorie analytique (Prolabo). Le tampon de migration est un tampon combinant l'hydrogénophthalate de potassium (5 mM) et le bromure de tétradécyltriméthylammonium (0,5 mM) à pH 5,5.

L'injection hydrodynamique de l'échantillon est faite à l'anode à la pression de 0,5 psi pendant 5 secondes. Une tension de 17 kV est appliquée. La loi d'Ohm est respectée entre 0 et 30 kV. La température est maintenue à 22°C. La détection est réalisée à 214 nm.

Entre deux analyses, le capillaire est rincé à l'eau déionisée sur système milli-Q (Millipore) pendant 1 minute, puis avec de l'acide phosphorique 0,1 M pendant 2 minutes, et enfin avec le tampon de migration pendant 2 minutes.

Toutes les solutions sont préalablement filtrées sur filtres Minisart 0,22 μm (Sartorius, Palaiseau, France) et dégazées aux ultrasons (cuve à ultrasons TP680DH, Prolabo).

1.7 MESURE DE L'ACTIVITE INHIBITRICE VIS-A-VIS DE L'ECA

L'activité inhibitrice sur l'ECA est déterminée selon la méthode établie par Cushman & Cheung (1971) avec quelques modifications. Cette réaction utilise le substrat synthétique, hippuryl-L-histidyl-L-leucine (Hip-His-Leu, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). L'enzyme de conversion de l'angiotensine I clive la liaison N-terminale du dipeptide His-Leu et libère ainsi dans le milieu l'acide hippurique dont le maximum d'absorption est mesuré à 228 nm (Figure 8).

Tous les réactifs utilisés au cours des expérimentations sont de catégorie analytique (Prolabo). La solution réactionnelle est constituée de 125 μL de substrat Hip-His-Leu à 5 mM dans un tampon borate (0,2 M ; pH 8,3) contenant 0,3 M de NaCl et de 15 μL d'extrait de champagne ou d'un peptide standard à tester ; puis, 5 mU d'enzyme de conversion de

l'angiotensine I (Sigma) sont ajoutées pour que la réaction débute. La réaction est incubée à 37°C et est arrêtée par ajout de 250 µL d'HCl 0,5 N après 30 minutes. L'acide hippurique ainsi formé, est extrait par ajout d'1 mL d'acétate d'éthyle. Les tubes sont ensuite agités pendant 15 secondes au vortex puis centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes. Puis, 750 µL de la phase organique sont prélevés puis évaporés à sec (pendant 30 minutes à 100°C). La quantité d'acide hippurique libérée, reprise dans 750 µL d'eau, est déterminée par mesure de l'absorbance à 228 nm (spectrophotomètre UVIKON 930, Kontron Instruments).

A partir de ce dosage il est possible d'établir l'IC₅₀ des molécules inhibitrice de l'ECA, c'est-à-dire, la concentration pour laquelle 50 % de l'enzyme est inhibée.

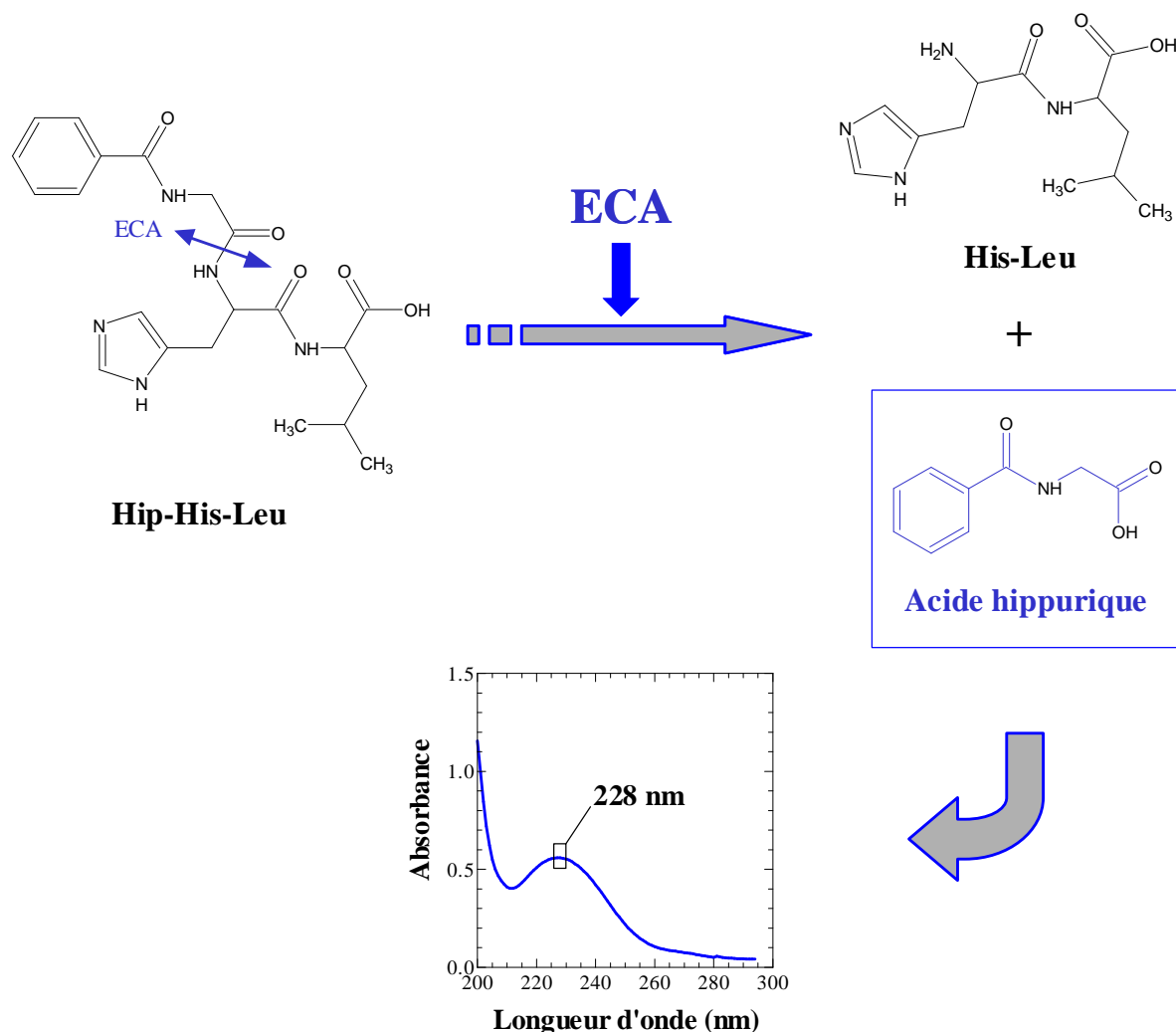


Figure 8. Réaction catalytique de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) avec son substrat synthétique hippuryl-L-histidyl-L-leucine (Hip-His-Leu). Cette réaction enzymatique va aboutir à la production du dipeptide His-Leu et du chromophore acide hippurique. La double flèche bleue sur Hip-His-Leu, indique le site de coupure par action de l'ECA. Le chromophore libéré a pour particularité d'avoir un maximum d'absorbance à 228 nm (balayage spectral de l'acide hippurique à 0,05 mM dans de l'eau).

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon l'équation établie par Suetsuna (1998a,b) :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(A_{\text{eca}} - A_{\text{éch}})}{(A_{\text{eca}} - A_{\text{stop}})} \times 100$$

où : A_{eca} = Absorbance de la solution sans l'échantillon (remplacé par du tampon)
 $A_{\text{éch}}$ = Absorbance de la solution avec l'échantillon à tester
 A_{stop} = Absorbance de la solution arrêtée dès le départ

L'IC₅₀ a été calculée par régression non-linéaire à l'aide du logiciel Prism (GraphPad Software, San Diego, Etats-Unis, version 3.03).

1.8 PEPTIDES DE SYNTHÈSE

Tous les peptides, à l'exception de Lys-Met-Asn et Phe-Lys (synthétisés par Néosystem, Strasbourg, France), ont été commandés chez Bachem (Voisin-le-Bretonneux, France). Le captopril, utilisé comme témoin positif d'inhibition, provient de chez Fluka (Sigma).

2 CARACTERISATION DE L'EXTRAIT DE CHAMPAGNE

2.1 OBTENTION DE L'EXTRAIT

Le champagne utilisé est une cuvée correspondant à un assemblage de 50 % Pinot Noir, 25 % Pinot Meunier et 25 % Chardonnay. Vingt bouteilles (de contenance 750 mL) de vin de Champagne, vieilli 15 mois sur lies, sont dégazées et ultrafiltrées en deux étapes (comme mentionné précédemment ; paragraphe 1.2 du chapitre II). Au final, la fraction < 1 kDa récupérée est concentrée 10 fois et conservée à -80°C. Les ultrafiltrations terminées, toutes les fractions < 1 kDa sont regroupées et aliquotées en tubes Falcon® (Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont de Claix, France) puis conservées à -20°C.

2.2 OBTENTION DES EXTRAITS SECS

Un millilitre d'extrait < 1 kDa homogène est filtré sur membrane en acétate de cellulose (47 mm de diamètre ; 0,45 µm de porosité ; Sartorius, Palaiseau, France) puis mis à sécher une nuit à 120°C avant d'être pesé. Les résultats représentent la moyenne de six répétitions du fait de la grande variabilité de la méthode.

2.3 ACIDES ORGANIQUES, SUBSTANCES MINÉRALES, VITAMINES

2.3.1 Dosage des acides organiques

Le dosage des acides malique, lactique et tartrique a été réalisé par le CIVC au moyen d'une méthode basée sur l'électrophorèse capillaire (méthode accréditée COFRAC).

Le dosage de l'acide citrique est réalisé avec un kit de dosage enzymatique utilisant la spectrophotométrie UV (référence : 0 139 076, Boehringer Mannheim/R-Biopharm, Saint-Didier-au-Mont-d'Or, France). La limite de quantification est fixée à 5 mg/L pour un coefficient de variation (CV) de 1,3 % dans le vin. L'échantillon ne nécessite pas de préparation particulière.

2.3.2 Dosages des minéraux et ions

Le dosage des ions Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Cu^{++} , Fe^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} et sulfates a été réalisé par le CIVC au moyen d'une méthode utilisant l'absorption atomique (méthode accréditée COFRAC).

2.3.3 Dosage de l'acide ascorbique

Le dosage de l'acide ascorbique a été réalisé par le CIVC au moyen d'une méthode enzymatique (méthode accréditée COFRAC).

2.4 LES GLUCIDES

2.4.1 Dosage du glucose/fructose

Le dosage du D-glucose/D-fructose a été réalisé avec un kit de dosage enzymatique utilisant la spectrophotométrie UV (référence : 0 139 106, Boehringer Mannheim/R-Biopharm). La limite de quantification est fixée à 8 mg/L pour un CV de 1,5 % dans les boissons. L'échantillon ne nécessite pas de préparation particulière.

2.4.2 Dosage du glycérol

Le dosage du glycérol a été réalisé avec un kit de dosage enzymatique utilisant la spectrophotométrie UV (référence : 1 002 809, de chez EnzytecTM, Diffchamb, Lyon, France).

La limite de quantification est fixée à 0,4 mg/L pour un CV de 1-3 % dans le vin. L'échantillon ne nécessite pas de préparation particulière.

2.5 LES COMPOSES AZOTES

2.5.1 Dosage de l'azote total

Le dosage de l'azote total a été réalisé par le CIVC suivant le principe de la méthode de Dumas (méthode de dosage de l'azote par combustion). Lors de ce dosage, les échantillons subissent une combustion dans l'oxygène pur à 1100°C. Le flux des gaz produits est dirigé sur un condenseur à effet Peltier afin de supprimer toute humidité. Après dilution, le flux gazeux est recueilli dans un vase collecteur et les oxydes d'azote sont réduits en azote N₂. L'azote est ensuite mesuré *via* un détecteur à thermoconductivité.

2.5.2 Dosage des acides aminés libres et totaux

Les acides aminés libres et totaux ont été dosés par une méthode chromatographique associant dérivation et mesure de la fluorescence. Il s'agit de la méthode AccQTAG de Waters. Les acides aminés sont mis à réagir avec le 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) sur leur fonction amine primaire et secondaire. Ces condensats sont des dérivés fluorescents qui absorbent à 395 nm, stables à température ambiante et pouvant être conservés jusqu'à une semaine. Cette méthode permet de doser les vingt acides aminés communément rencontrés (à l'exception du tryptophane) et de l'acide γ -aminobutyrique (GABA).

Pour le dosage des acides aminés liés, les échantillons sont préalablement dilués 50 fois avant hydrolyse acide selon le protocole suivant : 20 μ L d'échantillon, 40 μ L de Standard Interne (l'acide α -aminobutyrique) à la concentration de 1 mmole/L et eau déionisée qsp. 1 mL. L'hydrolyse est réalisée par ajout de 1 mL d'acide chlorhydrique 6 N dans une ampoule hermétiquement fermée et placée à 120°C pendant 24 heures.

Les dosages sont réalisés sur l'extrait nature et sur l'échantillon hydrolysé (analyses réalisées à chaque fois en duplicata). Lors des hydrolyses, bien que l'étalon interne soit introduit avant, certains acides aminés sont dégradés : Asn en Asp (100 % du poids initial), Gln en Glu (62 % du poids initial), et perte de la Met et de la Cys à hauteur de 19 % et 11 % respectivement. Le coefficient de variation pour la quantification des acides aminés est < 2 %. Il est à noter aussi que les di et tripeptides peuvent interférer avec ce type de dosage.

Les dosages ont été réalisés par l'Institut Universitaire de la Vigne et du Vin (Université de Dijon, France).

2.5.3 Dosage de l'urée

Le dosage de l'urée a été réalisé avec un kit de dosage enzymatique utilisant la spectrophotométrie UV (référence : 0 542 946, Boehringer Mannheim/R-Biopharm). La limite de quantification est fixée à 1 mg/L pour un CV < 1 %. L'échantillon ne nécessite pas de préparation particulière.

2.6 LES COMPOSES PHENOLIQUES

Le dosage des composés phénoliques a été réalisé par l'INRA (UMR INRA/URCA, Fractionnement des Agro-ressources et Emballage, Reims, France) avec la méthode publiée par Chamkha *et al.* (2003).

2.7 DOSAGE DE L'ACETALDEHYDE

Le dosage de l'acétaldéhyde a été réalisé avec un kit de dosage enzymatique utilisant la spectrophotométrie UV (référence : 0 668 613, Boehringer Mannheim/R-Biopharm). La limite de quantification est fixée à 1 mg/L pour un CV de 1-4 %. L'échantillon ne nécessite pas de préparation particulière.

3 EXPERIMENTATION ANIMALE

3.1 ANIMAUX

3.1.1 Les souches de rats

La souche SHR (pour Rat Spontanément Hypertendu) est idéale et la plus utilisée pour l'étude de l'hypertension bien que celle-ci ne soit pas le seul modèle animal disponible. Cependant, cette souche dispose du maximum de données par rapport aux autres modèles d'hypertension spontanée et les résultats inter-laboratoires peuvent donc être plus facilement comparés. D'autre part, elle présente l'avantage de disposer d'une souche témoin de tension

normale : la souche WKY. En effet, la souche SHR dérive de cette dernière par mutation spontanée.

De ce fait, les rats utilisés appartiennent à ces deux souches :

- ↳ La souche de Rat spontanément hypertendus ou SHR (SHR/N CrI Ico ; Iffa Credo, Charles River Co., L'Arbresle, France),
- ↳ Et son homologue, la souche Wistar-Kyoto ou WKY (WKY/N Ico), la référence normotendue (Iffa Credo).

3.1.2 Stabulation des animaux

A leur arrivée, les animaux sont âgés de 6 semaines et leur poids varie entre 110 et 130 g. Ils sont ensuite placés en cage individuelle et maintenus dans un environnement contrôlé (température de $24 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, humidité 40-55 %, cycle 12 heures de lumière/12 heures d'obscurité). Avant la phase d'appropriation, les rats bénéficient de deux à trois jours de récupération. Les animaux doivent avoir une période d'adaptation à leur nouvel environnement de trois semaines avant que ne débutent les expériences. Au cours de cette période et durant les expérimentations, les rats ont accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum*. Néanmoins, leur consommation alimentaire est suivie tout au long des expériences, les aliments et l'eau sont pesés tous les jours à partir de 17 heures.

Toutes les procédures concernant la manipulation des animaux ont respecté les directives établies par les « Principles of laboratory animal care » (NIH publication #85-23, revised 1985) et par le « Committee on Care and Use of SHR ».

3.2 DONNEES EXPERIMENTALES

3.2.1 Calcul de la dose à administrer

En considérant que la population du Laboratoire de Recherche Moët & Chandon est représentative d'une population normale, le poids d'un individu moyen serait alors de :

$$66,6 \pm 11,3 \text{ kg } (65,9 \pm 8,2 \text{ kg sans les extrêmes})$$

Calculs réalisés avec 18 personnes, 9 hommes/9 femmes, âgées de 22 à 58 ans

Une flûte de champagne contenant en moyenne 100 mL, les quantités de vin (par kg de poids corporel avec un champagne) absorbées seraient alors les suivantes :

↳ 1,5 à 6 mL/kg pour 1 à 4 flûtes (respectivement)

Cette étude étant réalisée pour la première fois et pour être sûr d'objectiver un effet, la dose choisie a été celle de 6 mL/kg au cas où les doses plus faibles n'auraient pas eu d'effet.

3.2.2 Protocole expérimental

Les résultats présentés dans ce manuscrit sont l'aboutissement de deux expériences indépendantes. Une première expérience réalisée avec 16 rats, puis une seconde avec 22 rats. Pour chaque expérience, les traitements sont réalisés en parallèle avec les rats SHR et les rats WKY (tous âgés de 9 semaines au début des manipulations). Tous les soirs, à la même heure, les rats sont pesés et reçoivent le traitement par gavage, à raison de 6 mL/kg d'extrait < 1 kDa de champagne pour les animaux traités et de 6 mL/kg d'eau pour les animaux témoin. Les mesures de tension artérielle sont réalisées tous les deux jours au matin (là encore à la même heure) pendant 28 jours.

3.3 DETERMINATION DE LA PRESSION ARTERIELLE

La pression artérielle est mesurée par un sphygmomanomètre placé au niveau de la queue des rats (Figure 9). Il s'agit d'une technique non invasive très souvent utilisée pour mesurer la pression sanguine systolique, mais elle a l'inconvénient d'être moins fiable pour la mesure de la pression diastolique. Néanmoins, cette technique est intéressante car elle permet de suivre facilement et à long terme un grand nombre d'animaux.

Avant toute mesure de tension, les animaux font l'objet d'une procédure préalable visant à induire une vasodilatation. Cette étape préliminaire consiste à chauffer l'animal à 38-39°C pour faciliter sa relaxation. La pression sanguine est une variable physiologique sensible qui peut être affectée par des stimuli externes et/ou par l'humeur du rat. Les rats sont donc maintenus à 38-39°C dans une étuve pendant 30 minutes avant d'être installés dans une cellule de contention maintenue à cette même température. Une fois l'animal dans la boîte de contention, le système gonfleur/détecteur (LETICA *Scientific Instrument*, LE 5001 *pressure meter*, BIOSEB, Chaville, France) est installé sur la queue du rat et les premières mesures sont effectuées au bout de 4-5 minutes (temps nécessaire pour la stabilisation de l'appareil afin d'obtenir des mesures fiables et reproductibles). L'appareil « LE 5001 *pressure meter* »

donne des valeurs de pression systolique (Psys), diastolique (Pdia) et moyenne (Pmoy). La pression sanguine moyenne est calculée par l'appareil suivant l'équation :

$$P_{moy} = P_{dia} + 0,33(P_{sys} - P_{dia})$$

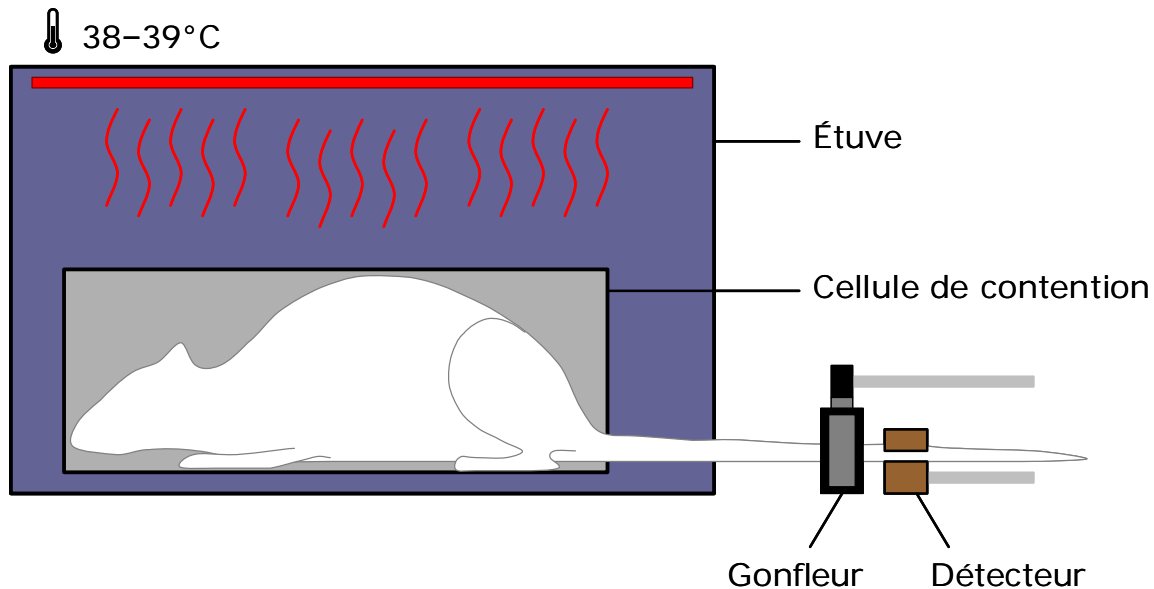


Figure 9. Représentation schématique de la mesure de la pression artérielle chez le rat avec un système de mesure non-invasif. Le système de type gonfleur/détecteur (ou sphygmomanomètre) est installé sur la première moitié de la queue de l'animal. Après un temps de stabilisation dans l'étuve de 5 minutes en moyenne, les premières mesures de tension sont réalisées. Un laps de temps de 20-30 secondes est maintenu entre chaque mesure.

Contrairement à de nombreuses expérimentations comparables où les mesures sont effectuées une fois par semaine, les graphiques présentés dans le chapitre III rendent compte de l'état de la pression artérielle des rats tous les deux jours.

3.4 PRELEVEMENTS SANGUINS

Après 4 semaines de traitement, des prélèvements sanguins sont réalisés. Les rats sont anesthésiés à l'isoflurane (Belamont Laboratoire, Boulogne Billancourt, France ; induction à 5 % puis maintien à 1-1,5 %) via un évaporateur Isotec (Ohmeda, Maurepas, France) et un respirateur adapté pour petits animaux (Harvard Biosciences, Les Ulis, France). Un cathéter en polyéthylène (N°3, Biotrol, Paris, France) est inséré dans l'artère carotide droite pour collecter les différents prélèvements sanguins (Dukic *et al.* 2000) :

↳ Récupération de plasma pour les dosages suivants :

- Protéine C-réactive (CRP)
- Ionogramme (Na^+ , K^+ et Cl^-)
- Ions et métaux (Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} , Cu^{++} , Zn^{++} , Se^{2-} et I^-)
- Activité rénine
- Big Endothéline-1

↳ Récupération de sérum pour les dosages suivants :

- Activité enzyme de conversion de l'angiotensine I
- Monoxyde d'azote

Le sérum est le liquide se séparant du caillot après coagulation du sang, de même composition que le plasma mais sans fibrinogène. Pour les dosages des protéines totales, de la CRP, du ionogramme ainsi que des ions et métaux, le sang est recueilli dans des tubes Eppendorf® de 2 mL contenant 12 µL d'héparine sodique (25000 UI/5 mL, solution injectable IV, Léo Laboratoires, St Quentin Yvelines, France) puis centrifugés 10 minutes à 2000 rpm pour récupérer le surnageant (plasma). Tout prélèvement hémolysé est rejeté. Pour le dosage de l'activité rénine et de la Big Endothéline-1, le sang est recueilli dans des tubes contenant de l'EDTA (BD Vacutainer™ K3E 7,5 % ; 0,072 mL) laissés dans de la glace, puis centrifugés pendant 10 minutes à 2000 rpm et à 4°C. Pour le dosage de l'activité ECA et du NO, le sang est récupéré dans des tubes secs placés dans de la glace, laissé à coaguler puis centrifugé 10 minutes à 2000 rpm.

3.5 DOSAGES

3.5.1 Dosage de l'activité ECA

Le protocole suivi reprend partiellement celui établi par Cushman & Cheung (1971). Cinquante microlitres de sérum brut sont ajoutés à 140 µL de substrat Hip-His-Leu (à 5 mM dans un tampon borate 0,2 M contenant 0,3 M de NaCl). Le mélange sérum/substrat est laissé à incuber au bain-marie pendant 30 minutes à 37°C. La réaction est arrêtée par ajout de 250 µL d'HCl 0,5 N. L'acide hippurique formé est extrait avec 1 mL d'acétate d'éthyle puis, 750 µL du surnageant sont évaporés à sec dans une enceinte thermostatée à 100°C. L'acide hippurique formé est resolubilisé dans 750 µL d'eau puis son absorbance mesurée à 228 nm.

Une unité d'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à la formation d'1 μM d'acide hippurique à partir du substrat Hip-His-Leu, par minute, à 37°C dans nos conditions standard d'analyse.

3.5.2 Dosage des ions et oligo-éléments

Les concentrations en oligo-éléments (Fe^{++} , Mn^{++} , Cu^{++} , Zn^{++} , Se^{++} , I) et les ions inorganiques (Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Cl^-) plasmatiques ont été déterminées par absorption atomique selon les directives de Worth (1998).

3.5.3 Dosage du monoxyde d'azote

Le dosage du monoxyde d'azote sérique a été réalisé avec un kit de dosage colorimétrique (référence : 482650, Calbiochem, Merck, Darmstadt, Allemagne). Les échantillons sont préalablement déprotéinés par précipitation (selon le protocole de Guevara *et al.* 1998) pour limiter les interférences. Pour cela, 100 μL de sérum sont additionnés à 900 μL d'une solution méthanol/diéthyléther (3:1, v/v) et laissés toute une nuit à température ambiante, sous agitation. Le surnageant a été utilisé pour le dosage du monoxyde d'azote.

Du fait de sa courte demi-vie (quelques secondes), le monoxyde d'azote, en solution aqueuse, va rapidement être converti sous forme de nitrates et de nitrites. Ce protocole de dosage du monoxyde d'azote convertit les nitrates en nitrites et utilise le réactif de Griess pour doser les nitrites totaux.

3.5.4 Dosage de la Big Endothéline-1

Il a été démontré que la demi-vie de la Big ET-1 plasmatique était beaucoup plus longue que celle de l'ET-1 (Hemsén *et al.* 1995). En général, l'ET-1 est synthétisée là où l'organisme en a besoin et même si un taux considérable de Big ET-1 est converti, peu d'ET-1 sera détectable dans le plasma (Fukunaga *et al.* 2000). L'observation des modifications plasmatiques en Big ET-1 est donc plus appropriée pour observer les variations de synthèse de l'ET-1.

Le dosage la Big Endothéline-1 (Big ET-1) sérique a été réalisé avec le test immunoenzymatique « Rat Big Endothelin-1 EIA Kit » (référence : 17167, IBL Co. LTD, Hamburg, Allemagne).

3.5.5 Dosage de l'activité Rénine

Le dosage de l'activité rénine plasmatique a été réalisé par Biotec Centre (Orléans, France) avec le kit de dosage Angiotensin I radioimmunoassay kit (DiaSorin s.r.l., Saluggia, Italy). Le coefficient de variation pour cette analyse est de 5-10 %.

3.6 EVALUATION DE LA TOXICITE DE L'ADMINISTRATION DE L'ECHANTILLON

Avant que ne débutent les expérimentations animales, la toxicité de l'extrait de champagne est évaluée sur quatre rats Wistar : deux sont utilisés comme témoins et les deux autres sont traités avec la fraction de champagne < 1 kDa. Les animaux reçoivent le traitement pendant deux jours, au cours desquels leur comportement est observé. Suite à cela, ils sont sacrifiés et autopsiés afin de déceler la présence d'éventuelles lésions macroscopiques liées à l'administration de l'échantillon.

Suite aux prélèvements sanguins réalisés à la fin du traitement chronique, des examens histologiques sur différents organes sont réalisés. Après sacrifice, les organes (poumons, estomac, rate, reins, duodénum, œsophage et foie) sont prélevés et fixés pendant 48 heures dans une solution de formaldéhyde à 4 % (pH 7,4) à température ambiante (la fixation permet de prévenir la décomposition post-mortem, préserve les structures et renforce l'intensité de la coloration ultérieure). Afin de faciliter la pénétration des substances d'inclusion dans les tissus, l'organe est préalablement déshydraté. L'eau est extraite par passage dans des bains successifs d'alcool éthylique de concentration croissante, puis les organes sont transférés dans la substance d'inclusion, la paraffine. Les blocs de paraffine sont découpés en sections de 5 µm d'épaisseur étalées puis collées sur des lames de verre. Les coupes histologiques, normalement incolores et transparentes, sont enfin colorées à l'hématoxyline-éosine pour permettre les examens microscopiques.

3.7 METHODES STATISTIQUES

Une expérience biologique est une action partiellement contrôlée, sur tout ou partie d'un matériel vivant, dont le résultat fait l'objet d'une interprétation. L'analyse des résultats est conditionnée par l'organisation de l'expérience. Si l'on s'intéresse aux résultats d'une action, encore faut-il être certain que l'effet que l'on observe résulte bien de l'action entreprise, et non de facteurs aléatoires ou systématiques dont le contrôle échappe à l'expérimentateur. La meilleure façon de s'assurer de la bonne comparabilité entre les rats témoins et traités est de

répartir les traitements au hasard entre les animaux. Le tirage au sort ainsi pratiqué (ou randomisation) ne permet pas d'égaliser les groupes de façon parfaite, mais seulement de façon aussi satisfaisante que possible, compte tenu des incertitudes régnant sur la sensibilité individuelle des animaux au traitement étudié. Toutes les opérations effectuées sur les animaux (mesures de pressions, ordre de gavage, prélèvements et dosages) sont réalisées « à l'aveugle », c'est-à-dire dans l'ignorance du traitement proprement dit, ceci pour garder toute objectivité dans l'appréciation des résultats.

Les mesures de pressions sanguines, l'évolution des poids, la consommation d'eau et d'aliments et les résultats des différents dosages sont analysés au moyen d'un test U de Mann Whitney. A cause du faible nombre d'animaux (< 30), le test est non paramétrique (c'est-à-dire, s'affranchissant de l'hypothèse de normalité de la distribution) et non apparié (car des groupes d'animaux différents ont été comparés, chacun n'étant pas son propre témoin). Ce type de test consiste à vérifier si deux échantillons peuvent être issus de la même distribution en étudiant comment les valeurs de chacun se situent parmi les statistiques d'ordre de l'échantillon global. Une différence est considérée comme significative si la valeur de p est inférieure à 0,05.

Plusieurs paramètres globaux, comme préconisés par Matthews *et al.* (1990), ont aussi été évalués :

- ↳ La pente de la courbe effet en fonction du temps (calculée par régression linéaire),
- ↳ La différence entre la pression sanguine mesurée à J_{28} et celle mesurée à J_0 ,
- ↳ L'aire sous la courbe effet en fonction du temps (calculée au moyen de la méthode des trapèzes).

Le test U réalisé sur les paramètres moyens permet de montrer si ces valeurs sont significativement différentes entre le groupe des animaux témoins et le groupe des traités. L'analyse des paramètres globaux permet de tenir compte des variations individuelles pour chaque rat au cours de l'expérimentation. L'aire sous la courbe reflète l'effet global du traitement. Les calculs statistiques et les graphiques ont été réalisés avec les logiciels Systat (SPSS Software, Chicago, Etats-Unis ; version 10.0) et Prism (GraphPad Software, San Diego, Etats-Unis ; version 3.03) respectivement.

4 IDENTIFICATION DES PEPTIDES DU CHAMPAGNE

L'identification des peptides contenus dans le champagne a été réalisée en collaboration avec l'Institut de Chimie Organique et Analytique d'Orléans (ICOA). La méthode a utilisé la chromatographie liquide (LC) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

4.1 LA SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM

La découverte de la spectrométrie de masse a fourni aux scientifiques un outil puissant pour l'étude et la caractérisation de mélanges complexes. Par définition, la spectrométrie de masse permet de transformer des molécules dans leur état naturel en ions à l'état gazeux et d'obtenir leur masse moléculaire en analysant leur rapport m/z , où m est la masse du composé et z sa charge.

La spectrométrie de masse en tandem a représenté une révolution en chimie analytique. La MS/MS combine deux analyseurs quadripolaires afin d'étudier les caractéristiques de fragmentation des échantillons, ceci permettant de compléter la mesure de masse par des informations structurales. Sur le principe, les ions formés au niveau de la source entrent dans le premier analyseur. Parmi ces ions, un ion précurseur est sélectionné. Seuls les ions ayant un rapport m/z sélectionné peuvent sortir du premier analyseur. Ils entrent ensuite dans une zone libre de champ, où se trouve une cellule de collision, contenant des molécules de gaz. Les collisions des ions sélectionnés avec ces molécules de gaz augmentent jusqu'à provoquer leur dégradation. Les ions précurseurs ainsi activés se dissocient en ions fragments, en rompant certaines liaisons chimiques dans la molécule. Les rapports m/z de ces fragments sont ensuite analysés dans un second analyseur. La formation des ions fragments suit des règles précises. Les groupes chimiques ont leurs caractéristiques propres de fragmentation, et le profil d'un spectre MS/MS donne le plus souvent des informations complètes et fiables sur la structure du composé précurseur. Ce type d'analyse est relativement bien adapté pour la détermination de séquence peptidique ou pour la recherche de modifications ou de mutations.

4.2 MATERIELS D'ANALYSE

4.2.1 Spectromètre de masse

Le spectromètre de masse est de type triple quadripôle. Parmi les trois quadripôles de travail (Q_1 , Q_2 , Q_3), seuls Q_1 et Q_3 sont utilisés comme filtre de masse. Q_2 , situé dans une

enceinte remplie d'un gaz (N_2), a servi de cellule de collision (ne filtrant pas les ions). Sur le principe (Figure 10), cette méthode permet de sélectionner un ion appartenant au peptide à doser avec le premier analyseur servant de filtre (Q_1). L'ion choisi traverse ensuite la chambre de collision dans laquelle l'arrivée de gaz provoque de nouvelles fragmentations. Les fragments ionisés produits poursuivent leur course vers le second analyseur (Q_3), ce qui conduit au spectre de fragmentation du seul ion sélectionné, à l'exclusion des autres fragments produits par la source de l'appareil.

Parmi les usages principaux de ce type d'appareil, on peut soit déterminer tous les ions formés à partir d'un précurseur sélectionné par le premier filtre, soit connaître les différents précurseurs d'un ion choisi avec le troisième quadripôle. Ce type d'appareillage est bien adapté pour l'analyse quantitative de traces de composés polaires non volatiles et/ou thermosensibles.

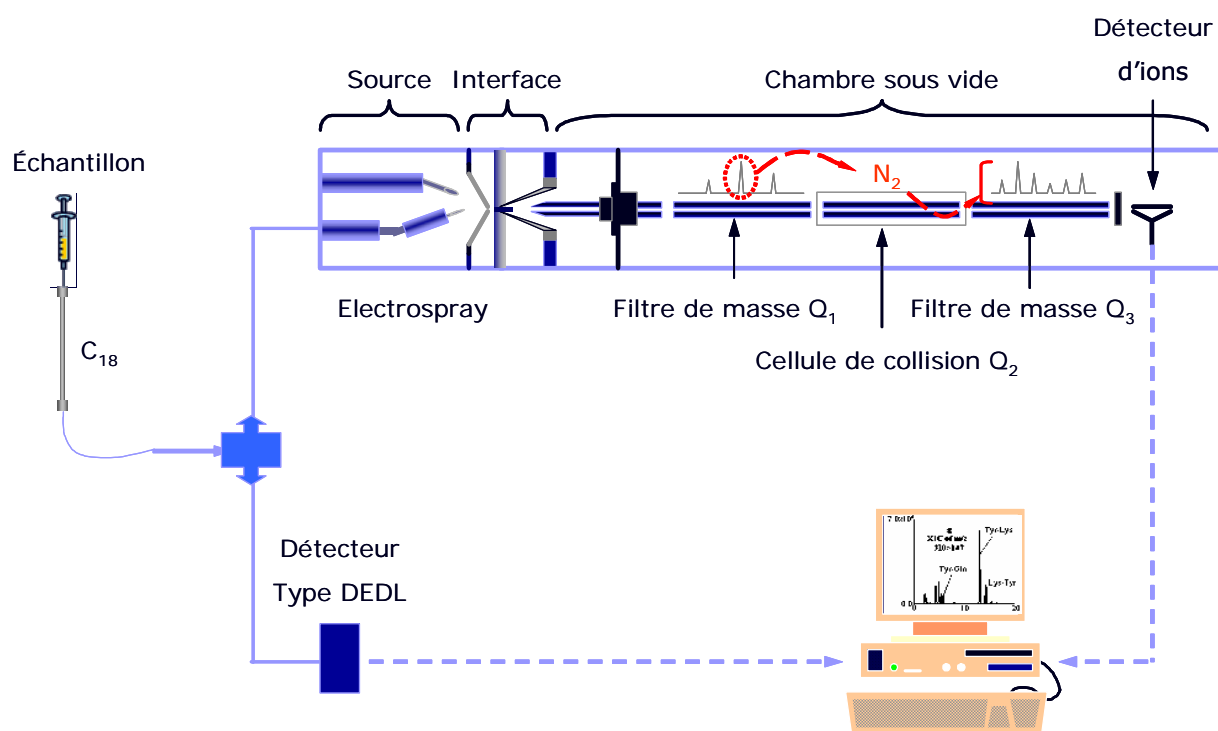


Figure 10. Principe de la spectrométrie de masse en tandem. L'échantillon est déposé au niveau de la source où il passe en phase gazeuse et est ionisé par l'électrospray ESI. L'analyseur MS (Q_1) sélectionne l'ion précurseur (en rouge). L'ion désigné se dissocie dans la cellule de collision (Q_2). Les ions fragments obtenus sont triés au niveau de l'analyseur MS (Q_3) et comptés au niveau du détecteur d'ions. Le traitement du signal et la visualisation du spectre sont récupérés *via* l'enregistreur. DEDL = Détecteur évaporatif à diffusion de la lumière.

4.2.2 Mode d'ionisation

L'ionisation par électronébulisation (ou electrospray, ESI) est un mode d'ionisation douce causant peu de fragmentations. A l'heure actuelle, la technique ESI/MS est devenue l'une des plus importantes techniques d'analyse des molécules biochimiques telles que les polypeptides, les protéines et les oligonucléotides dont la masse moléculaire peut dépasser 100 000 Da.

L'ionisation par nébulisation électrostatique a lieu à pression atmosphérique. La solution d'échantillon est pompée à travers une aiguille en acier inoxydable avec un débit de quelques microlitres par minute. L'aiguille est ensuite portée à plusieurs kilovolts *via* une électrode cylindrique qui entoure l'aiguille. Le brouillard résultant, formé de fines gouttelettes chargées de même polarité que l'électrode, est entraîné par un gaz porteur vers la contre-électrode puis vers l'intérieur du spectromètre dont l'optique électronique est de polarité opposée à ces mêmes gouttelettes. Sur le trajet, le solvant s'évapore et la diminution parallèle du rayon de la goutte augmente sa densité de charge électrique, ce qui provoque une désorption des ions dans la phase gazeuse.

Une caractéristique importante de ce type d'ionisation réside dans la faible fragmentation des grosses molécules biochimiques très sensibles à la température, ne donnant naissance quasi exclusivement qu'à des ions moléculaires (protonés, déprotonés ou adduits). Là encore, ce mode d'ionisation est bien adapté aux molécules ioniques et polaires. Coupler à la MS/MS, ce système s'est récemment révélé être une technique de choix pour la détection des oligopeptides non-dérivés (Petritis *et al.* 2002). De plus, la source à ionisation par nébulisation électrostatique présente l'avantage de pouvoir être couplée directement aux colonnes de chromatographie liquide et d'électrophorèse capillaire.

4.3 MODE OPERATOIRE

Le procédé suivi pour l'identification des peptides utilise une méthode en ligne LC-ESI-MS/MS pour l'identification et la quantification des di- et tripeptides dans le champagne sans pré-traitement de l'échantillon. Une séparation par chromatographie en amont du spectromètre de masse permet de différencier les peptides de même poids moléculaire présentant des caractéristiques de fragmentation similaires.

4.3.1 Séparation par chromatographie

Cette méthode utilise la chromatographie de paire d'ions avec un acide carboxylique perfluoré (l'acide nonafluoropentanoïque ; Aldrich, Sigma) comme surfactant et une colonne classique C 18 comme support. La séparation est réalisée sur colonne Supelcosil ABZ+ Plus 150 x 4,6 mm i.d., 5 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA). La phase mobile est composée de l'acide nonafluoropentanoïque à 2 mM et d'acétonitrile (J.T. Baker, Noisy le Sec, France ; 90:10). Le débit est de 1 mL/minute. Cette méthode permet de séparer les peptides non différenciés par MS/MS en moins de 20 minutes.

4.3.2 Identification et quantification par ESI-MS/MS

L'identification de ces composés, sous leur forme non-dérivée, est basée sur des temps de rétention et des spectres ESI-MS identiques aux peptides de référence. La quantification des peptides est réalisée en utilisant un étalon interne, le dipeptide Phe-Arg.

Ce mode opératoire pour l'identification et la quantification des peptides est repris de la méthode publiée par De Person *et al.* (2004).

4.4 PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les champagnes utilisés étaient des cuvées millésimées différentes ayant vieilles 4, 5, 6, 7, 8, 11, 18 et 20 ans sur lies. L'extrait pour chaque cuvée a été préparé de la manière suivante ; le champagne a été ultrafiltré en une seule étape sur membrane de porosité 1 kDa puis analysé directement en LC-ESI- MS/MS.

C HAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION

1 ETUDES PRELIMINAIRES SUR LE CHAMPAGNE

La méthode de dosage utilisée pour évaluer l'activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA émanait de celle de Cushman & Cheung (1971) avec quelques modifications. Les changements apportés étaient similaires à ceux de Takayanagi & Yokotsuka (1999) qui ont réalisé ce même type de test sur différents vins tranquilles ainsi que sur différentes fractions de raisin de cépage Muscat Bailey A (grains, chair et peau de raisin). C'est donc en toute logique que leur méthode d'analyse a été reprise afin de doser l'activité inhibitrice de l'ECA dans le champagne. Cependant, certains tests ont été nécessaires pour valider les modifications de ce protocole.

Pour cela, la linéarité, la répétabilité et la reproductibilité ont été testées afin de garantir la fiabilité des résultats. Mais avant de commencer à développer les résultats, quelques définitions s'imposent :

↳ La répétabilité est définie comme l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus sur des essais indépendants entre eux, dans des conditions aussi stables que possible, à de courts intervalles de temps, effectués dans un même laboratoire, par un même opérateur utilisant le même équipement et la même méthode, sur un matériel identique. En général, la répétabilité est exprimée par le coefficient de variation (ou RSD) :

$$RSD_1(\%) = \frac{SD}{X} \times 100 \quad RSD_2(\%) = \frac{(2 \times SD)}{(\sqrt{n} \times X)} \times 100$$

où SD représente l'écart type (ou déviation standard) ; X la moyenne des différents essais ; et n le nombre d'essais réalisés.

↳ La reproductibilité correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus sur des essais indépendants entre eux pour une même méthode d'analyse, dans des conditions fortement variables (contrairement à la

répétabilité) à des jours différents, dans différents laboratoires, par différents opérateurs utilisant un équipement différent.

La répétabilité et la reproductibilité sont donc deux critères extrêmes, le premier mesurant la variabilité minimale des résultats et le second, la maximale. Concernant les résultats présentés ci-après, tous les tests ont été réalisés au laboratoire par la même personne sur le même appareil, mais sur un intervalle de temps de plusieurs semaines. La reproductibilité représente donc la variation des résultats en fonction du temps. Le calcul de la reproductibilité a été identique à celui de la répétabilité, mais la moyenne a été calculée sur un plus grand nombre d'essais répartis sur un intervalle de temps plus grand (3 mois pour la reproductibilité et 2 jours pour la répétabilité).

1.1 VALIDATION DU PROTOCOLE D'INHIBITION DE L'ECA

1.1.1 Concentration de la solution stop

La concentration de la solution d'HCl utilisée pour arrêter la réaction est d'une importance non négligeable. En effet, les Figures 11a et 11b montrent des variations d'absorbance suivant la concentration d'HCl et le temps d'incubation des solutions à 37°C.

La Figure 11a indique que plus la solution stop (HCl) est concentrée, plus l'absorbance des solutions stop est importante. De la même manière, mais dans une moindre mesure, l'absorbance à 228 nm de la solution stop évolue aussi avec le temps d'incubation à 37°C (Figure 11b).

Par la suite, la concentration d'HCl de 0,5 N a été choisie pour arrêter la réaction.

1.1.2 Test de linéarité

La linéarité de la méthode a été vérifiée avec un temps de réaction de 90 minutes (Figure 12). Pour chaque temps de prélèvement (10, 20, 30, 45, 60 et 90 minutes), la relation entre la concentration en acide hippurique (exprimée en absorbance à 228 nm) et le temps de réaction a montré une très bonne linéarité avec des coefficients de corrélation très proches de 1 au cours des 45 premières minutes (Tableau 7). La linéarité a été également vérifiée par comparaison des pentes des droites calculées à différents intervalles de temps (Tableau 8). La pente de la courbe a augmenté sensiblement jusqu'au point 30 minutes puis a chuté au-delà. De fait, sur la Figure 12, la pente de la courbe est légèrement modifiée après 30 minutes.

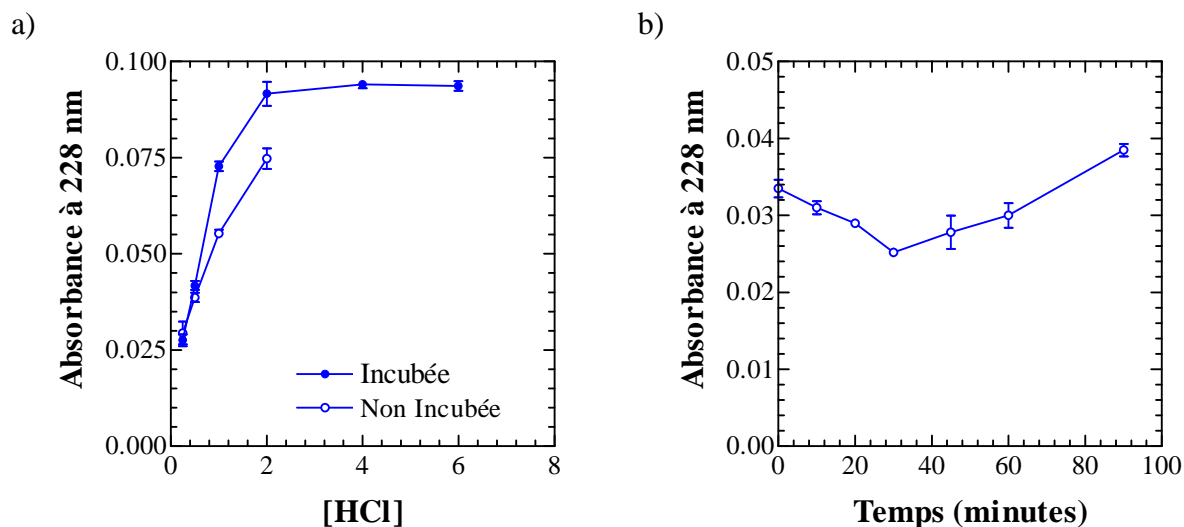


Figure 11. a) Variation de l'absorbance à 228 nm des solutions stop incubées ou non incubées à 37°C pendant 30 minutes en fonction des différentes concentrations en HCl. b) Variation de l'absorbance à 228 nm des solutions stop suivant le temps d'incubation. Les solutions stop sont constituées de 125 μL de Hip-His-Leu (5 mM), 50 μL d'ECA (5 mU), 15 μL d'eau déionisée et 250 μL d'HCl pour les solutions incubées. Les solutions non incubées sont constituées de 125 μL de Hip-His-Leu (5 mM) et 15 μL d'eau déionisée laissés à 37°C pendant 30 minutes puis 250 μL d'HCl et 50 μL d'ECA (5 mU) sont ajoutés à la fin.

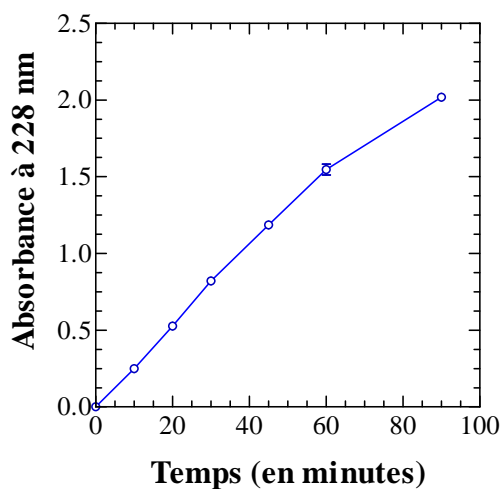


Figure 12. Cinétique d'hydrolyse du substrat Hip-His-Leu par l'ECA (moyenne \pm écart type). Vérification de la linéarité de la méthode en condition d'analyse.

Tableau 7. Coefficient de corrélation (R^2) vérifiant la linéarité des points à différents temps (Figure 12).

	Coefficient de corrélation
0-10 minutes	1,0000
0-20 minutes	0,9990
0-30 minutes	0,9983
0-45 minutes	0,9990
0-60 minutes	0,9988
0-90 minutes	0,9825

Tableau 8. Pente des droites établies à différents intervalles de temps (Figure 12).

	Pente	Ecart type
0-10 minutes	0,02507	1,36E-03
0-20 minutes	0,02637	2,52E-04
0-30 minutes	0,02737	3,51E-04
0-45 minutes	0,02640	3,00E-04
0-60 minutes	0,02580	6,00E-04
0-90 minutes	0,02243	1,53E-04

1.1.3 Répétabilité et reproductibilité du test

Les Tableaux 9 et 10 présentent, respectivement, les résultats des tests de reproductibilité et de répétabilité, effectués en utilisant l'eau comme échantillon. L'examen de ces tableaux montre une très bonne répétabilité et reproductibilité avec des coefficients de variation (RSD) compris entre 1,00 et 1,60 % pour la répétabilité et 1,50 et 4,40 % pour la reproductibilité.

Tableau 9. Test de reproductibilité pour le dosage de l'ECA. Les 33 essais ont été répartis sur 3 mois.

Absorbance à 228 nm après 30 minutes de réaction (33 essais)		
0,7373	0,7888	0,7058
0,7341	0,6813	0,7396
0,7494	0,7514	0,7396
0,7412	0,7637	0,7159
0,7322	0,6989	0,7167
0,7532	0,7724	0,7905
0,6836	0,7146	0,6709
0,7430	0,7433	0,7234
0,7621	0,7393	0,7782
0,6825	0,7210	0,6829
0,6859	0,7199	0,7415
Moyenne	0,7304	
Ecart type	0,0319	
RSD1 (%)	4,37	
RSD2 (%)	1,52	

RSD1 = coefficient de variation (CV)

RSD2 = CV qui prend en compte le nombre d'essais

Tableau 10. Test de répétabilité pour le dosage de l'ECA. Les 9 essais ont été répartis sur 2 jours.

Absorbance à 228 nm après 30 minutes de réaction (9 essais)		
0,7494	0,7433	0,7199
0,7412	0,7393	0,7532
0,7322	0,7210	0,7341
Moyenne	0,7371	
Ecart type	0,0115	
RSD1 (%)	1,56	
RSD2 (%)	1,04	

RSD1 = coefficient de variation (CV)

RSD2 = CV qui prend en compte le nombre d'essais

1.1.4 Contrôle positif d'inhibition

Dans le but de valider cette méthode d'inhibition de l'ECA, un inhibiteur spécifique de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (le captopril) a été ajouté à différentes concentrations et l'activité de l'ECA a été mesurée. Le résultat obtenu est une courbe sigmoïde présentée sur la Figure 13. A de très faibles concentrations, comprises entre 0,5 et 0,005 μM , le passage d'un état d'inhibition totale de l'ECA vers un état de non-inhibition est observé. Le captopril est un inhibiteur très puissant et son IC_{50} (concentration en inhibiteur pour laquelle 50 % de l'activité enzymatique est inhibée) est situé approximativement à 0,043 μM dans nos conditions expérimentales (calculé par régression non linéaire avec le logiciel Prism 3.03).

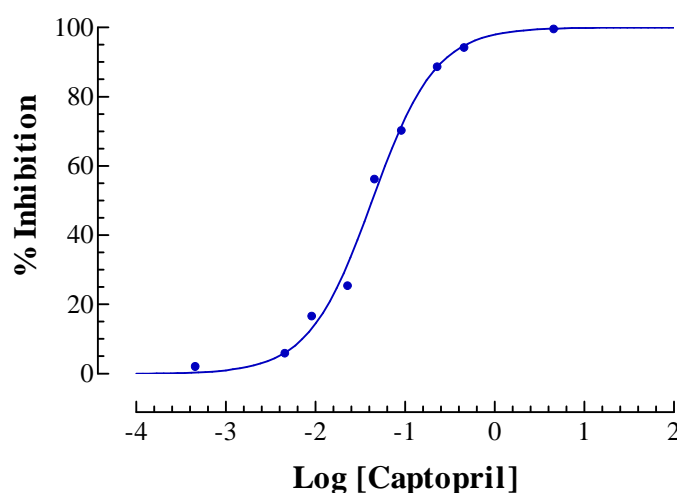


Figure 13. Inhibition de l'ECA par le captopril. Chaque point correspond à la valeur moyenne de 3 expérimentations.

Dans le Tableau 11 sont présentés les paramètres de cette courbe d'inhibition. Dans ce tableau, la valeur de la pente correspond à la pente de la tangente à l' IC_{50} . Le coefficient de détermination (R^2) obtenu à partir de ces valeurs est de 0,9940. Après le calcul de ces variables, il a été possible de situer l' IC_{50} du captopril entre 0,037 et 0,050 μM .

Tableau 11. IC₅₀ du captopril (variables calculées à l'aide du logiciel Prism 3.03).

	Valeurs approchées	Erreur standard	Intervalle de confiance (95 %)
Log IC₅₀	-1,366	0,02725	-1,431 à -1,302
Pente	1,226	0,08955	1,014 à 1,438
IC₅₀ (μM)*	0,04303	-	0,03710 à 0,04992

* Résultats obtenus pour cette étude

1.2 TESTS D'INHIBITION SUR LE CHAMPAGNE

Comme décrit dans le chapitre II, le champagne a été ultrafiltré en 2 fois afin de récupérer la fraction regroupant les oligopeptides. A chaque étape d'ultrafiltration, un échantillon a été récupéré. Ainsi, il a été possible de réaliser des mesures d'activité de l'ECA sur les fractions suivantes : le champagne brut (sans ultrafiltration), la fraction > 10 kDa, la fraction 1-10 kDa et la fraction < 1 kDa. Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 14.

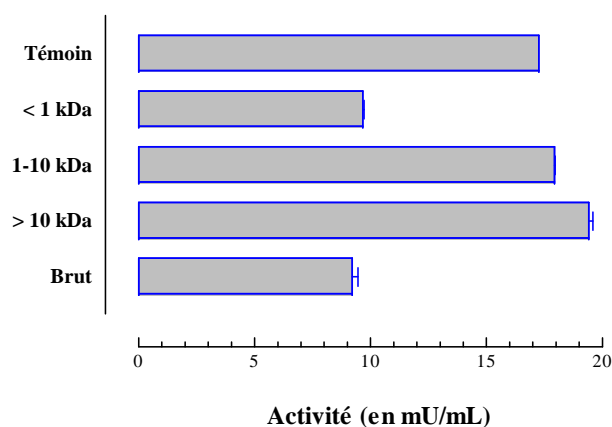


Figure 14. Activité de l'ECA dans le champagne et ses différentes fractions (moyenne ± écart type). Une unité d'activité de l'ECA est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à la formation d'1 μM d'acide hippurique à partir du substrat Hip-His-Leu, par minute et à 37°C.

- Témoin = eau
- Fraction < 1kDa
- Fraction 1-10 kDa
- Fraction > 10 kDa,
- Brut = champagne

La présence d'une plus faible activité de l'ECA dans l'échantillon brut et sa fraction < 1 kDa indique la présence de composés à même de diminuer, voire d'inhiber, cette activité enzymatique. En comparant chaque fraction par rapport au témoin, il est frappant de constater que quasiment toute « l'activité inhibitrice » vis-à-vis de l'ECA contenue dans l'échantillon

brut est retrouvée dans la fraction < 1 kDa (95 % de recouvrement). Concernant la fraction protéique, une légère augmentation de l'activité de l'ECA par rapport au témoin est observée.

La présence d'activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA a aussi été recherchée dans d'autres champagnes d'âges différents (avec des cuvées ayant vieilli sur lies pour une durée de 1 à 25 ans ; Figure 15). Une activité inhibitrice vis à vis de l'ECA > 70 % a été retrouvée dans toutes les cuvées (échantillons bruts sans ultrafiltration). Mais, il n'a pas été établi de relation entre la durée de vieillissement des vins de Champagne et l'activité inhibitrice de l'ECA retrouvée dans les différentes cuvées.

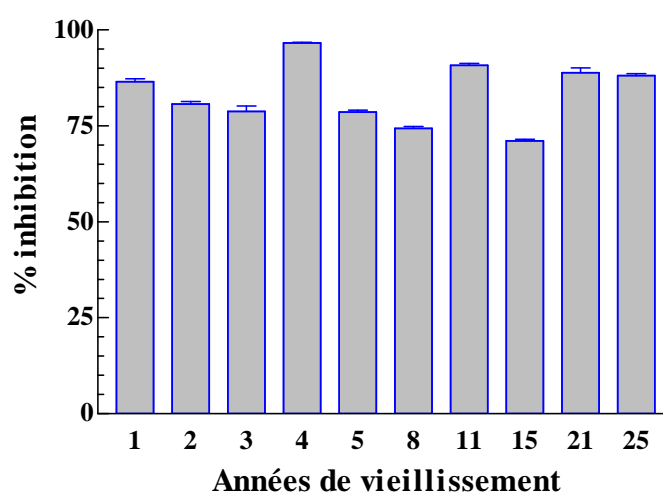


Figure 15. Activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA mesurée dans des champagnes bruts (sans ultrafiltration) d'âges différents (moyenne ± écart type).

1.3 FRACTIONNEMENT SUR GEL DE SEPHADEX[®] LH-20

1.3.1 Extrait < 1 kDa de champagne

L'échantillon concentré 20 fois a été fractionné par chromatographie sur gel de Sephadex[®] LH-20. Les fractions collectées à l'issue de la séparation ont été testées vis-à-vis de leur capacité à inhiber l'ECA. La Figure 16 montre les résultats des dosages obtenus. La présence d'une activité inhibitrice de l'ECA a été retrouvée dans les fractions 11 à 17, lesquelles regroupent la majorité des peptides. Quatre de ces fractions peptidiques ont montré une activité inhibitrice supérieure à 60 % (fractions 11 à 14). Il a également été observé, par électrophorèse capillaire, que certains acides organiques étaient présents dans quelques fractions. Ainsi, les acides tartrique, succinique et citrique ont été retrouvés dans les fractions 17 à 20.

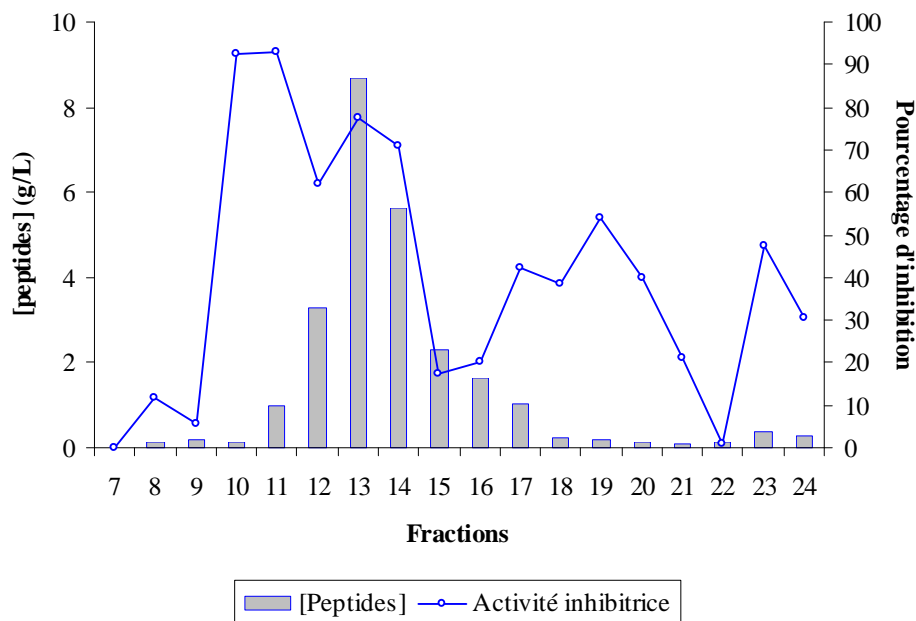


Figure 16. Concentration en peptides et activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA des différentes fractions issues de la chromatographie de l'extrait < 1 kDa de champagne sur gel de Sephadex® LH-20. Elution réalisée avec un tampon acétate 0,3 M ; pH 4,0 ; débit 20 mL/h.

1.3.2 Extrait < 1 kDa d'autolysat

De la même manière, le fractionnement de l'extrait < 1 kDa d'un autolysat a montré de forts taux d'inhibition vis-à-vis de l'ECA au niveau des fractions peptidiques collectées (Figure 17).

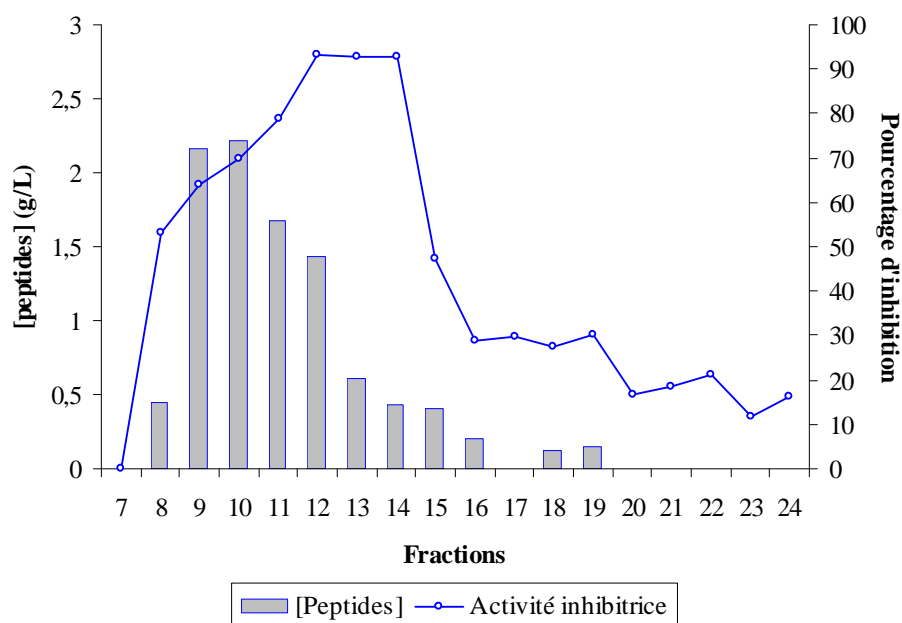


Figure 17. Concentration en peptides et activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA des différentes fractions issues de la chromatographie de l'extrait < 1 kDa de l'autolysat sur gel de Sephadex® LH-20. Elution réalisée avec un tampon acétate 0,3 M ; pH 4,0 ; flux 20 mL/h.

Les fractions 8 à 14 ont montré un taux d'inhibition supérieur à 50 %, et supérieur à 95 % pour les fractions 12 à 14.

1.4 TESTS D'INHIBITION DES PEPTIDES IDENTIFIES DANS LE VIN DE BASE

Sept oligopeptides isolés du vin de base par Desportes *et al.* (2001) ont été testés sur leur capacité à inhiber l'ECA (Tableau 12). Parmi ces peptides, 2 se sont montrés inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I :

- ↳ Un dipeptide (Ile-Arg, $IC_{50} = 2312 \mu M$),
- ↳ Et un tripeptide (Phe-Arg-Arg, $IC_{50} = 465,8 \mu M$).

Tableau 12. Activité inhibitrice de l'ECA des peptides identifiés dans le vin de base.

Structure des peptides	IC_{50}^* ($\mu M/L$)
Val-Ile	ND†
Ile-Val	ND†
Ile-Arg	2312
Tyr-Lys	> 2500
Phe-Lys	ND†
Phe-Arg-Arg	465,8
Lys-Met-Asn	ND†
Captopril‡	0,043

* Concentration en peptide pour laquelle 50 % de l'activité de l'ECA est inhibée (la réaction utilisant le substrat Hip-His-Leu).

† Non déterminée

‡ Utilisé comme référence

1.5 DISCUSSION

Les résultats obtenus au cours de cette étude préliminaire ont montré que la concentration de la solution d'HCl utilisée pour arrêter la réaction était d'une importance non négligeable. En effet, il a été observé que plus la solution d'acide chlorhydrique était concentrée (concentrations allant de 0,25 à 6 N), plus l'absorbance de la solution stop (A_{stop} , Absorbance de la solution arrêtée dès le départ) était importante (Figure 11a). Ce phénomène s'explique simplement par l'hydrolyse naturelle du substrat en milieu acide. La concentration en HCl choisie dans cette étude pour arrêter la réaction a été de 0,5 N afin de limiter l'incidence de

l'hydrolyse du substrat lors de l'ajout de la solution stop, car les concentrations en HCl supérieures à 0,5 N ont induit des changements en défaveur des calculs de l' IC_{50} de l'ordre de 5 à 10 %. La concentration d'HCl à 0,25 N n'a pas été retenue du fait de la grande variabilité d'absorbance pour la solution stop qui pourrait indiquer que la solution n'était pas assez acidifiée pour arrêter la réaction immédiatement (d'après Cushman et Cheung 1971, l'activité de l'enzyme est nulle à $pH < 4,0$).

De la même manière, le temps de réaction a une influence sur l'absorbance des solutions stop mais dans une moindre mesure (voir Figure 11b). Ces variations, de l'ordre de 0,01 unités d'absorbance, ont été négligées par la suite.

L'évaluation de la linéarité de la réaction a été nécessaire afin d'apprécier correctement l'activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA. D'après l'étude de Cushman et Cheung (1971), l'ECA, avec son substrat Hip-His-Leu, suit le modèle enzymatique de Michaelis et Menten. Cette réaction fait intervenir deux substrats, l'eau et Hip-His-Leu, pour donner deux produits, l'acide hippurique et le dipeptide His-Leu. De ce fait, elle devrait normalement être considérée comme une réaction du second ordre. Or l'eau étant en large excès, sa concentration au cours de la réaction reste pratiquement constante et égale à la concentration initiale. Cette réaction sera donc considérée comme une réaction du premier ordre (un seul substrat transformé en un seul ou plusieurs produits).

La cinétique d'apparition de l'acide hippurique (Figure 12) suit donc le profil de type exponentiel d'une cinétique de premier ordre, comme exposé sur la Figure 18. Sur cette dernière, la courbe « produit formé en fonction du temps » montre une partie rectiligne où la pente (qui représente la vitesse de formation du produit) est constante. Puis la courbe s'infléchit et la pente diminue. Au final, la pente de la courbe tend vers zéro une fois tout le substrat transformé. La mesure de la pente de la tangente à la courbe au point t_0 donne la valeur de la vitesse initiale v_0 (qui est une constante) dans sa partie rectiligne (en enzymologie cette phase est appelée « état stationnaire »).

Dans une cinétique du premier ordre, la fixation d'un inhibiteur à l'enzyme doit entraîner son inactivation partielle ou totale et ainsi impliquer une diminution ou une annulation de la vitesse initiale. Pour évaluer une activité inhibitrice, il faut donc se trouver dans des conditions de vitesse initiale, donc dans la partie rectiligne (linéaire) de la courbe exposée sur la Figure 12.

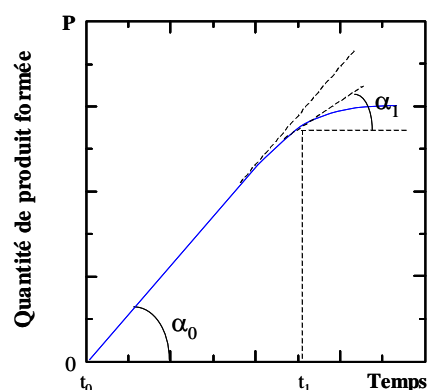


Figure 18. Détermination de la vitesse initiale d'une réaction enzymatique et de sa vitesse à l'instant t.

Ainsi, les tests de linéarité ont permis de montrer que la relation était linéaire sur 30 minutes dans nos conditions expérimentales. Les mesures des coefficients directeurs ainsi que celles des coefficients de corrélation ont confirmé que, sur la période allant de 0 à 30 minutes, la libération d'acide hippurique était constante, et que le système se trouvait donc en condition de vitesse initiale. La Figure 12, peut se décomposer en deux phases : la phase 1 (0-30 minutes), ou état stationnaire, où la vitesse est proportionnelle à la concentration en enzyme, indiquant que l'enzyme est le facteur limitant, et la phase 2 (30-90 minutes) où la pente diminue progressivement. Cette perte de l'état stationnaire en phase 2 s'explique par le fait que le substrat n'est plus présent en excès dans la solution réactionnelle.

Il est à noter que le profil d'absorbance à 228 nm de l'acide hippurique en fonction de sa concentration a montré une très bonne linéarité entre 0,035 et 1,210 unité d'absorbance ($R^2 = 0,9998$). Le fléchissement de la courbe après 30 minutes de réaction est donc bien dû à la perte de l'état stationnaire et ne peut pas être imputé à un effet du spectrophotomètre.

Il a donc été choisi de conserver une durée d'analyse de 30 minutes. Ce temps permet, entre autre, une libération suffisante de produit de réaction pour les calculs d'inhibition de l'ECA. En général, il est considéré qu'une absorbance comprise entre 0,01 et 2,00 est suffisamment fiable pour des mesures d'absorbance avec le spectrophotomètre UVIKON 930.

En résumé, les tests effectués ont montré que la méthode de mesure de l'activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA était reproductible (écart-types < 5 %) et les résultats ont montré une bonne cohérence des écarts entre les moyennes. C'est donc ce protocole qui a été choisi afin de réaliser tous les tests d'inhibition de l'ECA pour la suite de l'étude.

La vérification de tous ces paramètres (linéarité, répétabilité et reproductibilité) a permis de conforter la fiabilité des résultats obtenus. Cependant, certaines études rapportant l'adaptation ou les modifications en vue de l'optimisation de la méthode de Cushman et Cheung (1971) ne traitent ni du rôle des conditions expérimentales sur les résultats ni des vérifications de ces paramètres, même pour les plus récentes (Fuglsang *et al.* 2002 ; Vermeissen *et al.* 2002a ; Hernández-Ledesma *et al.* 2003). Pourtant ces vérifications représentent la base même des normes COFRAC et ISO aboutissant à la validation et à la reconnaissance nationale et internationale des méthodes.

L'utilisation de différentes concentrations en captopril sur l'activité de l'ECA a permis d'obtenir une courbe dose/réponse de type sigmoïde (Figure 13). Entre 0 et 100 %, l'activité inhibitrice sur l'ECA est régie par une courbe en S, dépendante du logarithme de la concentration en inhibiteur. L'utilisation d'un logiciel de régression non-linéaire a permis d'ajuster les paramètres de la courbe afin de caractériser la pente de la relation dose/réponse au point d'inflexion ainsi que l'IC₅₀, concentration en inhibiteur à l'origine d'une inhibition de 50 % (selon le modèle d'équation de Hill, 1910).

La courbe d'inhibition obtenue pour cet inhibiteur spécifique de l'ECA a servi de référence pour les tests réalisés avec les peptides de synthèse. La littérature scientifique existant sur ce type de sujet montre qu'il est difficile de comparer les valeurs obtenues entre différents peptides sitôt qu'une molécule standard n'est pas testée. Régulièrement, les auteurs ont proposé leur propre procédé pour réaliser les tests d'inhibition à partir du protocole établi en 1971 par Cushman & Cheung. Ces modifications sont essentiellement réalisées au niveau des tampons de réaction, des concentrations en NaCl, des quantités d'enzyme et/ou de substrat, des substrats eux-mêmes, des volumes réactionnels.... Ceci a abouti tout naturellement à des modifications des résultats pour une même molécule. De fait, au regard des IC₅₀ obtenues pour un inhibiteur compétitif de référence comme le captopril (Tableau 13), ceux-ci se sont trouvés modifiés suivant les auteurs et les méthodes utilisées. Malheureusement, peu d'auteurs ont publié leurs résultats en comparant les IC₅₀ obtenues avec celle d'un inhibiteur connu.

Les tests d'activité de l'ECA réalisés sur les différentes fractions de champagne ont permis de mettre à jour la part du champagne la plus active *in vitro*. En effet, tout ou partie des molécules à même d'inhiber l'ECA a été retrouvée dans la fraction < 1 kDa (Figure 14) soit, près de 95% de l'activité inhibitrice ont été attribués aux petites molécules contenues

dans cette dernière fraction. Ces résultats rejoignent ceux de nombreux auteurs ayant travaillé sur d'autres aliments et pour qui la fraction de faible poids moléculaire (< 1 kDa) était la plus active dans l'inhibition de l'ECA (Mullally *et al.* 1996, 1997b ; Hyun & Shin 2000 ; Pihlanto-Leppälä *et al.* 2000, 2001 ; Wu & Ding 2001 ; Saiga *et al.* 2002). Concernant la fraction protéique, un test réalisé au laboratoire avec le captopril a permis de montrer que l'inhibition complète de l'enzyme n'avait pas empêché une légère dégradation du substrat lors du test sur la fraction > 10kDa. Il en a été déduit que d'autres enzymes ou molécules retrouvées dans le champagne, et présentes dans la fraction > 10 kDa, étaient capables de dégrader le substrat. Ces résultats expliqueraient pourquoi une activité supérieure pour cette fraction par rapport au témoin a été observée Figure 14.

Tableau 13. Activité inhibitrice de l'inhibiteur compétitif, captopril.

IC ₅₀ * captopril (en µM)	Références
0,023	Cushman <i>et al.</i> 1982
0,018	Duncan <i>et al.</i> 1999
0,022	Fujita & Yoshikawa 1999
0,021	Hooper 1991
0,010	Mito <i>et al.</i> 1996
0,025	Ondetti <i>et al.</i> 1977
0,007	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> 1998
0,022	Tauzin <i>et al.</i> 2002
0,009	Vermeissen <i>et al.</i> 2002a
0,043	Cette étude

* Concentration en peptide pour laquelle 50 % de l'activité de l'ECA est inhibée.

La recherche de l'IC₅₀ de ces fractions (brut et < 1 kDa) a bien été tentée, cependant, le pouvoir tampon du vin concentré a été tel, que la force ionique du tampon de réaction n'a pas été suffisante pour maintenir le pH à 8,3. De plus, le tétra-borate de sodium (ou borax), entrant dans la composition du tampon de réaction, a été un facteur limitant supplémentaire car il ne s'est pas (ou très peu) solubilisé dans l'eau déionisée au-delà de 0,1 M.

Le fractionnement sur gel de Sephadex[®] LH-20 a montré que les fractions peptidiques présentaient un effet inhibiteur important vis-à-vis de l'ECA. Mais d'autres fractions, où les peptides ne sont pas (ou peu) représentés, ont été en mesure de montrer des activités

inhibitrices assez importantes. La fraction < 1 kDa ne contient pas uniquement des peptides. De nombreux composés sont retrouvés dans cet extrait, notamment des composés phénoliques, des vitamines, des acides organiques... Certains d'entre eux ont pu interagir, comme par exemple des composés phénoliques, dont certains ont montré des capacités à inhiber l'ECA (Inokuchi *et al.* 1986 ; Oh *et al.* 2002 ; Liu *et al.* 2003). Des acides organiques de faible poids moléculaire (acides tartrique, malique, succinique et citrique) sont également connus pour leurs propriétés de chélation (The Merck Index 2001 ; White *et al.* 2003) et ont pu interférer avec l'activité de la métallo-enzyme ECA en complexant le zinc nécessaire à son activité. L'électrophorèse capillaire a permis de retrouver quelques uns de ces acides organiques (acides tartrique, succinique et citrique) dans les dernières fractions (17 à 20). Il se pourrait alors qu'ils aient contribué à l'augmentation de l'activité inhibitrice observée.

La même expérience, mais réalisée avec un autolysat, a permis de s'affranchir de la présence des composés phénoliques et de certains acides organiques. En effet, l'autolyse en milieu modèle est censée reproduire le phénomène de dégradation des levures au cours du vieillissement sur lies des champagnes. Les composés phénoliques et les acides organiques ne sont pas des substances endogènes de la levure et par conséquent, ne se sont pas retrouvés dans l'autolysat en milieu modèle. De ce fait, cette expérience a montré d'une part, la forte potentialité des levures à libérer des composés de faible poids moléculaire capables d'inhiber l'ECA au cours du vieillissement, et d'autre part, que les fractions montrant plus de 60 % d'inhibition contenaient des oligopeptides. De la même manière, entre le profil de fractionnement de l'autolysat et celui de l'extrait de champagne < 1 kDa, les plus forts taux d'activité inhibitrice retrouvés dans les fractions ont été corrélés à la présence de peptides.

L'objectif de cette partie était la mise au point des conditions d'analyse *in vitro* pour la détermination de l'activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA dans des échantillons d'extraits de champagne et des solutions standards. L'étude de l'influence de différentes variables de la réaction (temps de réaction et concentration de la solution stop) a permis de valider cette analyse pour la recherche de l'IC₅₀ des peptides. Les tests réalisés sur les peptides identifiés du vin de base (Desportes *et al.* 2001) ont montré que deux d'entre eux étaient inhibiteurs de l'ECA. Par rapport à la littérature existante sur les peptides inhibiteurs retrouvés dans les produits alcoolisés, les IC₅₀ présentées dans le Tableau 12 se sont avérées plus élevées que celles mentionnées dans le vin et le saké, dont les IC₅₀ sont < 93 µM (Saito *et al.* 1994b ; Takayanagi & Yokotsuka 1999) traduisant une activité inhibitrice moindre.

En conclusion, une activité inhibitrice envers l'enzyme de conversion de l'angiotensine I a été détectée dans les vins de Champagne. Les taux d'inhibition détectés étaient supérieurs à 70 % pour tous les champagnes testés et les fractions contenant les oligopeptides ont montré de fortes activités inhibitrices. De plus, des peptides inhibiteurs de l'ECA ont été identifiés dans le vin de base. Ces derniers peuvent être retrouvés dans le champagne, si toutefois, ils ne sont pas dégradés au cours de la prise de mousse. Ces observations préliminaires semblent donc indiquer que le champagne disposerait de composés biologiquement actifs et de nature peptidique. Un des effets biologiques potentiels pourrait être un effet sur la tension artérielle par inhibition de l'ECA.

2 CARACTERISATION DE LA FRACTION < 1 KDA

Avant de poursuivre les expériences visant à évaluer l'effet antihypertenseur de l'extrait < 1 kDa de champagne, il paraissait important de connaître la nature des composés présents dans la fraction administrée aux animaux. Les résultats des analyses sont présentés ci-après.

2.1 COMPOSITION EN ACIDES AMINES LIBRES ET LIÉS

Les concentrations en acides aminés libres, totaux et liés (en mmole/L) contenus dans la fraction < 1 kDa sont rapportées dans le Tableau 14.

Tableau 14. Concentrations en acides aminés de la fraction < 1 kDa (en mmole/L ; extrait concentré 10 fois).

	AA libres		AA totaux		AA peptidiques	
	mmole/L	pourcentage	mmole/L	pourcentage	mmole/L	pourcentage
Asx	3,944	6,8%	8,659	8,4%	4,715	10,4%
Glx	2,755	4,8%	10,770	10,5%	8,016	17,7%
Ser	0,901	1,6%	4,958	4,8%	4,057	9,0%
Gly	0,332	0,6%	6,612	6,4%	6,280	13,9%
His	0,904	1,6%	1,225	1,2%	0,322	0,7%
Thr	0,997	1,7%	4,090	4,0%	3,093	6,8%
Arg	3,236	5,6%	3,976	3,9%	0,741	1,6%
Ala	4,285	7,4%	8,481	8,2%	4,196	9,3%
Gaba	3,409	5,9%	4,411	4,3%	1,002	2,2%
Pro	25,355	43,9%	27,835	27,0%	2,480	5,5%
Tyr	0,859	1,5%	1,689	1,6%	0,830	1,8%
Cys	0,000	0,0%	0,457	0,4%	0,457	1,0%
Val	1,391	2,4%	3,840	3,7%	2,450	5,4%
Met	0,704	1,2%	0,775	0,8%	0,072	0,2%
Ileu	1,236	2,1%	3,290	3,2%	2,054	4,5%
Leu	3,129	5,4%	5,185	5,0%	2,056	4,5%
Lys	3,035	5,3%	4,509	4,4%	1,474	3,3%
Phe	1,326	2,3%	2,218	2,2%	0,892	2,0%
TOTAL	57,793	100,0%	102,976	100,0%	45,183	100,0%

AA, Acides aminés ; Asx, Acide aspartique + asparagine ; Glx, Acide glutamique + glutamine ; Gaba, Acide γ -aminobutyrique.

Parmi tous les acides aminés libres présents dans l'extrait, la proline est l'élément le plus représenté (43,9 %) suivi de Ala, Asx, Gaba, Arg, Leu et Lys. Au niveau des acides aminés retrouvés dans les peptides, la répartition est différente. Dans l'ordre décroissant du

pourcentage molaire, Glx, Gly, Asx, Ala, Ser, Thr, Pro et Val sont prédominants. Parmi les variations individuelles observées, la méthionine est l'un des acides aminés les moins représentés dans l'extrait, que ce soit sous forme libre ou sous forme liée. La proline, par contre, est beaucoup plus présente sous forme libre que sous forme liée, à l'inverse de la glycine.

2.2 COMPOSITION CHIMIQUE DE LA FRACTION < 1 kDa

La composition de la fraction < 1 kDa en acides organiques, composés phénoliques, composés azotés, ions, acétaldéhyde, glycérol, sulfates, urée, glucides simples et éthanol est présentée dans le Tableau 15.

Tableau 15. Composition chimique de la fraction < 1 kDa de champagne (concentré 10 fois).

Composés	Concentration	Composés	Concentration
Acides organiques		Composés azotés	
Acide ascorbique	0 g/L	Azote total	2460 mg N/L
Acide malique	0 g/L	AA libres	1031 mg N/L
Acide lactique	28 g/L	AA totaux	1712 mg N/L
Acide tartrique	17 g/L	AA peptidiques	681 mg N/L
Acide citrique	1,91 g/L		
Composés Phénoliques (CP)		Ions	
Acide gallique	9,02 mg/L	Calcium	540 mg/L
APC	1,633 mg/L	Cuivre	0,29 mg/L
Acide caftarique	105,2 mg/L	Fer	14,0 mg/L
Acide coutarique	5,103 mg/L	Magnésium	540 mg/L
Acide fertarique	7,078 mg/L	Manganèse	6,4 mg/L
GRP	52,55 mg/L	Potassium	410 mg/L
Acide caféique	8,253 mg/L	Sodium	88 mg/L
Acide <i>p</i> -coumarique	3,291 mg/L	Zinc	4,90 mg/L
Acide férulique	1,502 mg/L	Sulfates	2,00 g K ₂ SO ₄ /L
3,4,5,TMC	0,112 mg/L	Autres composés	
Tryptophol	0,484 mg/L	Acétaldéhyde	157 mg/L
Resvératrol	0,785 mg/L	Glycérol	56,2 g/L
Guaïacol	0,424 mg/L	Urée	71 mg/L
Vanilline	0,862 mg/L	Glucose	2,1 g/L
Quercétine	0,624 mg/L	Fructose	9,1 g/L
		Ethanol	< 0,1 g/L
Total CP	196,9 mg/L	Extrait sec	98,4 g/L

GRP, acide 2-S-glutathionylcaftarique ; TMC, triméthoxy-cinnamaldéhyde ; APC, acide protocatéchique.

L'analyse de la composition chimique de l'extrait de champagne a montré que cette fraction ne contenait quasiment plus d'éthanol ($< 0,1$ g/L), d'acide ascorbique ni d'acide malique. La concentration totale en composés phénoliques est de 197 mg/L, avec une présence prépondérante de l'acide caftarique (53,4 %) et de l'acide 2-S-glutathionylcaftarique (26,7 %). Certains ions (Mg^{++} , Ca^{++} et K^+) sont présents en relativement forte quantité (540, 540 et 410 mg/L respectivement) par rapport à d'autres éléments (Fe^{+++} , Zn^{++} , Mg^{++} , Cu^{++} , Na^+). Concernant les composés azotés, les peptides sont retrouvés à hauteur de 681 mg N/L (soit l'équivalent de 5420,9 mg/L de peptides dans l'extrait).

2.3 DISCUSSION

Le dosage des acides aminés libres et liés a été réalisé avec une méthode utilisant le réactif AQC comme produit de dérivation afin d'observer les acides aminés après séparation en chromatographie liquide haute performance. Cette méthode d'analyse permettant de déterminer la composition aminée des peptides a pour inconvénient de détruire le tryptophane lors de l'hydrolyse acide. De la même manière, des pertes importantes en cystéine et en méthionine se sont produites, ce qui explique pourquoi la méthionine est si peu représentée, aussi bien sous forme libre que sous forme liée. L'asparagine et la glutamine ont été, quant à elles, transformées en acide aspartique, glutamique et ammoniacque au cours de l'hydrolyse acide.

Les études menées sur les moûts de raisin ont montré que, parmi les acides aminés libres, la proline et l'arginine étaient les acides aminés les plus abondants et cela, quel que soit le cépage et l'origine géographique des raisins constitutifs du moût (Millery *et al.* 1986 ; Feuillat *et al.* 1998). Cette relative richesse en proline et arginine retrouvée dans le vin de base (Desportes *et al.* 2000) et dans l'extrait de champagne s'explique d'une part, par le fait que la levure n'assimile généralement pas la proline et d'autre part, par le fait que l'arginine ne commence à être incorporée par la levure qu'une fois l'ion ammonium disparu du milieu fermentaire (Ribéreau-Gayon *et al.* 1998). Toute comparaison avec d'autres vins demeure cependant difficile car les concentrations en acides aminés libres d'un vin restent extrêmement variables. Ainsi les valeurs minimale et maximale peuvent varier d'un facteur 2 à 27 pour un vin blanc (Cabanis *et al.* 1998). Un des principaux phénomènes se produisant lors des fermentations, est un remaniement du pool aminé. De plus, en fin de fermentation, la levure excrète des quantités variables mais toujours significatives de différents acides aminés (phénomène d'exsorption). Des 1 à 2 g/L d'acides aminés assimilés par la levure au cours de

la fermentation alcoolique, il ne reste, à terme, que quelques centaines de milligrammes dont plus de la moitié est de la proline (Ribéreau-Gayon *et al.* 1998).

En ce qui concerne les résultats du dosage des acides aminés présents dans les peptides, leur concentration a été calculée par différence entre la concentration en acides aminés totaux (obtenus après hydrolyse acide) et la concentration en acides aminés libres. De façon générale, les résultats présentés dans le Tableau 14 sont en accord avec ceux publiés par Moreno-Arribas *et al.* (1998*a,b*) concernant la composition en acides aminés peptidiques de la fraction < 700 Da des vins effervescents espagnols (cavas). En effet, l'analyse a montré la prédominance des acides aminés Gly, Thr, Ser, Ala, Pro, Asx, Lys et Glx pour une durée de vieillissement sur lies similaire (15 mois). Ces observations sont aussi en accord avec les résultats rapportés par Desportes (1999) pour des champagnes plus âgés dans lesquels les acides aminés peptidiques les plus représentés quantitativement sont Glx, Pro, Ser et Ala. Néanmoins, un vieillissement plus long peut perpétuer le remaniement des acides aminés libres et liés, et impliquer des modifications dans leur prédominance au cours du temps.

L'acide γ -aminobutyrique (Gaba), est un acide aminé qui se retrouve dans le raisin et qui n'est qu'incomplètement utilisé par la levure lors des fermentations (Feuillat *et al.* 1998 ; Ribéreau-Gayon *et al.* 1998). Contrairement à ce qui a été retrouvé dans la littérature, le Gaba n'est pas censé entrer dans la composition des peptides du vin libérés au cours du vieillissement sur lies. La concentration en Gaba est même amenée à diminuer après la seconde fermentation jusqu'à devenir négligeable après 9 mois sur lies (Moreno-Arribas *et al.* 1998*b*). Néanmoins dans notre cas, sa présence a été détectée dans les peptides à hauteur de 2,2 % dans l'extrait peptidique < 1 kDa après 15 mois sur lies. Moreno-Arribas *et al.* (1998*b*) et Desportes (1999) ont toutefois observé la présence d'acide γ -aminobutyrique dans les protéines de cavas et les peptides du champagne mais pour des cuvées ayant vieilli plus de 15 mois sur lies.

En considérant les relations structure-activité des peptides inhibiteurs de l'ECA (paragraphe 5.4, Chapitre I), l'étude du Tableau 14 montre la présence d'acides aminés caractéristiques et d'importance structurale pour ce type de peptide inhibiteur. Combinées aux premières observations faites sur la présence d'une activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA dans l'extrait < 1 kDa, ces observations contribuent au fait que le champagne pourrait disposer de peptides biologiquement actifs et que l'un des rôles biologiques potentiels pourrait être une capacité à inhiber l'ECA.

Parmi les acides organiques retrouvés dans le vin, les acides tartrique, malique, citrique et ascorbique sont issus du raisin. Les acides organiques sont principalement impliqués dans l'acidité et le pH des vins (Ribéreau-Gayon *et al.* 1998). En équilibre avec les sels présents, ils peuvent agir comme tampon pour maintenir le pH du vin entre 2,9 et 4,0 (Dartiguenave *et al.* 2000 ; Torija *et al.* 2003).

En ce qui concerne la composition globale de l'extrait de champagne, l'acide malique est absent dans la fraction < 1 kDa. La fermentation malo-lactique est à l'origine de la disparition de l'acide malique au profit de l'acide lactique. De la même manière, mais dans une moindre mesure, l'acide citrique peut être dégradé au cours de la fermentation par les bactéries lactiques. Néanmoins, il semble que la bactérie *Enococcus œni*, sélectionnée par Moët & chandon pour ses fermentations malo-lactiques, ne dégrade pas cet acide organique (Charpentier, communication personnelle). Dans les vins et champagnes, les concentrations en acide citrique sont de l'ordre de 0,20 g/L (Cabanis *et al.* 1998 ; Charpentier, communication personnelle). Dans l'extrait, la concentration en acide citrique est en accord avec les valeurs retrouvées habituellement (0,19 g/L dans l'extrait non concentré).

L'acide ascorbique, présent au départ dans les moûts, disparaît au cours de la fermentation et les vins en sont généralement dépourvus. Néanmoins, cet acide organique est parfois utilisé comme agent protecteur vis-à-vis de l'oxydation enzymatique, la casse ferrique, ainsi que pour l'amélioration gustative des vins aérés (Ribéreau-Gayon *et al.* 1998) ce qui expliquerait vraisemblablement pourquoi il est retrouvé dans les vins à des concentrations de l'ordre de 1 à 5 mg/L d'après la littérature (Cabanis & Flanzy, 1998).

L'analyse des champagnes a rapporté la présence d'acide tartrique à des concentrations moyennes d'environ 2 à 3 g/L après stabilisation tartrique (Charpentier, communication personnelle). Les quantités retrouvées dans l'extrait sont plus faibles (1,7 g/L pour l'extrait non concentré) mais s'expliquent par la précipitation de tartrate au cours des phases de concentration à l'évaporateur rotatif.

Les composés phénoliques revêtent une grande importance eu égard au rôle qu'ils peuvent jouer directement ou indirectement sur la qualité des vins. Ils peuvent être à l'origine de la couleur et de l'astringence, mais aussi, selon leur nature, ils peuvent présenter un intérêt aux niveaux nutritionnel et/ou pharmacologique (Cheynier *et al.* 1998). Jusqu'à maintenant, les études se sont principalement portées sur la recherche de ces éléments dans les vins rouges. Pour l'heure, peu d'informations sont disponibles quant à la concentration en composés phénoliques retrouvés dans les vins blancs. Cependant, cette composition varie en fonction

d'un grand nombre de facteurs externes comme le cépage, le climat, le sol, le degré de maturation, l'état sanitaire ainsi que le mode d'élaboration du vin (Nagel & Wulf 1979 ; Singleton & Trousdale 1983 ; Jackson & Lombard 1993 ; Pozo-Bayón *et al.* 2003 ; Chamkha *et al.* 2003). Récemment, trois études ont tenté de les caractériser dans les cavas (vins effervescents espagnols élaborés selon la méthode champenoise) et les champagnes (Andrés-Lacueva *et al.* 2002 et Pozo-Bayón *et al.* 2003 ; Chamkha *et al.* 2003 respectivement). Cette dernière méthode, adaptée aux dosages dans les champagnes, a permis l'identification et la quantification de certains composés phénoliques présents dans l'extrait < 1 kDa (Tableau 15).

Le plus connu de ces composés phénoliques est le resvératrol (3,4',5'-trihydroxystilbène). Ce dernier (appartenant à la famille des phytoalexines) est produit par le raisin, généralement en réponse à un stress ou une blessure. Le resvératrol a montré de nombreux effets bénéfiques, tels que des propriétés anti-oxydantes, la modulation du métabolisme des lipides, l'inhibition de l'oxydation des LDL et de l'agrégation plaquettaire, ainsi que des propriétés anti-inflammatoires et anti-cancéreuses (Frémont 2000). En général, le resvératrol est plus présent dans les vins rouges (0,1-15 mg/L) que dans les vins blancs (*cis* + *trans* < 0,1 mg/L ; Frémont 2000). Dans l'extrait de champagne, le *trans*-resvératrol a été retrouvé à une concentration de 0,079 mg/L (extrait non concentré). Ces valeurs sont en accord avec celles retrouvées par Chamkha *et al.* (2003) qui ont observé la présence de ce composé dans le champagne à des concentrations allant de 0,08 à 0,16 mg/L suivant les cépages et les années.

Dans les vins blancs, la majorité des composés phénoliques sont des acides hydroxycinnamiques (Cheynier *et al.* 1998), c'est-à-dire, les acides caftarique, coutarique, fertarique, caféique, *p*-coumarique, férulique ainsi que le GRP et le 3,4,5,TMC représentés dans le Tableau 15. Cette tendance se retrouve aussi dans l'extrait, où près de 93 % des composés phénoliques appartiennent à cette famille. Cependant, par rapport à l'étude de Chamkha *et al.* (2003), ce pourcentage aurait dû être vraisemblablement plus faible si le tyrosol avait été dosé, car cet élément représente 29 à 47 % de la composition phénolique du champagne. Mais, globalement, la concentration de ces différents éléments respecte les variations observées par Chamkha *et al.* (2003) dans les champagnes ainsi que celles de Andrés-Lacueva *et al.* (2002) dans les cavas élaborés à partir de cépages chardonnay.

Les composés azotés représentent une part importante et variable des composés chimiques entrant dans la composition des vins. Pour Cordonnier (1966) et Feuillat (1974), l'amplitude des concentrations de cette fraction se situe entre 70 et 780 mg N/L, avec une valeur moyenne se situant aux environs de 350 mg N/L. Avant que l'échantillon de champagne ne soit

ultrafiltré, la quantité d'azote présente était de 275 mg N/L. En fin d'ultrafiltration, l'azote total retrouvé dans l'extrait < 1 kDa était de 246 mg N/L, soit près de 90 % de recouvrement. Les concentrations en composés azotés de l'extrait n'ont pas présenté de particularité spécifique et ont respecté les valeurs retrouvées dans les vins élaborés selon la méthode champenoise (Moreno-Arribas *et al.* 1996).

Les éléments minéraux dans le vin ont été classés en trois catégories : les éléments majeurs (potassium, sodium, calcium, magnésium, sulfates et chlorures), les oligo-éléments (fer, cuivre, zinc et manganèse) et les éléments traces. De manière générale, les concentrations en minéraux retrouvées dans l'extrait et présentées dans le Tableau 15 ont respecté les valeurs mentionnées par Cabanis & Flanzy (1998) dans les vins. Très récemment, Jos *et al.* (2004) ont publié les résultats d'analyse d'ions retrouvés dans les champagnes et les cavas. A l'exception du potassium (dont la concentration était quasiment 10 fois inférieure dans l'extrait non concentré), les résultats concernant les ions sont en accord avec ceux de Jos *et al.* (2004). Chez Moët & Chandon, l'une des étapes d'élaboration du champagne consiste à faire précipiter le bi-tartrate de potassium avant le tirage et la prise de mousse. Ce phénomène explique pourquoi les concentrations retrouvées en potassium sont si faibles dans l'extrait < 1 kDa non concentré.

Les concentrations en urée sont, en général, de l'ordre de 2 mg/L dans les champagnes, 3 mg/L étant le maximum (Charpentier, communication personnelle). La présence de ce composé à la concentration de 7,1 mg/L dans l'extrait non concentré est donc supérieur à ce qui est retrouvé habituellement. Cependant, le phénomène à l'origine de cet excès pourrait être le kit de dosage utilisé. En effet, bien qu'ayant une limite de détection fixée à 1 mg/L pour un coefficient de variation < 1 %, ce kit s'est avéré inefficace pour doser l'urée dans les échantillons de vin à de si faibles concentrations. Une certaine réserve est à émettre quant à la fiabilité de ce dosage.

En ce qui concerne les autres composés dosés, à savoir, l'acétaldéhyde, le glycérol et les glucides simples, leurs concentrations sont restées fidèles à celles retrouvées habituellement dans les champagnes.

L'éthanol n'a pu être détecté, mais le mode de préparation de l'extrait est à l'origine de ce phénomène, la concentration de l'échantillon à l'évaporateur rotatif ayant favorisé, entre autre, l'élimination de l'éthanol et la perte de nombreuses molécules volatiles.

Cependant, au regard de tous les composés dosés dans l'extrait, leur somme n'a pas été corrélée avec la quantité de matière sèche déterminée. La présence de composés « semi

volatiles » est vraisemblablement à l'origine de la minoration de l'extrait sec. Ainsi le tarissement de la fraction < 1 kDa à 120°C a permis l'évaporation, entre autre, de l'acétaldéhyde et de l'acide lactique (The Merck Index 2001).

Cet extrait de champagne était relativement complexe du point de vue de sa composition chimique. Les analyses ont montré la présence d'ions pouvant potentiellement affecter la tension artérielle (Ca^{++} , Mg^{++} , K^+ et Na^+ ; Kotchen *et al.* 1998). L'examen de cette fraction a aussi permis de mettre en évidence que les peptides étaient quantitativement plus représentés que les composés phénoliques (selon un ordre de grandeur de 27 pour 1, respectivement). Ces derniers, très étudiés dans les aliments, ont montré de nombreuses activités biologiques. La prépondérance des peptides dans l'extrait combinée aux résultats préliminaires obtenus avec les tests d'inhibition enzymatique pourrait contribuer à l'explication d'une activité biologique antihypertensive du champagne comme démontrée par la suite. Dans ce cas, l'élucidation du mécanisme impliqué dans l'effet biologique serait essentielle pour confirmer ou infirmer cette piste moléculaire.

3 EVALUATION DE L'EFFET ANTIHYPERTENSEUR IN VIVO

3.1 TESTS DE TOXICITE

La toxicité de l'extrait de champagne a été évaluée, dans un premier temps, sur 4 rats Wistar, avant le début des études sur l'évaluation de l'effet antihypertenseur in vivo. Après 2 jours de traitement, ils ont été sacrifiés et autopsiés. L'autopsie n'a rien révélé au niveau macroscopique sauf pour la partie de l'œsophage proche de l'estomac qui était plus jaune pour les traités que pour les témoins (de couleur plutôt rose pâle). Ce phénomène a été attribué à un reflux gastro-œsophagien potentiellement lié à l'acidité de la solution administrée. Cependant, les autopsies pratiquées après les manipulations à long terme n'ont pas permis de différencier les animaux traités des témoins lors de l'analyse macroscopique. Aucune lésion n'a été observée au niveau de l'appareil digestif (œsophage, estomac, duodénum, intestin), des poumons, du foie, des reins et de la rate. Toutefois, la présence de micro-stéatoses hépatiques a été détectée aussi bien chez les animaux témoins que chez les animaux traités (Figure 19). Dans ces conditions, la présence de ce type de dépôt graisseux a été reliée à une alimentation probablement trop riche mais aucunement à l'administration de l'extrait.

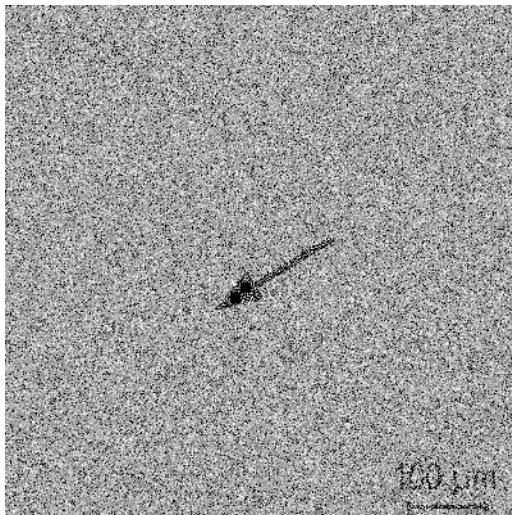


Figure 19. Coupe histologique du foie d'un rat. La flèche noire indique la présence de quelques micro-stéatoses, aussi bien chez les animaux témoins que chez les animaux traités. Coloration hématoxyline-éosine (G : x150).

3.2 ETUDE COMPORTEMENTALE

L'observation du comportement des animaux a été réalisée lors de la phase dite d'apprivoisement (3 semaines) ainsi que pendant les phases d'expérimentation (lors de l'administration à dose unique et lors de l'administration chronique de l'extrait). Parmi tous

les paramètres observés (agitation/déplacements, manipulation difficile, refus de boire et de manger, hérissément des poils, croissance, respiration et confinement), aucun effet négatif particulier n'a été noté. Mis à part une impatience plus prononcée à rester dans la cellule de contention pour les rats SHR par rapport aux rats WKY, le comportement des animaux est apparu assez satisfaisant, ceci traduisant leur bonne adaptation aux conditions environnementales et expérimentales, et l'absence d'effet toxique direct ou indirect de l'extrait de champagne à long terme.

3.3 ADMINISTRATION UNIQUE DE L'EXTRAIT DE CHAMPAGNE

Sur la Figure 20 sont représentés les résultats concernant la cinétique de l'effet anti-hypertenseur de l'extrait < 1 kDa de champagne chez le rat SHR uniquement.

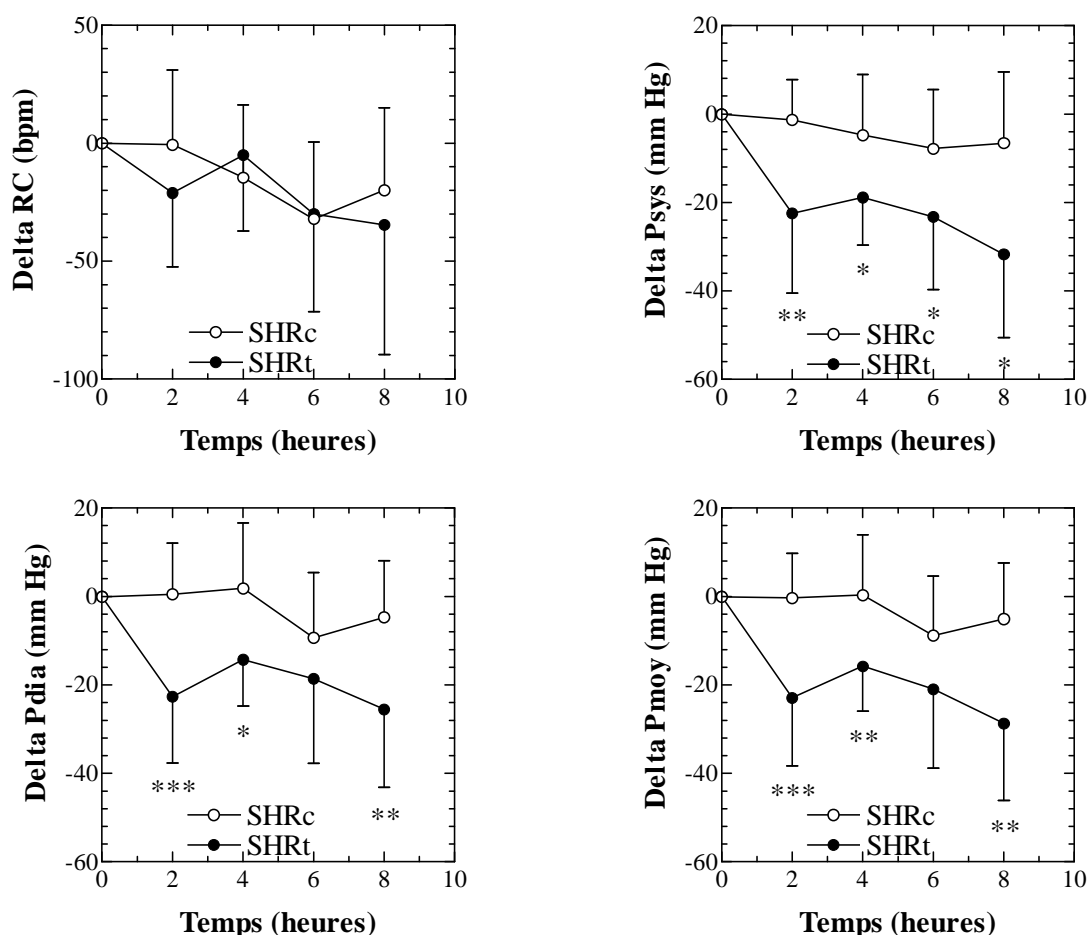


Figure 20. Cinétique de l'effet antihypertenseur chez le rat SHR après administration unique de l'extrait < 1 kDa (moyenne \pm écart type). Ces résultats sont la synthèse de 5 expériences indépendantes (13 rats par groupe d'expérience). RC : rythme cardiaque (en bpm, battements par minute) ; Delta Psys : variation de la pression systolique (en mm Hg, millimètre de mercure) ; Pdia : pression diastolique ; Pmoy : pression moyenne ; SHRt : groupe de rats hypertendus traités (6 mL/kg d'extrait de champagne) ; SHRC : groupe de rats hypertendus témoins (6 mL/kg d'eau).

A dose unique, l'extrait n'a pas induit de différence significative au niveau du rythme cardiaque entre les animaux témoins et les animaux traités. Par contre, l'extrait a permis de diminuer de façon significative la pression systolique de 21 mm Hg 2 heures après administration ($p < 0,01$). Cette diminution est restée maintenue tout au long de l'expérience pour atteindre 25 mm Hg 8 heures après administration ($p < 0,05$). De la même manière, les pressions diastolique et moyenne ont été diminuées significativement 2 heures après administration de l'extrait de champagne ($p < 0,001$). Il a été remarqué qu'à 6 heures, l'écart pour la pression moyenne n'était pas statistiquement significatif, néanmoins la valeur de p s'est montrée être à la limite de la significativité ($p = 0,0545$).

3.4 ADMINISTRATION CHRONIQUE DE L'EXTRAIT DE CHAMPAGNE

Au cours des 28 jours d'expérimentation, 7 paramètres ont été suivis :

↳ Tous les jours (Figure 21) :

- Poids des animaux,
- Consommation en aliments (granules),
- Consommation en eau.

↳ Tous les deux jours :

- Rythme cardiaque (Figure 22),
- Pression systolique (Figure 23),
- Pression diastolique (Figure 24),
- Pression moyenne (Figure 25).

3.4.1 Suivi quotidien

La Figure 21 montre la croissance pondérale des rats SHR et WKY au cours de l'expérimentation et leur consommation en aliment et en eau. Globalement, ce suivi quotidien ne montre pas de différence entre les animaux témoins et les traités. Ces paramètres sont une indication sur l'état de « bonne santé » des animaux au cours du traitement.

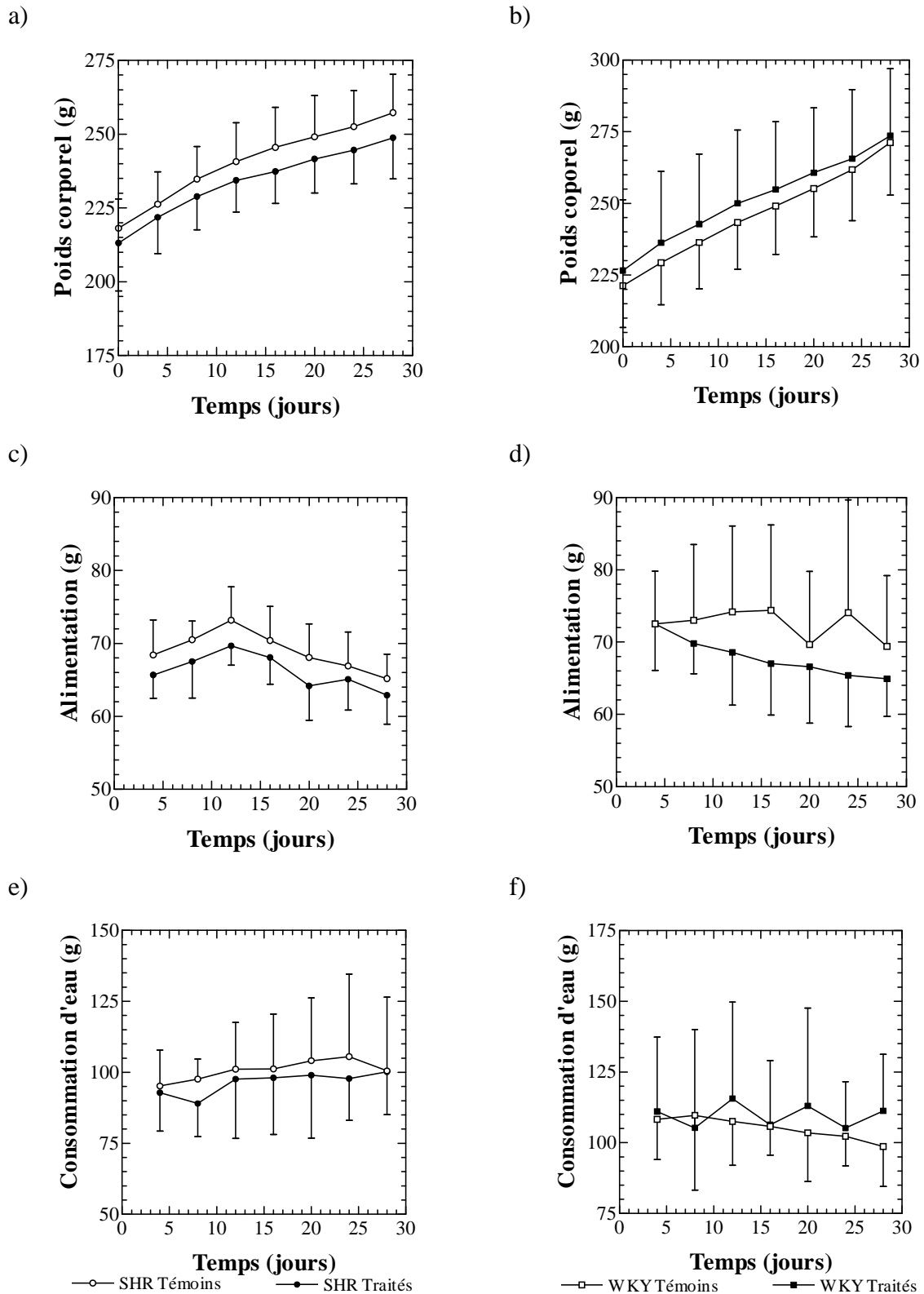


Figure 21. Suivi du poids des animaux (a et b), et de leur consommation en granules (c et d) et eau (e et f). Les résultats sont la représentation de la moyenne \pm l'écart type ; pour les rats SHR, $n = 20$; pour les rats WKY, $n = 14$.

3.4.2 Rythme cardiaque

Les courbes de suivi du rythme cardiaque au cours du traitement sont représentées sur la Figure 22. Mis à part deux points statistiquement significatifs à J₂₀ et J₂₈, le traitement n'a pas modifié le rythme cardiaque sur les 28 jours d'expérimentation, que ce soit chez les rats WKY ou SHR. Les différences observées à J₂₀ et J₂₈ semblent plus être le fruit d'un artéfact expérimental que d'un effet de l'extrait de champagne. Néanmoins, l'analyse des paramètres globaux a mis en évidence que le rythme cardiaque a tendance à diminuer au cours du temps pour les SHR traités (d'après l'analyse de la pente, $p < 0,01$). Cette hypothèse a été confirmée par les mesures d'écart entre les valeurs à J₀ et à J₂₈, où le rythme cardiaque des rats SHR Traités a diminué de 14,9 % après 28 jours de traitement alors qu'il n'a diminué que de 4,0 % pour les SHR Témoins (traités vs. témoins, $p < 0,05$). Il est alors possible de supposer qu'une séparation significative des courbes aurait pu apparaître si l'expérimentation avait été poursuivie. A l'inverse, les WKY ne montrent aucune différence significative dans tous les calculs de paramètres globaux. La chute du rythme cardiaque à J₂₈ correspond, là encore, à un artéfact de manipulation. Enfin, il est à noter que la dispersion des paramètres globaux était plus importante pour les WKY Témoins que pour les WKY Traités.

3.4.3 Pression systolique

La Figure 23 montre que la pression systolique augmente chez les SHR Témoins (+ 14 %) tout au long de l'expérimentation alors que chez SHR Traités, elle est maintenue à son niveau initial (+ 0,2 % ; traités vs. témoins, $p < 0,01$). Les courbes ont commencé à se séparer après 2 jours de traitement, mais la séparation n'est devenue statistiquement significative qu'à partir du 12^{ème} jour ($p < 0,05$). L'analyse des paramètres globaux concernant les rats SHR (traités vs. témoins) montre que la pente, la différence entre J₀ et J₂₈ et l'aire sous la courbe sont significativement différentes ($p < 0,001$, $p < 0,01$ et $p < 0,01$ respectivement) entre les animaux traités et témoins. Il n'apparaît pas de différence au niveau de la pression systolique avec les WKY. Le point « significatif » à J₂₈ concernant les WKY Traités n'a pas présenté plus d'intérêt car il était corrélé avec la diminution du rythme cardiaque des WKY Témoins ce même jour (Figure 19). De même que l'aire sous la courbe n'a pas montré de variation significative relative aux WKY.

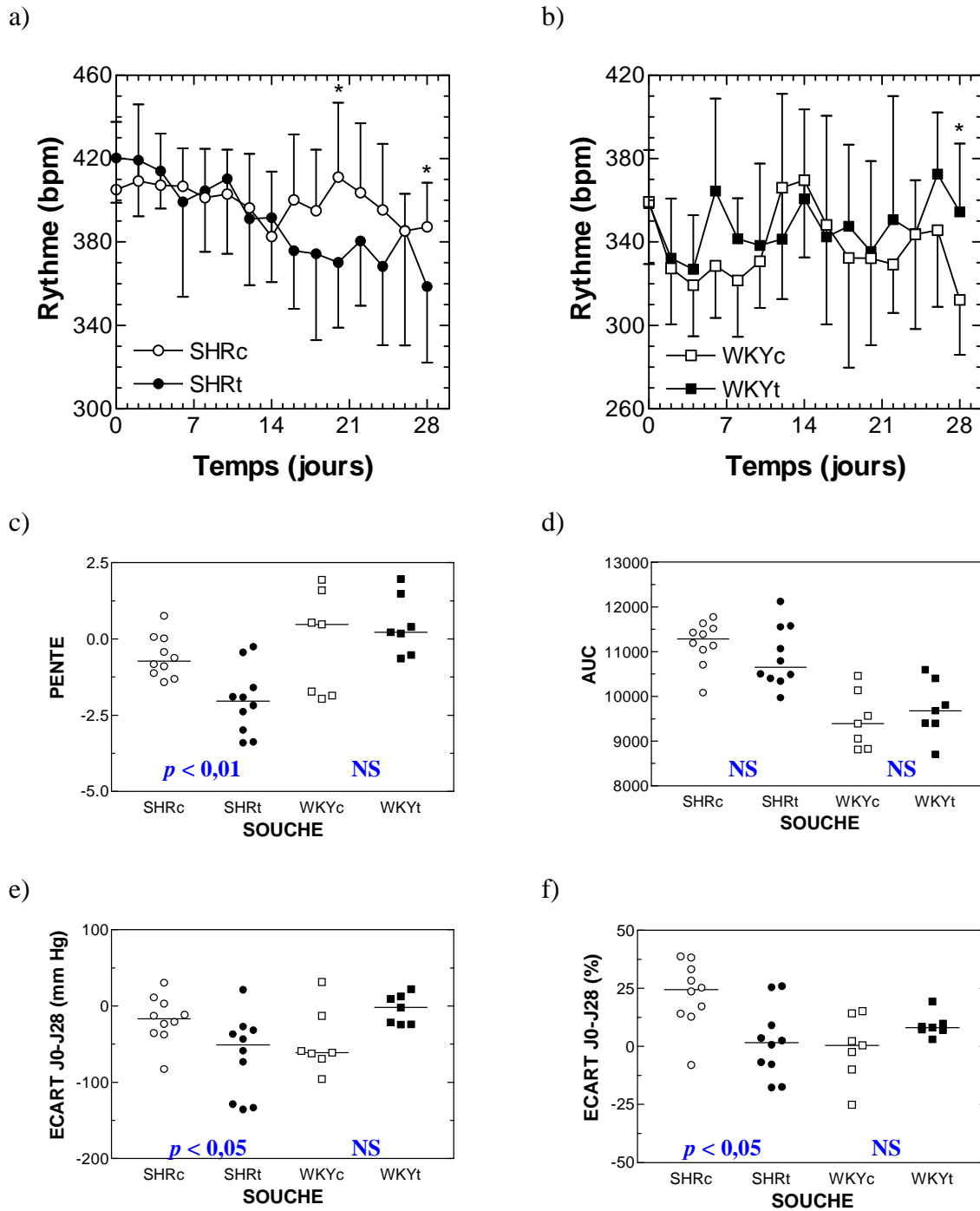
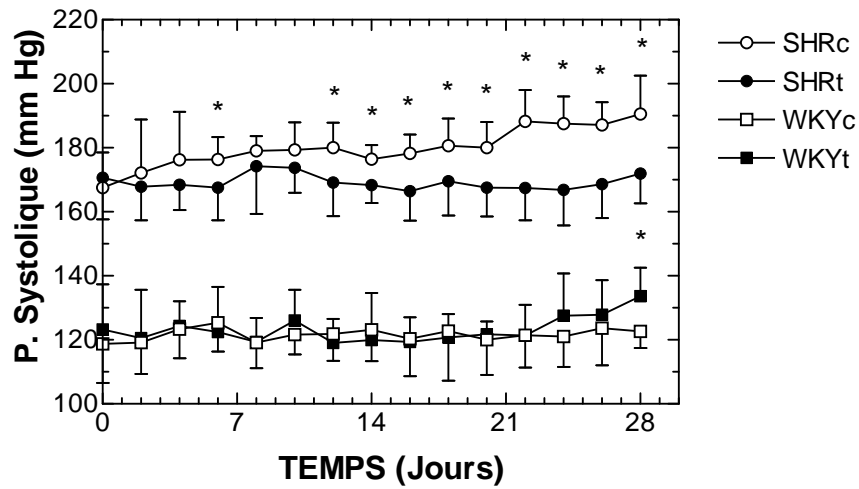
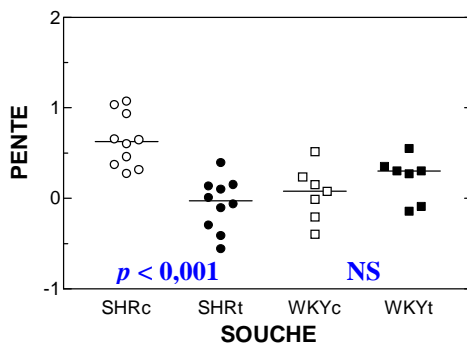


Figure 22. Variation du rythme cardiaque chez les rats SHR (a) et WKY (b) au cours de l'administration chronique de l'extrait de champagne. Représentation des paramètres globaux : Pente de la courbe effet en fonction du temps (c), Aire sous la courbe effet en fonction du temps (d) et Ecart entre J₀ et J₂₈ en bpm (e) et en pourcentage (f). SHRc, En **bleu**, degré de signification des différences entre animaux Témoins et Traités. SHRc, Rats hypertendus témoins ; SHRt, rats hypertendus traités ; WKYc, rats normotendus témoins ; WKYt, rats normotendus traités ; NS, non significatif ; bpm, battements par minute.

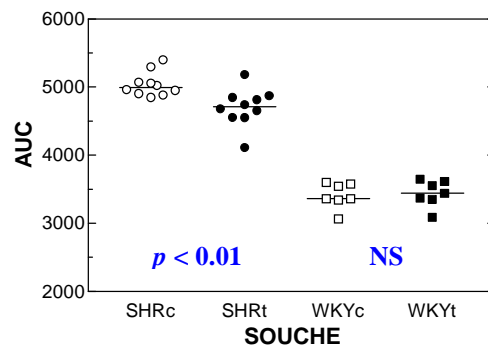
a)



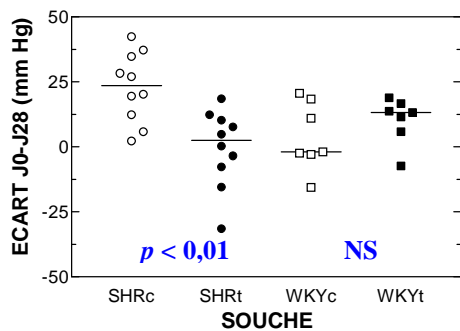
b)



c)



d)



e)

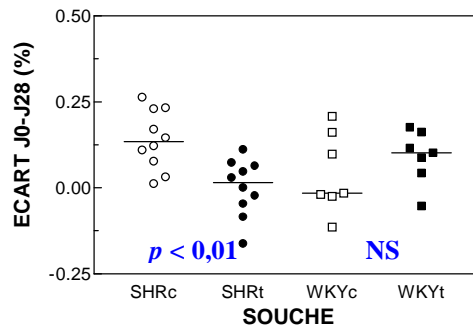


Figure 23. Variation de la pression systolique chez les rats SHR et WKY au cours de l'administration chronique de l'extrait de champagne (a). Représentation des paramètres globaux : Pente de la courbe effet en fonction du temps (b), Aire sous la courbe effet en fonction du temps (c) et Ecart entre J_0 et J_{28} en mm Hg (d) et en pourcentage (e). En **bleu**, degré de signification des différences entre animaux Témoins et Traités. SHRc, Rats hypertendus témoins ; SHRt, rats hypertendus traités ; WKYc, rats normotendus témoins ; WKYt, rats normotendus traités ; NS, non significatif.

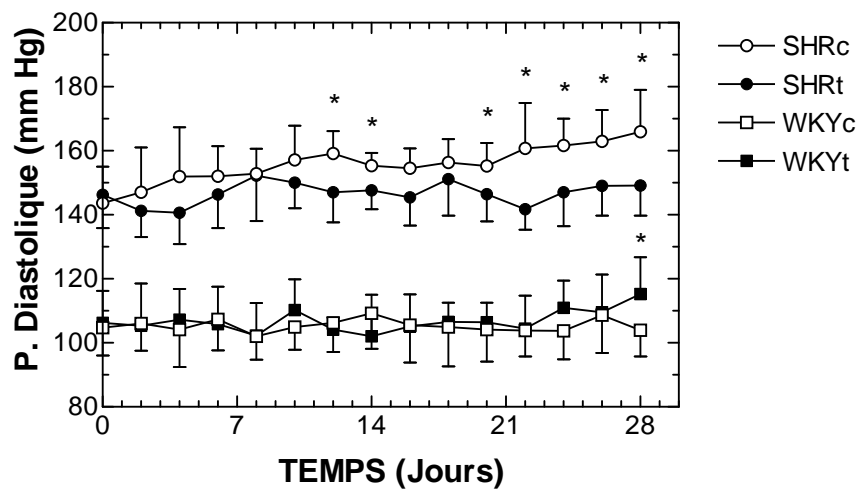
3.4.4 Pression diastolique

Les variations de la pression diastolique chez les rats SHR et WKY, au cours du traitement, sont présentées sur la Figure 24. Les différences entre SHR Témoins et SHR Traités sont significatives à J₁₂ et J₁₄ ($p < 0,01$ et $p < 0,05$), approchent de la significativité à J₁₆ ($p = 0,0695$) puis deviennent à nouveau significatives à partir de J₂₀ ($p < 0,05$) jusque J₂₈. Par comparaison, la pression diastolique et la pression systolique ont suivi une diminution en parallèle au cours de l'expérimentation. L'analyse des paramètres globaux concernant les rats SHR (traités vs. témoins) a montré que la pente, la différence entre J₀ et J₂₈ et l'aire sous la courbe étaient significativement différentes ($p < 0,01$, $p < 0,05$ et $p < 0,05$ respectivement). Néanmoins, la diminution du degré de significativité, moins prononcé au niveau de la pression diastolique, a été attribuée, pour partie, à la technique utilisée pour mesurer les variations de pression sanguine, qui a l'inconvénient d'être moins fiable pour les mesures de pression diastolique. Comme pour la pression systolique, les rats WKY n'ont pas montré de différence significative au niveau de la pression diastolique sauf pour le dernier point (J₂₈), mais là encore, ce phénomène a été corrélé avec la diminution du rythme cardiaque des WKY Témoins ce même jour.

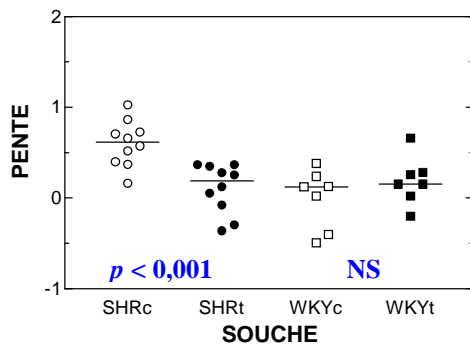
3.4.5 Pression moyenne

L'évolution de la pression moyenne est représentée sur la Figure 25. Cette courbe n'est cependant qu'indicative, car elle est dépendante de la pression systolique et de la pression diastolique. Les variations (pour les rats SHR) ont été les mêmes que celles de la Psys et de la Pdia. La significativité statistique apparaît à partir de J₁₂ ($p < 0,05$ puis $p < 0,001$ à partir de J₂₂). A J₁₈ ($p = 0,0889$) la perte de significativité a été imputée à la variation de pression diastolique mesurée ce jour là par l'appareil. L'analyse des paramètres globaux concernant les rats SHR (traités vs. témoins) a montré que la pente, la différence entre J₀ et J₂₈ et l'aire sous la courbe étaient significativement différentes ($p < 0,001$, $p < 0,01$ et $p < 0,01$ respectivement).

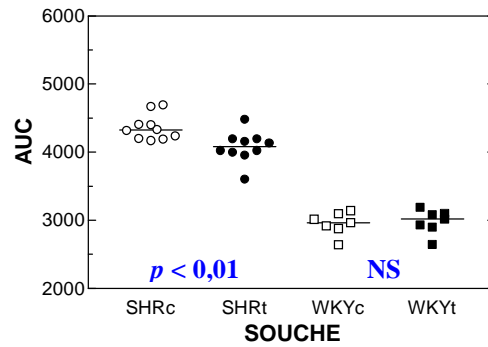
a)



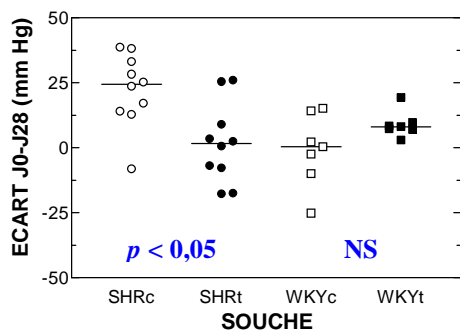
b)



c)



d)



e)

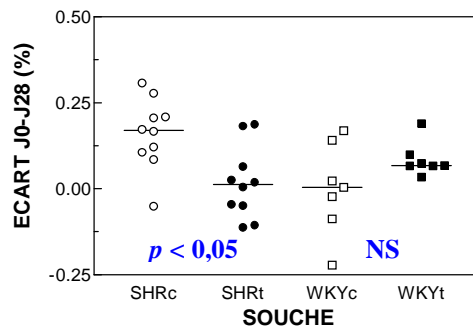
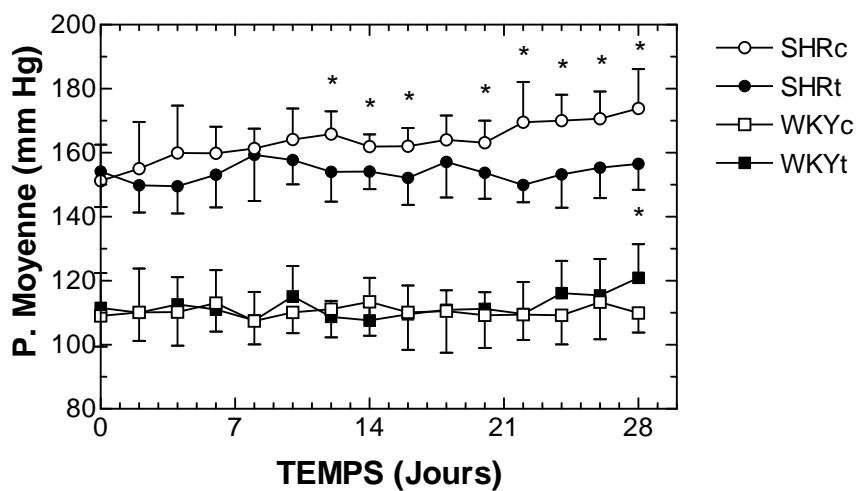
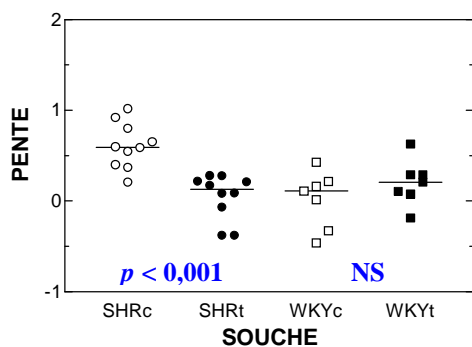


Figure 24. Variation de la pression diastolique chez les rats SHR et WKY au cours de l'administration chronique de l'extrait de champagne (a). Représentation des paramètres globaux : Pente de la courbe effet en fonction du temps (b), Aire sous la courbe effet en fonction du temps (c) et Ecart entre J₀ et J₂₈ en mm Hg (d) et en pourcentage (e). En **bleu**, degré de signification des différences entre animaux Témoins et Traités. SHRc, Rats hypertendus témoins ; SHRt, rats hypertendus traités ; WKYc, rats normotendus témoins ; WKYt, rats normotendus traités ; NS, non significatif.

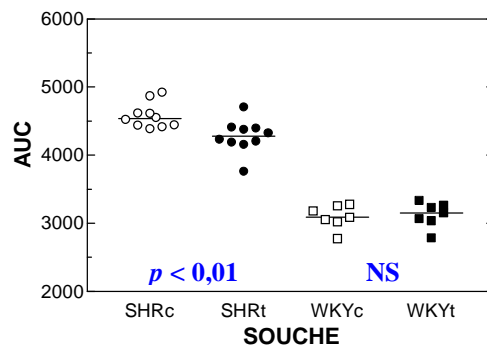
a)



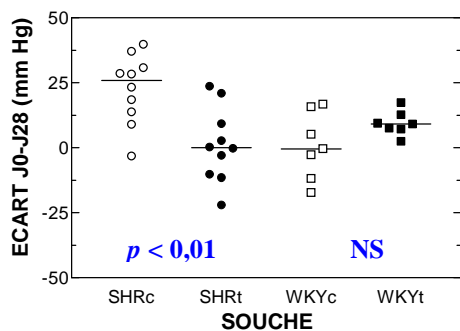
b)



c)



d)



e)

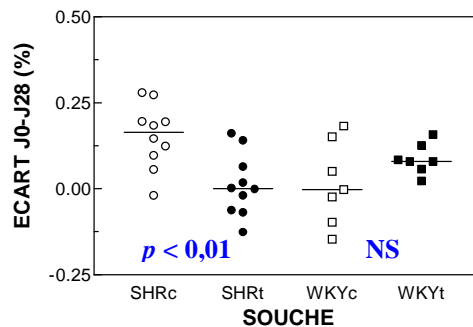


Figure 25. Variation de la pression moyenne chez les rats SHR et WKY au cours de l'administration chronique de l'extrait de champagne (a). Représentation des paramètres globaux : Pente de la courbe effet en fonction du temps (b), Aire sous la courbe effet en fonction du temps (c) et Ecart entre J_0 et J_{28} en mm Hg (d) et en pourcentage (e). En **bleu**, degré de signification des différences entre animaux Témoins et Traités. SHRc, Rats hypertendus témoins ; SHRt, rats hypertendus traités ; WKYc, rats normotendus témoins ; WKYt, rats normotendus traités ; NS, non significatif.

3.5 RECHERCHE DU MECANISME IMPLIQUE DANS L'EFFET ANTI-HYPERTENSEUR

3.5.1 Dosage des ions et métaux dans le sérum

Sur le Tableau 16 sont représentées les concentrations plasmatiques en ions et métaux déterminées chez les rats SHR et WKY après 28 jours de traitement. L'analyse statistique (test U de Mann-Whitney : approche non paramétrique et non appariée) des résultats n'a pas montré de différence significative entre les rats témoins et les rats traités pour chaque souche considérée. Néanmoins, les variations des concentrations en sodium et calcium observées, sont en faveur d'une diminution de la tension artérielle, avec, pour le calcium, une valeur de p à la limite de la significativité ($p = 0,0571$). Le faible nombre d'animaux (notamment pour les SHR, $n = 4$) est venu du fait qu'il a fallu écarter les prélèvements hémolysés. L'hémolyse, phénomène correspondant à l'éclatement des globules rouges, libère des ions supplémentaires dans le sérum et/ou plasma et peut donc entacher les résultats d'erreurs importantes. Les tests statistiques pour comparer les différences entre les souches SHR et WKY n'ont pas été réalisés, car cela ne correspondait pas aux objectifs poursuivis.

Il a été remarqué que le cuivre, un inhibiteur de l'enzyme de conversion, se trouvait en concentration plus importante dans le plasma des rats SHR par rapport aux rats WKY.

Tableau 16. Effet de l'administration chronique de l'extrait de champagne < 1 kDa sur les concentrations plasmatiques en ions et métaux (moyenne \pm écart type).

	WKY Témoins†	WKY Traités†	SHR Témoins†	SHR Traités†
Ions (mg/L)				
Na ⁺	3209,4 \pm 26,2	3185,7 \pm 22,5	3200,2 \pm 29,9	3184,1 \pm 26,7
K ⁺	145,5 \pm 4,7	144,3 \pm 13,7	138,3 \pm 11,7	141,5 \pm 12,1
Cl ⁻	3625,1 \pm 34,0	3598,5 \pm 53,9	3651,7 \pm 50,0	3640,0 \pm 73,7
Ca ²⁺	94,88 \pm 2,38	94,93 \pm 2,12	95,08 \pm 0,43	99,15 \pm 2,97
Mg ²⁺	21,36 \pm 2,09	19,62 \pm 1,62	18,05 \pm 0,37	19,88 \pm 2,98
I [*]	64,20 \pm 3,90	61,00 \pm 5,22	74,00 \pm 14,45	74,25 \pm 12,28
Métaux (mg/L)				
Fe ²⁺	2,41 \pm 0,42	2,43 \pm 0,75	2,09 \pm 0,20	2,62 \pm 0,57
Mn ^{2+*}	3,72 \pm 1,16	3,78 \pm 0,48	4,48 \pm 0,82	4,65 \pm 0,89
Cu ²⁺	0,78 \pm 0,08	0,82 \pm 0,06	1,10 \pm 0,06	1,10 \pm 0,01
Zn ²⁺	1,36 \pm 0,15	1,31 \pm 0,23	1,26 \pm 0,13	1,27 \pm 0,09
Se ²⁺	0,41 \pm 0,05	0,38 \pm 0,07	0,43 \pm 0,03	0,45 \pm 0,01

* Les valeurs sont exprimées en $\mu\text{g/l}$.

† WKY Témoins, $n = 5$; WKY Traités, $n = 6$; SHR Témoins et SHR Traités, $n = 4$.

3.5.2 Détermination de l'activité rénine plasmatique et activité de l'ECA

La présence d'une activité rénine plasmatique a été recherchée dans le sérum des rats SHR et WKY après 28 jours de traitement (Figure 26). Les tests n'ont pas montré de variation statistiquement significative entre les témoins et les traités.

La Figure 25 montre l'activité de ECA retrouvée dans le sérum des rats SHR et WKY après 28 jours de traitement. Là encore il n'y a pas de variation statistiquement significative entre les témoins et les traités. Il a juste été observé une diminution minimale de l'activité ECA chez les SHR en faveur de l'effet antihypertenseur.

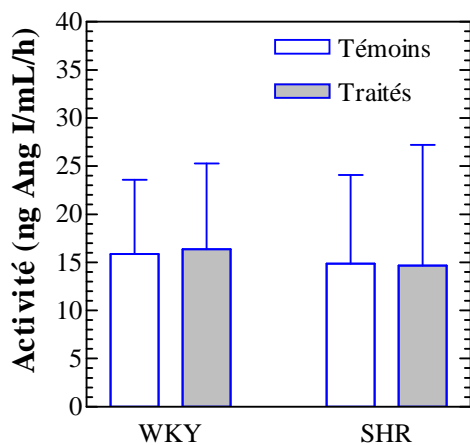


Figure 26. Mesure de l'activité rénine plasmatique après 28 jours de traitement avec l'extrait de champagne (activité exprimée en nanogramme d'angiotensine I [Ang I] hydrolysée par mL et par heure) (moyenne \pm écart type).

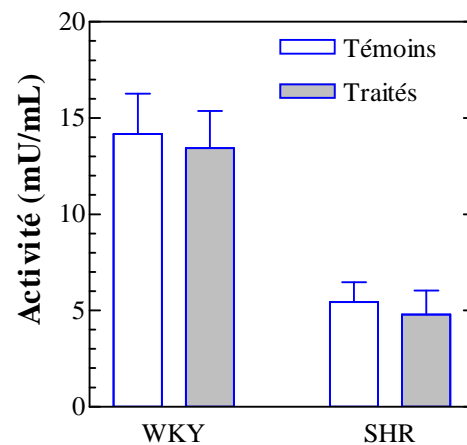


Figure 27. Mesure de l'activité de l'ECA sérique après 28 jours de traitement avec l'extrait de champagne. Activité exprimée en mU/mL (une unité d'activité de l'ECA est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à la formation d'1 μ M d'acide hippurique par minute et à 37°C) (moyenne \pm écart type).

3.5.3 Dosage du monoxyde d'azote et de la Big Endothéline-1

Le dosage des concentrations sériques de monoxyde d'azote (Figure 28) n'a pas montré de différences significatives entre les animaux témoins et les animaux traités. Cependant, la légère augmentation relevée chez les animaux traités est en faveur d'une diminution de la pression sanguine.

Concernant le dosage de la Big Endothéline-1, la Figure 29 montre une diminution non négligeable (-40 %) de la concentration de Big Endothéline-1 plasmatique chez les rats SHR traités par rapport aux SHR témoins. Cette baisse s'est aussi retrouvée chez les rats WKY, mais d'intensité plus faible (-30 %) et non significative. Cette diminution de la concentration

en précurseur de l'endothéline-1 pourrait influencer la baisse de la pression artérielle observée chez les SHR traités (Figures 23, 24 et 25). Cependant, les tests statistiques n'ont pas pu être réalisés sur ces dosages à cause du faible nombre d'échantillons (SHR Témoins, $n = 2$; SHR Traités, $n = 3$; WKY Témoins, $n = 4$; WKY Traités, $n = 3$).

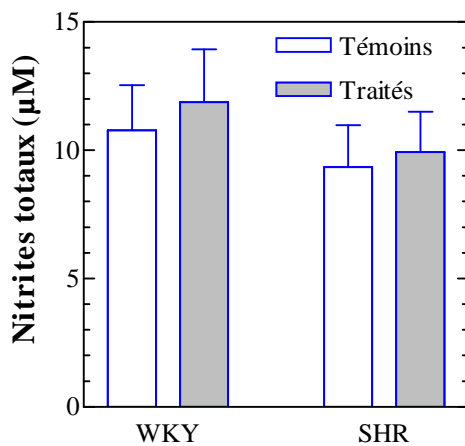


Figure 28. Concentrations sériques en nitrites retrouvées après 28 jours de traitement avec l'extrait de champagne (moyenne \pm écart type).

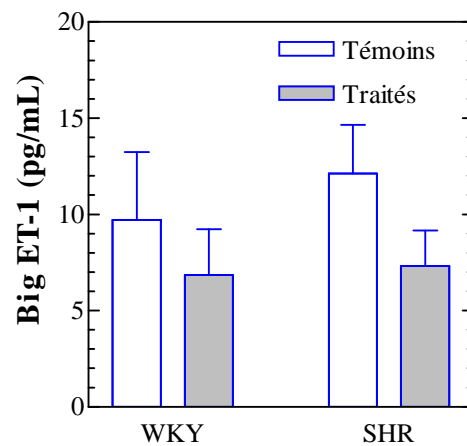


Figure 29. Concentrations sériques de Big Endothéline-1 après 28 jours de traitement avec l'extrait de champagne (moyenne \pm écart type).

3.5.4 Dosage de la protéine C-réactive

Le dosage de la protéine C-réactive (CRP) n'a pas donné de résultats cohérents. Malgré la forte homologie qui existe entre la CRP de Rat et la CRP humaine (Taylor *et al.* 1984), la technique de dosage adaptée à l'Homme, n'a pas permis de quantifier la concentration de CRP chez le Rat.

3.6 DISCUSSION

Ce travail a eu pour but d'étudier l'effet sur la pression artérielle de l'administration chronique d'un extrait de champagne chez le rat spontanément hypertendu (SHR) et chez le rat normotendu (WKY). Préalablement à cette étude, un test de tolérance à cet extrait a été réalisé sur des rats Wistar. Aucun effet négatif sur la croissance, l'alimentation, le comportement et l'activité (l'état pileux, la dilatation des pupilles, une respiration inhabituelle) des animaux n'a été noté lors des études à court et à long terme. De plus, les examens macroscopiques réalisés après sacrifice en fin d'expérience n'ont pas révélé la présence de lésions parmi les différents organes observés (œsophage, estomac, duodénum,

foie, reins, rate et poumons). De ce fait, à la lumière de ces résultats préliminaires, la dose d'extrait de champagne choisie a été considérée comme étant appropriée pour l'expérimentation à long terme.

Ces premiers résultats ont été confirmés, par la suite, avec les examens histologiques réalisés sur ces mêmes organes à la fin de l'expérimentation. Le choix de ces organes pour l'analyse histologique a été basé sur le fait qu'ils sont principalement impliqués dans les phases de résorption et d'élimination des xénobiotiques. Ainsi, aucun signe de toxicité (nécrose, prolifération cellulaire, infiltration lymphocytaire ou hémorragie) n'a été observé sur la plupart des organes étudiés. Néanmoins, la présence de micro-stéatoses (traduisant une accumulation de triacylglycérols) a été remarquée dans le foie de tous les animaux. Ces résultats n'ont donc pas été associés à l'administration de l'extrait mais plutôt au régime alimentaire des animaux à l'animalerie. L'alimentation des animaux, ainsi que leur consommation en eau n'ont pas été modifiées parmi les différents groupes. Il en a été de même concernant leur croissance. Ces résultats tendent à montrer que l'administration répétée de l'extrait n'a pas eu d'effet délétère évident sur la physiologie et le métabolisme des animaux.

Le suivi comportemental des animaux a été important, car certaines attitudes auraient pu traduire la présence de bouleversements physiologiques capables de modifier les données expérimentales. Le travail sur matériel animal est loin d'être le plus facile à réaliser, car ce matériel vivant est à notre image, tantôt il sera discipliné et soumis, tantôt il aura des sautes d'humeur et par conséquent, sera plus difficile à manipuler. C'est pour cela, que la phase préliminaire d'apprivoisement est toujours nécessaire pour que les animaux s'acclimatent à leur nouvel environnement, aux conditions de manipulation ainsi qu'aux expérimentateurs dans le souci d'obtenir une homogénéité dans les réponses de l'animal, réponses qui peuvent être influencées par des facteurs génétiques, le milieu environnant, la pathologie, l'âge, le sexe, les voies d'administration et les variations chronobiologiques (Stepien *et al.* 1993).

La stabulation des animaux dans une pièce sans bruit et au calme a permis de limiter tout sursaut de la réponse tensionnelle à un stress acoustique inopiné (Glowa *et al.* 1994) et de limiter toute aggravation de l'état des rats hypertendus *via* le stress que pourraient apporter certains bruits quotidiens (Herrmann *et al.* 1994). Les animaux, en conditions expérimentales (sans traitement dans un premier temps puis avec traitement par la suite), se sont relativement bien adaptés aux conditions du milieu telles que la température, l'humidité, les changements d'air, les bruits, les habitudes des animaliers et des manipulateurs et les phéromones d'origine

animales ou humaines (substances sécrétées par les animaux qui, lorsqu'elles sont détectées, peuvent déclencher une réponse chez l'animal). Cette phase d'acclimatation avait pour but de mieux connaître/comprendre le comportement des animaux. D'ailleurs, au cours de cette phase d'appriivoisement et lors de l'expérimentation, les SHR ont régulièrement montré certaines difficultés d'apprentissage lorsqu'il leur fallait rester immobile plus de 5-10 minutes dans la cellule de contention. Comme l'ont constaté Hunziker *et al.* (1996), la réponse comportementale des rats SHR est plus variable que celle des rats WKY, quelle que soit la nature de l'environnement. Les rats WKY, plus sages et plus appliqués, se sont adaptés très rapidement aux conditions de mesure en cellule de contention sous chauffage à 38-40°C. Leurs réponses physiologiques (tension artérielle et rythme cardiaque) et comportementales (sérénité) lors des mesures sont restées homogènes tout au long de l'expérimentation. A l'inverse, les rats SHR, une fois dans la cellule de contention, s'énervaient assez rapidement dès l'instant qu'ils y restaient plus de 7-8 minutes. Cet état d'excitation, se traduisant par des petits mouvements de queue et de tête au début puis, au cours du temps par des débattements, a ainsi perturbé, voire empêché toute mesure de tension certains jours. Parfois même, certains SHR n'ont pas montré cette même patience et étaient excités avant même de rentrer dans la cellule de contention. Par ailleurs, il a été noté que le temps de vasodilatation provoqué par l'hyperthermie était plus long et de moindre amplitude chez les rats SHR que chez les rats WKY (O'Leary *et al.* 1994), ce qui a renforcé les contraintes de mesures de tension chez les rats SHR.

La première étude *in vivo* consistait à observer la tension artérielle chez les rats SHR après administration unique de l'extrait < 1 kDa. Un effet antihypertenseur significatif au niveau des pressions systolique, diastolique et moyenne a été observé après administration aiguë. Il est apparu 2 heures après administration orale et a été maintenu tout au long de l'expérience (8 heures). Le retour à la normale des différentes pressions n'a été observé que 48 heures après l'administration unique. Ce retour tardif de la pression artérielle à la normale a aussi été remarqué par Saito *et al.* (1994b) avec deux peptides (Ile-Tyr-Pro-Arg-Tyr et Arg-Tyr) dont l'effet était encore significatif 30 heures après administration orale. L'effet durable de l'extrait de champagne, demande toutefois à être confirmé, car il n'y a pas eu suffisamment de mesures réalisées pour effectuer les tests statistiques. Néanmoins, si ces résultats sur 48 heures étaient confirmés, l'extrait montrerait alors un effet plus long que la plupart des médicaments antihypertenseurs actuellement sur le marché.

La diminution de la pression systolique, de l'ordre de 22,4 mm Hg 2 heures après administration ($p < 0,01$ vs. t_0), est loin d'être négligeable, car elle représente une chute de la pression de l'ordre de 15 % par rapport à la normale chez cette souche de rat SHR. Cet effet de l'administration unique de l'extrait de champagne sur la diminution de la tension artérielle (-22,4 mm Hg après 2 heures) est supérieur à celui observé par Saito *et al.* (1994a) avec le saké (-21 mm Hg après 4 heures) qui utilisait une dose d'extrait plus importante. Par rapport à la bibliographie existante, cette diminution est non seulement équivalente à celle retrouvée par Saito *et al.* (1994a) avec la fraction peptidique du saké (-22 mm Hg), mais elle est aussi supérieure à celle de certains hydrolysats alimentaires (Tableau 1 et 5, Chapitre I). L'extrait a montré un effet significatif assez rapidement (2 heures après administration orale) comparé à la plupart des autres hydrolysats. Peu d'auteurs ont montré une action aussi rapide voire plus rapide. Un hydrolysat pepsique d'algues a montré un effet significatif 1 heure après administration orale (Suetsuna 1998a). De même, un hydrolysat de gelée royale d'abeille et un autre de muscles de poulet ont montré un effet significatif 2 heures après administration orale (Mastui *et al.* 2002 ; Saiga *et al.* 2003). A chaque fois, ces hydrolysats ont provoqué une diminution de la pression systolique supérieure à celle conférée par l'extrait de champagne (-53 ; -22,7 et -45 mm Hg respectivement ; Tableau 1 et 5, Chapitre I). Les autres extraits ayant montré des effets plus précoces étaient plutôt administrés soit en i.p. soit en i.v.

Cette première expérience a démontré l'action rapide et importante de l'extrait de champagne pour diminuer l'état d'hypertension des rats SHR. Ainsi, il dispose d'une action aussi rapide et plus longue que celle du captopril, médicament de référence en thérapeutique clinique (-10 mm Hg après 2 heures pour 2,5 mg/kg p.o. ; Fujita & Yoshikawa 1999 et -16 mm Hg après 3 heures pour 1 mg/kg p.o. ; Sato *et al.* 2002b).

Au cours de l'administration chronique de l'extrait < 1 kDa de champagne, le rythme cardiaque est resté essentiellement inchangé. Il n'a pas été observé de modification significative au cours de l'expérimentation, aussi bien chez les rats SHR que chez les rats WKY (Figure 22a,b). La variation du rythme cardiaque a été un paramètre difficilement contrôlable, dépendant de l'humeur et de l'état de stress de l'animal, du bruit environnant voire même des variations météorologiques (surtout les bruits engendrés par l'orage, le vent et/ou la pluie) et ceci peut expliquer la grande variabilité de certaines mesures obtenues. La fréquence cardiaque, mesurée tous les 2 jours, a montré une forte variabilité des mesures chez les animaux quelle que soit la souche considérée. De ce fait, certaines valeurs extrêmes, potentiellement aberrantes, ont peut-être été à l'origine de résultats conflictuels au niveau des

paramètres globaux. Néanmoins, au regard de la courbe des rats SHR Traités, il semblerait que le rythme cardiaque ait tendance à diminuer au cours du traitement. Cette affirmation semble validée par trois des quatre paramètres globaux calculés (Figure 22*c,e,f*; pente de la courbe effet en fonction du temps, et les différences entre J_0 et J_{28}). Combinés avec l'effet de diminution de la tension artérielle par l'extrait (Figures 23-25), ces résultats pourraient s'expliquer par l'inhibition de l'ECA in vivo. En effet, l'angiotensine II (activateur du système nerveux sympathique) a aussi pour rôle d'augmenter la fréquence cardiaque et d'induire une vasoconstriction (Tsuda *et al.* 1987 ; paragraphe 5.2, Chapitre I). L'inhibition de l'ECA pourrait donc contribuer à cette baisse du rythme cardiaque chez les rats SHR Traités comme ont pu le remarquer Fuglsang *et al.* (2002). Ces résultats, quelque peu antagonistes concernant les paramètres pharmacodynamiques, semblent indiquer que l'extrait de champagne pourrait quand même avoir un effet minime sur le rythme cardiaque.

A l'inverse, l'administration chronique de l'extrait de champagne a provoqué une diminution significative des pressions systolique, diastolique et moyenne chez les rats SHR Traités comparés aux rats SHR Témoins. Cette diminution, qui devient significative au bout de 12 jours de traitement, a été de plus en plus prononcée au cours du temps. Les pressions systolique, diastolique et moyenne des animaux traités ont ainsi diminué de 18,6 ; 16,7 et 17,3 mm Hg en fin d'expérience, respectivement, par rapport aux témoins. Ces résultats positifs obtenus sur les pressions sanguines ont été confirmés par l'étude des paramètres pharmacodynamiques globaux (pente de la courbe effet en fonction du temps et aire sous la courbe effet en fonction du temps) qui ont montré des variations significatives entre les animaux témoins et les animaux traités (Figures 23*b-e*, 24*b-e* et 25*b-e*). En revanche, aucun des indicateurs pharmacodynamiques n'a été modifié par le traitement chez les animaux normotendus WKY (Figures 23*b-e*, 24*b-e* et 25*b-e*). Cette absence d'effet chez les rats normotendus suggère que l'extrait de champagne possède un effet antihypertenseur plutôt qu'un effet hypotenseur.

L'effet antihypertenseur, devenu significatif à compter du 12^{ème} jour de traitement, a été maintenu jusqu'à la fin de l'expérimentation. En tant que tel, l'absence de significativité aux jours J_{16} et J_{18} pour la pression diastolique et à J_{18} pour la pression moyenne est expliquée par différents artéfacts expérimentaux. Comme rapporté par le « Committee on Care and use of SHR », cette méthode de mesure indirecte de la tension artérielle au niveau de la queue des rats est légèrement moins fiable pour les mesures de pression diastolique, ce qui pourrait ainsi expliquer la variabilité des mesures observées au cours de l'expérimentation. De la même manière, la pression moyenne (Pmoy) a été calculée à partir des pressions systolique (Psys) et

diastolique (Pdia)(paragraphe 3.3, Chapitre II). Ces observations indiquent que la pression moyenne était largement dépendante de la mesure de la diastolique. De plus, cette variabilité des mesures pourrait expliquer l'absence d'effet significatif aux jours J₁₆ et J₁₈ pour la pression diastolique et à J₁₈ pour la pression moyenne malgré des valeurs de p très proches du seuil de significativité ($p = 0,0695$ et $p = 0,0889$ respectivement). La rapidité d'action de l'extrait (significatif à partir du 12^{ème} jour de traitement) est comparable à celle obtenue avec les hydrolysats de saké (J₁₀, Saito *et al.* 1994a), de bonite (J₇ avec la plus forte concentration administrée, Fujita *et al.* 1995) et les protéines de soja (entre J₆ et J₁₂ en fonction de la concentration, Wu & Ding 2001).

Les concentrations de calcium, potassium, sodium et magnésium sont connues pour influencer la pression artérielle, et l'apport exogène de ces composés pourrait donc jouer un rôle dans l'effet antihypertenseur (Kotchen & McCarron 1998 ; Touyz & Milne 1999 ; Vaskonen 2003). Les résultats présentés dans le Tableau 14 ont montré que le contenu plasmatique en ions était similaire entre les animaux témoins et les animaux traités, excepté pour le calcium, pour lequel la concentration était légèrement plus élevée pour le groupe des rats SHR recevant l'extrait de champagne par rapport aux rats SHR Témoins (augmentation de 4,1 mg/L, $p = 0,0571$). Mais, de manière générale, les variations en éléments minéraux ont respecté les concentrations plasmatiques retrouvées chez ces animaux (Leblondel & Allain 1988).

L'apport en calcium a été reconnu comme pouvant diminuer la pression sanguine de rats hypertendus et normotendus. Son action peut se faire *via* différents mécanismes physiologiques tels que la perméabilité membranaire et intracellulaire ou la modulation du système nerveux sympathique (Vaskonen 2003). Bien que non significative, cette variation a peut-être pu contribuer à l'effet antihypertenseur observé sur les Figures 23-25. De la même manière, les variations de concentration de certains minéraux (sodium, magnésium et potassium) ont montré une légère tendance en faveur d'un effet antihypertenseur mais dans une moindre mesure par rapport aux variations du calcium plasmatique.

Concernant les oligoéléments, le cuivre et le zinc sont aussi connus pour être impliqués dans la régulation de la tension artérielle *via* l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (Loyke 1991). Cependant, les résultats n'ont pas montré de variation des concentrations de cuivre et de zinc dans le plasma entre les animaux témoins et les animaux traités. De la même manière, il n'a pas été remarqué de variation dans les concentrations de

sélénium, oligoélément connu pour son implication dans certaines maladies cardiovasculaires (Berthelot *et al.* 1987).

L'extrait de champagne ayant montré un effet antihypertenseur, il était important de rechercher par quel mécanisme cet effet pouvait être expliqué. De nombreuses études ont été réalisées sur l'effet d'un traitement à long terme avec un extrait alimentaire afin d'atténuer ou de prévenir le développement de l'hypertension chez le rat (Furushiro *et al.* 1990 ; Murakami *et al.* 1994 ; Saito *et al.* 1994a ; Fujita *et al.* 1995 ; Wu & Ding 2001 ; Yoshii *et al.* 2001 ; Sipola *et al.* 2001, 2002). Certains de ces auteurs ont proposé que l'effet antihypertenseur, apparaissant après ou au cours du traitement, pouvait provenir de l'inhibition de l'ECA dans l'organisme (Murakami *et al.* 1994 ; Yoshii *et al.* 2001 ; Sipola *et al.* 2002). Dans cette étude, les résultats ont montré une faible diminution (mais non significative) de l'activité de l'ECA sérique chez les animaux traités après 28 jours de traitement. Ces résultats sont en accord avec ceux de Wu & Ding (2001) dont l'étude de l'effet physiologique de l'administration chronique d'un extrait de soja sur des rats SHR, n'a pas modifié significativement l'activité de l'ECA sérique.

L'inhibition de l'ECA conduit à une diminution de la production d'angiotensine II et favorise l'augmentation du taux de rénine plasmatique (Brunner *et al.* 1993). Cependant, le taux de rénine plasmatique étant resté similaire entre les différents groupes d'animaux, cela suggère que l'effet antihypertenseur de l'extrait de champagne peut être médié *via* un autre système que celui de l'inhibition de l'ECA seul.

Cependant, à défaut d'avoir un effet significatif sur l'inhibition de l'activité de l'ECA sérique, certains auteurs ont remarqué que cette inhibition pouvait être plus prononcée, voire significative, pour les dosages réalisés au niveau de l'aorte (Murakami *et al.* 1994 ; Wu & Ding 2001 ; Shin *et al.* 2001). Il serait donc intéressant de refaire ces dosages sur des prélèvements sanguins réalisés au niveau de l'aorte plutôt qu'au niveau de la carotide.

Les recherches sur les peptides disposant de propriétés antihypertensives ont conduit Fujita *et al.* (1995) à isoler et caractériser un peptide agoniste du récepteur B₁ de la bradykinine, l'ovokinine. Alors que la plupart des peptides antihypertenseurs issus de produits alimentaires sont connus pour leur faculté à agir *via* l'inhibition de l'ECA, le fragment ovokinine (2-7) a été le premier peptide à montrer des propriétés vasorelaxantes alors qu'il était exempt de toute activité inhibitrice de l'ECA (Matoba *et al.* 1999). Il a principalement exercé son action en stimulant la libération de monoxyde d'azote au niveau des cellules endothéliales. De ce fait, il est possible que l'effet antihypertenseur ne soit pas seulement la

conséquence de l'inhibition de l'ECA mais pourrait aussi correspondre à une amélioration du fonctionnement du système endothélial.

D'autres molécules telles que le monoxyde d'azote ou l'endothéline sont connues pour être en cause ou en relation avec le développement de l'hypertension si jamais leur système de régulation est déficient (Das 2001). Le monoxyde d'azote (NO) est un des régulateurs cardiovasculaires les plus importants. Il est synthétisé par les cellules endothéliales à partir de la L-arginine *via* l'action de la NO-synthétase et induit une vasodilatation (Marin & Rodriguez-Martinez 1997). L'endothéline-1, à l'inverse, est un puissant peptide vasoconstricteur produit par l'endothélium dans les vaisseaux sanguins (Yanagisawa *et al.* 1988). Cette molécule est produite par clivage enzymatique de son précurseur, la Big endothéline-1 (Big ET-1).

Comme rapporté sur la Figure 28 une tendance en faveur de l'effet antihypertenseur a été observée pour le dosage de monoxyde d'azote, sans que cette tendance se révèle significative aux tests statistiques. Par contre, il a été noté une importante différence dans la concentration plasmatique en Big ET-1 entre les rats SHR Témoins et les rats SHR Traités, qui indique que l'effet de l'extrait de champagne pourrait passer par la réduction du taux plasmatique d'endothéline-1. Bien entendu, à cause du faible nombre d'animaux, ces derniers résultats demandent à être confirmés.

Dans la recherche de composés antihypertenseurs, de nombreuses études ont mis en évidence l'effet bénéfique des composés phénoliques des vins (surtout pour les vins rouges) sur la tension artérielle. Ces composés recouvrent un grand nombre d'espèces chimiques telles que les acides phénols, les flavonoïdes, les anthocyanes et les tannins qui disposent d'activités biologiques. Duarte *et al.* (2001) ont analysé l'effet de l'administration chronique (10 mg/kg) de la quercétine chez des rats SHR et WKY pendant 5 semaines. Ils ont observé que la quercétine réduisait la pression artérielle des rats SHR sans affecter celle des rats WKY. Récemment, deux extraits de vin rouge ont aussi montré des capacités à diminuer la pression sanguine chez des rats normotendus par augmentation de la capacité relaxante de l'endothélium et par une faible induction de l'expression de la NO-synthétase et de la cyclooxygénase-2 au niveau des parois artérielles (Diebolt *et al.* 2001). Une autre étude a montré que les polyphénols issus d'un vin rouge élaboré à partir d'un cépage de cabernet sauvignon diminuaient la synthèse d'endothéline-1 dans des cellules endothéliales aortiques bovines par suppression de la transcription du gène de l'ET-1 (Corder *et al.* 2001). Dans

l'extrait de champagne administré aux animaux, le contenu en composés phénoliques était de 197 mg/L (Tableau 15), ce qui correspond à des doses administrées de 1,2 mg/kg/jour. La capacité de résorption dans le tractus gastro-intestinal des polyphénols étant de 5 à 10 % (Duthie *et al.* 1998), il serait donc possible que les composés phénoliques présents dans l'extrait puissent contribuer, en partie, à l'effet antihypertenseur par augmentation du taux de monoxyde d'azote et/ou par réduction de la production de l'endothéline-1.

Les études réalisées sur des hydrolysats protéiques et/ou des extraits alimentaires ont montré des effets antihypertenseurs après administration chronique sur une longue période (Astawan *et al.* 1995 ; Fujita *et al.* 1995 ; Yoshii *et al.* 2001 ; Sipola *et al.* 2001, 2002 ; Sato *et al.* 2002b). La composition du lait aigre (ou calpis) peut être comparée à celle de l'extrait administré aux animaux dans notre étude du fait que ces deux produits ont été élaborés à partir de fermentations (paragraphe 5.3.2, Chapitre I pour le Calpis). La composition de l'extrait de champagne et du Calpis est rapportée dans le Tableau 17.

Tableau 17. Comparaison de la composition du lait écrémé et du lait aigre par rapport à l'extrait de champagne (valeurs calculées pour 100 g).

Paramètres	Lait écrémé	Lait aigre	Extrait < 1 kDa*
Protéines[†] (g/100 g)	3,4	2,4	0,7 (4,0)
Sucres[‡] (g/100 g)	4,9	7,2	11,4 (67,2)
Na⁺ (mg/100 g)	44	26	89 (0,5)
K⁺ (mg/100 g)	160	150	417 (2,5)
Ca⁺⁺ (mg/100 g)	120	330	548 (3,3)
Mg⁺⁺ (mg/100 g)	12	33	548 (3,3)
Psys	NS	-17 après 12 sem.	-18,6 après 4 sem.
Références	Sipola <i>et al.</i> 2002	Sipola <i>et al.</i> 2001	Cette étude

* Extrait concentré 10 fois. Valeurs calculées par rapport à la matière sèche. Entre parenthèses ont été représentés les quantités administrées lors de l'étude (en mg/kg/jour).

[†] Contenu en protéines ou peptides.

[‡] Glucides simples.

^{||} Diminution significative de la pression systolique après administration chronique orale chez le rat SHR (en mm Hg) ; NS, non significatif.

Tout comme le lait, l'extrait contient différents électrolytes qui peuvent affecter la tension artérielle (e.g. Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, K⁺ et Na⁺ ; Kotchen *et al.* 1998). Pour Sipola *et al.* (2001), le magnésium, le sodium et le potassium n'ont pas eu d'influence sur la baisse de la pression

sanguine des rats recevant le lait aigre par rapport à ceux recevant le lait écrémé. Par contre, ils ont suspecté un effet protecteur de la part du calcium d'une part, parce qu'il était prépondérant et d'autre part, parce qu'il a été retrouvé en quantité plus importante dans les urines des animaux traités avec le Calpis (Sipola *et al.* 2001). Dans le cas de l'extrait de champagne, les quantités administrées quotidiennement en minéraux étaient 10 à 20 fois inférieures par rapport au lait aigre excepté pour le magnésium où les concentrations étaient équivalentes pour les deux produits. L'effet antihypertenseur de l'extrait de champagne est donc difficilement attribuable à l'apport en minéraux. La recherche de molécules actives devrait donc se porter sur la nature des peptides présents dans l'extrait de champagne et capables de reproduire cet effet *in vivo*.

En conclusion de ce travail, il est clair que l'extrait de champagne < 1 kDa possède un effet antihypertenseur significatif sur la pression artérielle, effet révélé au bout de 12 jours de traitement, et cela, quels que soient les paramètres étudiés (pressions systolique, diastolique et/ou moyenne). L'administration chronique de l'extrait n'a pas montré d'effet délétère hypotenseur chez les rats WKY. Concernant les dosages de l'activité ECA, des ions sodium, potassium et calcium ainsi que du monoxyde d'azote, les effets de l'extrait < 1 kDa de vin de Champagne ont été minimes. Mais peut-être que la somme de ces résultats a permis d'aboutir à l'effet anti-hypertenseur observé au cours de l'expérimentation. La suite à donner à ce travail serait donc d'identifier le ou les composés actifs de nature peptidique qui pourraient potentiellement être à l'origine de cet effet antihypertenseur.

4 IDENTIFICATION DE PEPTIDES DANS LE CHAMPAGNE

4.1 PEPTIDES RETROUVES DANS LE CHAMPAGNE

Grâce à la méthode publiée par De Person *et al.* (2004), la plupart des peptides identifiés dans le vin de base par Desportes *et al.* (2001) ont été retrouvés et quantifiés dans les champagnes ayant 1 à 20 ans de vieillissement sur lies. Cette méthode a aussi permis de rechercher et d'identifier dans ces champagnes d'autres peptides susceptibles de présenter un intérêt biologique. Les peptides recherchés sont présentés dans le Tableau 18. Dans ce tableau, les valeurs retrouvées dans la colonne « Littérature » représentent les IC₅₀ (en µM) des peptides déjà identifiés comme inhibiteurs de l'ECA (les références correspondantes étant citées dans la colonne de droite).

Tableau 18. Peptides inhibiteurs de l'ECA retrouvés dans des champagnes âgés de 1 à 20 ans.

Peptides	Champagnes (mg/L)	IC ₅₀ (µM)*	Littérature	Références
Arg-Ile	1,04 - 2,14	-	-	-
Arg-Pro-Pro	0,06 - 0,09	101	-	-
Arg-Tyr	0,04 - 0,22	369	-	-
Ile-Arg	2,24 - 7,01	2312	830	Matsumura (1993b)
Ile-Arg-Pro	Nd*	5	1,8	Matsumura (1993a)
Ile-Val	0,62 - 1,63	-	-	-
Lys-Ala-Pro	Nd	97	-	-
Lys-Met-Asn	Nd	-	-	-
Lys-Phe	Nd - 0,33	507	-	-
Lys-Tyr	Nd - 0,18	216	13	Suetsuna (2000)
Phe-Arg-Arg	Nd	466	-	-
Tyr-Arg	0,06 - 0,35	1300	-	-
Tyr-Gln	Nd - 0,30	2793	-	-
Tyr-Lys	0,31 - 3,07	-	-	-
Val-Ile	0,25 - 0,80	-	-	-
Captopril*	-	0,043	-	Cette étude

*-Nd, non déterminé

-IC₅₀, Concentration en peptide pour laquelle 50 % de l'activité de l'ECA est inhibée (la réaction utilisant le substrat Hip-His-Leu)

-Captopril, inhibiteur spécifique de l'ECA utilisé ici comme référence

Ainsi, les peptides recherchés ont été quantifiés à des concentrations allant de 0,04 à 7,01 mg/L dans des champagnes âgés de 1 à 20 ans. Sur les 15 peptides recherchés, 11 ont été identifiés dans le champagne. Parmi les peptides retrouvés dans le champagne, 7 se sont montrés inhibiteurs de l'ECA, à savoir : Arg-Pro-Pro (le plus inhibiteur, IC₅₀ = 101 µM), Arg-Tyr, Ile-Arg, Lys-Phe, Lys-Tyr, Tyr-Arg et Tyr-Gln.

4.2 EVOLUTION DES PEPTIDES AU COURS DU VIEILLISSEMENT DES CHAMPAGNES

Les concentrations en peptides ont été évaluées dans des champagnes d’âges différents (1 à 20 ans) afin d’observer l’existence de peptides potentiellement marqueurs de vieillissement. Les variations les plus significatives sont représentées dans le tableau 19. A titre d’exemple, les Figures 30 et 31 montrent les variations observées pour les peptides Val-Tyr et Tyr-Arg.

Tableau 19. Suivi des peptides au cours du vieillissement.

Structures	Tendance suivie au cours du vieillissement
Arg-Ile	↔
Arg-Pro-Pro	↔
Arg-Tyr	↘
Ile-Arg	↔
Ile-Val	↔
Lys-Phe	↔
Lys-Tyr	↘
Tyr-Arg	↘
Tyr-Gln	↘
Tyr-Lys	↘
Val-Ile	↗

↔ Pas de tendance observée
 ↘ Diminution au cours du vieillissement
 ↗ Augmentation au cours du vieillissement

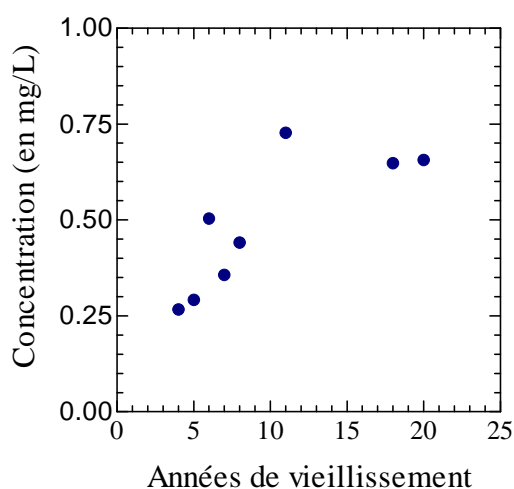


Figure 30. Variation des concentrations de **Val-Ile** au cours du vieillissement du champagne (en mg/L). Champagnes vieillis sur lies pour des périodes de 4, 5, 6, 7, 8, 11, 18 et 20 ans.

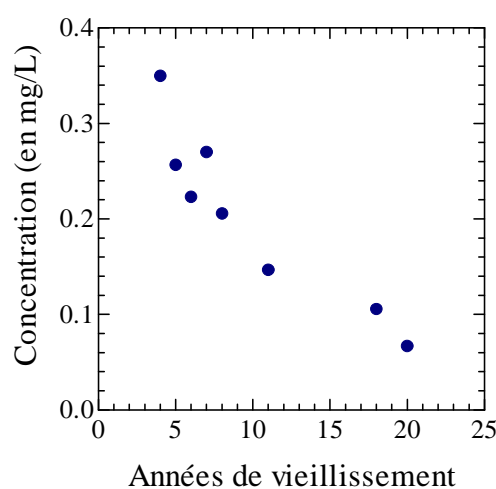


Figure 31. Variation des concentrations de **Tyr-Arg** au cours du vieillissement du champagne (en mg/L). Champagnes vieillis sur lies pour des périodes de 4, 5, 6, 7, 8, 11, 18 et 20 ans.

Le suivi des peptides au cours du vieillissement a montré une tendance nette dans l'évolution de la concentration de 6 peptides en fonction de l'âge des champagnes. La concentration en dipeptide Val-Ile semble augmenter au début du vieillissement pour se stabiliser par la suite. A l'inverse, celles de Arg-Tyr, Lys-Tyr, Tyr-Arg, Tyr-Gln et Tyr-Lys ont, dans un premier temps, montré une forte diminution au cours des 10 premières années, qui, ensuite, s'est poursuivie mais de façon moins prononcée. Le suivi des concentrations en peptides Arg-Ile, Arg-Pro-Pro, Ile-Arg, Ile-Val et Lys-Phe n'a pas montré d'évolution nette en fonction du temps de vieillissement.

4.3 DISCUSSION

La recherche de peptides dans le champagne a abouti à l'identification de 11 peptides (dont 10 dipeptides et 1 tripeptide).

Lors d'une précédente étude, Camille Desportes a identifié 8 peptides (dont 5 di-, 2-tri- et 1 hexapeptide) dans un vin de base (Desportes *et al.* 2001). A l'exception de l'hexapeptide, les autres peptides ont été recherchés dans le champagne et seuls, 4 dipeptides ont été retrouvés : Ile-Arg, Ile-Val, Tyr-Lys et Val-Ile. En spéculant sur l'origine de ces peptides, il semble légitime de croire qu'ils pourraient être issus des premières fermentations (alcoolique et malolactique). Le fait de ne pas en retrouver certains dans le champagne peut s'expliquer par leur dégradation au cours de la phase de prise de mousse. Lors de cette étape, la consommation azotée des levures a été évaluée à 25 mg/L d'azote assimilable (teneur azotée en cations ammonium et acides aminés sauf la proline). Les levures, au cours de la prise de mousse, utilisent principalement l'azote sous forme d'ammonium (10 mg/L) et sous forme d'acides aminés et oligopeptides pour 15 mg/L (Leroy 1986). En effet, lors de la prise de mousse, les oligopeptides peuvent être absorbés par les levures et être dégradés. Ainsi, des études ont mis en évidence l'existence de transporteurs di- et tripeptidiques extracellulaires chez *Saccharomyces cerevisiae* (Naider *et al.* 1974 ; Moneton *et al.* 1986). De plus, il a été montré que ces levures préféraient utiliser les acides aminés sous forme peptidique plutôt que sous forme libre pour leur croissance (Da Cruz *et al.* 2002).

Les tripeptides Lys-Met-Asn et Phe-Arg-Arg, identifiés dans le vin de base, n'ont pas été retrouvés dans le champagne. Une hypothèse serait de dire que ces tripeptides ont été dégradés par la levure au cours de l'étape de prise de mousse, et qu'ils ne peuvent être libérés lors du processus d'autolyse car ils n'ont pas été retrouvés dans les champagnes. Par contre,

comme les peptides Ile-Arg, Ile-Val, Tyr-Lys et Val-Ile ont été identifiés dans le vin de base, le fait de les retrouver dans le champagne peut s'expliquer de deux façons :

- ↳ Soit ces peptides n'ont pas été dégradés lors de la prise de mousse (ou très peu) et se retrouvent donc dans le champagne, le phénomène d'autolyse ayant pu aussi contribuer à leur présence.
- ↳ Soit ils ont été dégradés lors de la prise de mousse et n'ont été libérés qu'au cours du vieillissement sur lies *via* le phénomène d'autolyse de la levure.

En ce qui concerne la présence du dipeptide Val-Ile dans le champagne, il semble que celui-ci soit principalement un produit issu de la levure. Son augmentation au cours du vieillissement sur lies (Figure 30) indique qu'il peut être libéré au cours de l'autolyse. Par contre la diminution des peptides observée dans le tableau 19 indique qu'ils doivent être hydrolysés par les protéases actives libérées au cours du vieillissement sur lies. Ou bien que ces peptides pourraient subir des phénomènes de recombinaison *via* l'intermédiaire de transpeptidases libérées au cours de l'autolyse des levures. Cette dernière hypothèse reste néanmoins à prouver, car il n'a pas encore été identifié et/ou recherché, chez la levure, de transpeptidases actives au pH du vin.

Suivant la littérature existante, Ile-Arg, Ile-Arg-Pro et Lys-Tyr ont déjà montré une activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA (Matsumura *et al.* 1993a,b ; Suetsuna & Nakano 2000). Les différences d'IC₅₀ observées entre les résultats de la littérature et ceux de ce projet peuvent provenir des méthodes utilisées pour leur calcul. Ces différences ont été attribuées aux quantités d'enzyme ajoutées lors du test d'inhibition de l'ECA. La quantité d'ECA utilisée dans cette étude étant supérieure, la concentration nécessaire pour inhiber 50 % de l'activité enzymatique a donc été supérieure. Un autre paramètre à ne pas négliger est le mode de préparation des peptides standards utilisés pour la recherche des IC₅₀. En effet, leur purification nécessite très souvent l'utilisation de solvants. Ceux-ci se retrouvent dans les standards commercialisés et peuvent interagir avec les dosages aux concentrations les plus élevées et ainsi diminuer l'activité des peptides. De plus, la préparation de peptides standards implique souvent la contamination du produit par la présence de stéréo-isomères, ce qui pourrait aussi perturber les mesures d'activité.

D'après les études réalisées sur les structures types retrouvées dans les peptides inhibiteurs de l'ECA (Cushman *et al.* 1973 ; Cheung *et al.* 1980), les peptides identifiés dans

le champagne n'ont pas strictement respecté ces particularités, ce qui explique aussi pourquoi les valeurs d' IC_{50} sont si élevées ($> 100 \mu M$). Néanmoins, Yamamoto *et al.* (1999) ont pu observer, malgré une faible activité inhibitrice ($IC_{50} = 720 \mu M$), que le peptide Tyr-Pro avait une activité antihypertensive *in vivo* équivalente à celle des puissants tripeptides Ile-Pro-Pro et Val-Pro-Pro ($IC_{50} = 5$ et $9 \mu M$, respectivement). De plus, en se basant sur l'étude de Matoba *et al.* (1999), il existe une possibilité que certains peptides puissent montrer des propriétés antihypertensives alors qu'ils sont dénués de toute activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA ($IC_{50} > 100 \mu M$). Cette affirmation reste néanmoins à confirmer et sera l'objet d'études futures.

En résumé, les premiers résultats concernant l'évolution des oligopeptides quantifiés sur plusieurs cuvées sont intéressants et prometteurs. Parmi les peptides identifiés dans le champagne, 6 dipeptides ont montré des variations nettes en fonction du temps de vieillissement. Val-Ile a montré une augmentation au cours du temps de repos sur lies, ce qui pourrait indiquer qu'il est libéré au cours du phénomène d'autolyse. A l'inverse, les cinq autres dipeptides (Arg-Tyr, Lys-Tyr, Tyr-Arg, Tyr-Gln et Tyr-Lys) ont montré une diminution au cours du vieillissement, ce qui pourrait être dû à leur dégradation. Cette étude semble indiquer que ces peptides pourraient être considérés comme des marqueurs de vieillissement.

Les di- et tripeptides sont constitués des 20 L- α -aminoacides principaux, ce qui permet des combinaisons de 400 dipeptides et 8000 tripeptides possibles. Il est donc évident que les peptides identifiés dans le champagne ne représentent qu'une infime fraction des différentes combinaisons qui peuvent être retrouvées. Il est vraisemblable que d'autres di- et tripeptides existent et que certains peuvent être plus inhibiteurs de l'ECA et/ou meilleurs marqueurs de vieillissement.

Au regard de la littérature existante sur les peptides du vin, c'est la première fois qu'un suivi individuel et quantitatif des peptides est effectué. Cependant, ces analyses ont été réalisées sur des échantillons de cuvées différentes, et il serait intéressant de confirmer aussi cette hypothèse en suivant ces marqueurs sur une même cuvée.

En conclusion, plusieurs peptides ont pu être identifiés et quantifiés dans le champagne. Parmi ces peptides, 7 se sont montrés inhibiteurs de l'ECA (Arg-Pro-Pro, Arg-Tyr, le-Arg, Lys-Phe, Lys-Tyr, Tyr-Arg et Tyr-Gln). D'après le suivi de leur concentration, il semblerait

que 6 d'entre eux (Arg-Tyr, Lys-Tyr, Tyr-Arg, Tyr-Gln et Tyr-Lys et Val-Ile) puissent être considérés comme marqueurs de vieillissement.

C ONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les travaux préliminaires ont permis de montrer, dans les champagnes, la présence d'une activité inhibitrice vis-à-vis de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I. Près de 95 % de cette activité mesurée dans le champagne a été retrouvée dans la fraction < 1 kDa. Malgré la complexité de composition que représente cet extrait, les études ont montré que certains oligopeptides présents semblaient impliqués dans cette activité inhibitrice.

L'administration chronique de l'extrait de champagne < 1 kDa a montré un effet antihypertenseur significatif sur la pression artérielle à partir de 12 jours de traitement. La cinétique de cet effet a montré que l'extrait avait une action rapide (significative après 2 heures) et intense (-21 mm Hg) sur la pression artérielle des rats SHR. L'intérêt de l'extrait en thérapeutique pourrait être important car il a montré une action aussi rapide et plus longue que celle du captopril. De plus, l'extrait n'a pas montré d'effets délétères hypotenseur ou métabolique qu'aurait pu éventuellement apporter une administration répétée.

Pour le moment, le mécanisme à l'origine de l'effet antihypertenseur n'a pas pu être identifié. Cependant il existe une piste moléculaire avec la Big-Endothéline 1, qui serait à poursuivre.

La caractérisation de la fraction < 1 kDa a permis d'identifier et de quantifier 11 peptides dans le champagne, dont 7 ont montré des propriétés inhibitrices vis-à-vis de l'ECA (Arg-Pro-Pro, Arg-Tyr, le-Arg, Lys-Phe, Lys-Tyr, Tyr-Arg et Tyr-Gln). De plus, 6 peptides (Arg-Tyr, Lys-Tyr, Tyr-Arg, Tyr-Gln et Tyr-Lys et Val-Ile) ont montré un intérêt quant au suivi du vieillissement des vins de Champagne.

Les perspectives d'études envisagées après ce projet sont nombreuses :

- ↳ Réaliser le même type d'étude in vivo mais avec des quantités plus faibles.
- ↳ Confirmer le maintien de l'effet pendant 48 heures après administration orale de l'extrait
- ↳ L'administration de l'extrait ayant montré un effet sur 48 heures, une étude avec administration répétée de l'extrait tous les deux jours, pendant 4 à

8 semaines, pourrait éventuellement montrer un effet antihypertenseur. Ce qui serait intéressant car permettant de réduire les quantités administrées quotidiennement.

- ↳ Une fois les études *in vivo* terminées faire des prélèvements sanguins au niveau de l'aorte afin de doser l'activité ECA circulante.
- ↳ Les résultats sur la cinétique de l'effet et l'administration répétée ont été obtenus avec des rats jeunes de 8 semaines, soit en plein développement de l'hypertension. Il serait intéressant de poursuivre ces manipulations avec des rats plus âgés pour observer l'impact de l'extrait sur des animaux en état d'hypertension fort développé.
- ↳ Identifier le ou les principes actifs responsables de l'effet antihypertenseur de l'extrait.
- ↳ Identifier et quantifier d'autres oligopeptides dans un autolysat en milieu modèle et dans des champagnes d'âges différents mais provenant d'une même cuvée.
- ↳ Rechercher d'autres propriétés biologiques comme des activités :
 - Opioides, morphino-mimétiques,
 - Anti-inflammatoires,
 - Antimicrobiennes.
- ↳ Rechercher des peptides aux propriétés gustatives, et notamment étudier ceux interagissant avec le récepteur du goût umami, qui est un récepteur spécifique du glutamate. Ce dernier est aussi connu pour son rôle au niveau du cerveau en tant que substance excitatrice (Bellisle 1999).
- ↳ Ou encore rechercher des peptides inhibiteurs de la cathepsine B comme l'ont fait Nakagomi *et al.* récemment (2002) à partir de sérum albumine humaine ainsi que Lee & Lee (2000) à partir de la β -caséine.

L'étude des peptides du champagne ne fait que commencer et peu de choses sont connues sur les peptides du vin en général. La poursuite de ce type de projets permettrait une meilleure connaissance de ce pool peptidique qui représente une part importante de la fraction azotée (25 à 40%).

L'identification de molécules pharmacologiquement actives dans le champagne et/ou les autolysats pourrait, d'une part, contribuer à clarifier l'énigme du « French Paradox » et d'autre part, contribuer à l'établissement de nouvelles pistes moléculaires dans la recherche pharmacologique. Les peptides étant d'origine levurienne, leur production à partir de levures pourrait se révéler de faible coût et présenter un intérêt pour la valorisation de l'extrait de levure (en tant qu'additif alimentaire par exemple).

Les améliorations ne pourront être que d'ordre technologique sur certains points du processus d'élaboration car le champagne fait appel au respect des traditions et aussi de la législation. Ainsi, il serait possible d'utiliser les peptides comme marqueurs lors de la mise en place d'un test de vieillissement accéléré ou sur la sélection d'une souche de levure (non génétiquement modifiée) selon son potentiel protéolytique et sa capacité à produire des peptides biologiquement actifs.

Ainsi, toutes les données collectées à partir de ces études permettraient de mieux connaître les composants du champagne et leurs fonctions, afin de valoriser encore plus celui-ci par rapport à la concurrence de plus en plus forte actuellement.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] ABUBAKAR A., SAITO T., AIMAR M.V., ITOH T. New derivation of the inhibitory activity against angiotensin converting enzyme (ACE) from sweet cheese whey. *Tohoku J. Agric. Res.*, 1996, 47, p. 1-8.
- [2] ABUBAKAR A., SAITO T., KITAZAWA H., KAWAI Y., ITOH T. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *J. Dairy Sci.*, 1998, 81, p. 3131-3138.
- [3] ACHSTETTER T., WOLF D.H. Proteinase, proteolysis and biological control in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1985, 1, p. 139-157.
- [4] ACHSTETTER T., EHMANN C., WOLF H. New proteolytic enzymes in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1981, 207, p. 445-454.
- [5] ACHSTETTER T., EHMANN C., WOLF H. Proteolysis in eucaryotic cells aminopeptidases and dipeptidylaminopeptidases of yeast revisited. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1983, 226, p. 292-305.
- [6] ACHSTETTER T., EMTER O., EHMANN C., WOLF H. Proteolysis in eucaryotic cells. Proteinase yscE, a new yeast peptidase. *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, p. 13334-13348.
- [7] ALBERT M.A., GLYNN R.J., RIDKER P.M. Alcohol consumption and plasma concentration of C-reactive protein. *Circulation*, 2003, 107, p. 443-447.
- [8] ALEXANDRE H., HEINTZ D., CHASSAGNE D., GUILLOUX-BENATIER M., CHARPENTIER C., FEUILLAT M. Protease A activity and nitrogen fractions released during alcoholic fermentation and autolysis in enological conditions. *J. Ind Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 26, p. 235-240.
- [9] ANDRÉS-LACUEVA C., IBERN-GOMEZ M., LAMUELA-RAVENTOS, BUXADERAS S., DE LA TORRE-BORONAT M.C. Cinnamates and resveratrol content for sparkling wine characterization. *Am. J. Enol. Vitic.*, 2002, 53, p. 147-150.
- [10] ANDRIAMBELOSON E., KLESCHYOV A.L., MULLER B., BERETZ A., STOCLET J.C., ANDRIANTSITOHAINA R. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Brit. J. Pharmacol.*, 1997, 120, p. 1053-1058.
- [11] ANDRIAMBELOSON E., STOCLET J.C., ANDRIANTSITOHAINA R. Mechanism of endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat thoracic aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1999, 33, p. 248-254.
- [12] ANTONIOS T.F.T., MACGREGOR G.A. Angiotensin converting enzyme inhibitors in hypertension: potential problems. *J. Hypertens.*, 1995, 13 (suppl. 3), p. S11-S16.
- [13] 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, p. 319-324.
- [14] ARIYOSHI Y. Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trends Food Sci. Technol.*, 1993, 4, p. 139-144.

- [15] ARNOLD W.N. The structure of the yeast cell wall. Solubilization of a marker enzyme, β -fructofuranosidase, by the autolytic enzyme system. *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, p. 1161-1169.
- [16] ARNOLD W.N. Autolysis. *Yeast cell envelopes: Biochemistry, biophysics and ultrastructure, vol. II* ed. by W.N. ARNOLD. Boca Raton (Florida) : CRC Press 1981, p. 129-137.
- [17] ASTAWAN M., WAHYUNI M., YASUHARA T., YAMADA K., TADOKORO T., MAEKAWA A. Effects of angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances derived from Indonesian dried-salted fish on blood pressure of rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1995, 59, p. 425-429.
- [18] AUSSENAC J., CHASSAGNE D., CLAPAROLS C., CHARPENTIER M., DUTEURTRE B., FEUILLAT M., CHARPENTIER C. Purification method for the isolation of monophosphate nucleotides from champagne wine and their identification by mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2001, 907, p. 155-164.
- [19] BABAYAN T.L., BEZRUKOV M.G., LATOV V., BELIKOV V., BELAVTSEVA E., TITOVA E. Induced autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*: morphological effects, rheological effects, and dynamics of accumulation of extracellular hydrolysis products. *Curr. Microbiol.*, 1981, 5, p. 163-168.
- [20] BABAYAN T.L., BEZRUKOV M.G. Autolysis in Yeast. *Acta Biotechnol.*, 1985, 5, p. 129-136.
- [21] BAJO-MARTINEZ A.A., BERNAL E.E., MARTIN-LAZARO J.F., SANCHEZ O.O., FABREGATE R.R., VILLAR M.L., RUBIO M., SABAN-RUIZ J.J. Biochemical and hemodynamic determinants of C-reactive protein as an inflammatory marker of endothelial dysfunction. The impact of systolic hypertension. *Am. J. Hypertens.*, 2003, 16, p. 257A.
- [22] BEEVERS G., LIP G.Y.H., O'BRIEN E. ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension. *Brit. Med. J.*, 2001 322, p. 912-916.
- [23] BELLISLE F. Glutamate and the UMAMI taste: sensory, metabolic, nutritional and behavioural considerations. A review of the literature published in the last 10 years. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1999, 23, p. 423-438.
- [24] BERTHELOT A., LUTHRINGER C., EXINGER A. Trace elements during the development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. *Clin. Sci.*, 1987, 72, p. 515-518.
- [25] BONOW R.O., SMAHA L.A., SMITH S.C., MENSAH G.A., LENFANT C. The international burden of cardiovascular disease: responding to the emerging global epidemic. *Circulation*, 2002, 106, p. 1602-1605.
- [26] BOSCA L., HORTELANO S. Mechanisms of nitric oxide-dependent Apoptosis: involvement of mitochondrial mediators. *Cell. Signal.*, 1999, 11, p. 239-244.
- [27] BOURDET A., HERARD J. Influence de l'autolyse des levures sur la composition phosphorée et azotée des vins. *Ann. Technol. Agric.*, 1958, Série E, p. 177-202.
- [28] BREW K. Structure of human ACE gives new insights into inhibitor binding and design. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2003, 24, p. 391-394.
- [29] BRUNNER H.R., NUSSBERGER J., WAEBER B. Angiotensin II blockade compared with other pharmacological methods of inhibiting the renin-angiotensin system. *J. Hypertens.* 1993; 11(suppl.3), S53-S58.
- [30] BYUN H.G., KIM S.K. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Process. Biochem.*, 2001, 36, p. 1155-1162.

- [31] CABANIS J.C., CABANIS M.T., CHEYNIER V., TEISSEDRE P.L. Tables de composition. *Œnologie : Fondements scientifiques et technologiques/* ed. par C.Flanzy. Paris : Lavoisier Tec & Doc, 1998, p. 318-336.
- [32] CABANIS J.C., FLANZY C. Acides organiques, substances minérales, vitamines, lipides. *Œnologie : Fondements scientifiques et technologiques/* ed. par C.Flanzy. Paris : Lavoisier Tec & Doc, 1998, p. 3-38.
- [33] CAESSENS P.W.J.R., GRUPPEN H., SLANGEN C.J., VISSER S., VORAGEN A.G.J. Functionality of β -casein peptides: Importance of amphipathicity for emulsion-stabilizing properties. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, p. 1856-1862.
- [34] CARNEVILLIER V. Contribution à l'étude des fractions azotées et plus particulièrement des peptides du moût de raisin et du vin. Application à la caractérisation des vins du cépage chardonnay. *Thèse de Doctorat*, Dijon : 1999, 125 p.
- [35] CARNEVILLIER V., SCHLICH P., GUERREAU J., CHARPENTIER C., FEUILLAT M. Characterization of the production regions of chardonnay wines by analysis of free amino acids. *Vitis*, 1999, 38, p. 37-42.
- [36] CHAE C.U., LEE R.T., RIFAI N., RIDKER P.M. Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. *Hypertension*, 2001, 38, p. 399-403.
- [37] CHAMKHA M., CATHALA B., CHEYNIER V., DOUILLARD R., Phenolic composition of champagnes from chardonnay and pinot noirs vintages. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, p. 3179-3184.
- [38] CHAROENCHAI C., FLEET G.H., HENSHKE P.A., TODD B.E.N. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeast for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 1997, 3, p. 2-8.
- [39] CHARPENTIER C., NGUYEN VAN LONG T., BONALY R., FEUILLAT M. Alteration of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during autolysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1986, 24, p. 405-413.
- [40] CHARPENTIER C., FEUILLAT M. Yeast autolysis. *Wine microbiology and biotechnology/* ed. by G.H. FLEET. Switzerland : Harwood Academic Publishers, 1993, p. 225-242.
- [41] CHEN T.L., LO Y.C., HU W.T., WU M.C., CHEN S.T., CHANG H.M. Microencapsulation and modification of synthetic peptides of food proteins reduces the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, p. 1671-1675.
- [42] CHEN Y.H., LIU Y.H., YANG Y.H., FENG H.H., CHANG C.T., CHEN C.C. Antihypertensive effect of an enzymatic hydrolysate of chicken essence residues. *Food Sci. Technol. Res.*, 2002, 8, p. 144-147.
- [43] CHEUNG H.S., WANG F.L., ONDETTI M.A., SABO E.F., CUSHMAN D.W. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J. Biol. Chem.*, 1980, 255, p. 401-407.
- [44] CHEYNIER V., MOUTOUNET M., SARNI-MANCHADO P. Les composés phénoliques. *Œnologie : Fondements scientifiques et technologiques/* ed. par C. Flanzy. Paris : Lavoisier Tec & Doc : 1998, p. 3-38.
- [45] CHOI H.S., CHO H.Y., YANG H.C., RA K.S., SUH H.J. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Grifola frondosa*. *Food Res. Int.*, 2001, 34, p. 177-182.
- [46] COLAGRANDE O., SILVA A., CASOLI A. Les acides aminés dans les vins mousseux. *Conn. Vigne Vin*, 1984, 18, p. 27-48.
- [47] COMMITTEE ON CARE AND USE OF SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE (SHR) Rats, Guidelines for Breeding, Care and Use. *ILAR News*, 1976, 19, p. G3-G20.

- [48] CONRADI R.A., HILGERS A.R., HO N.F.H., BURTON P.S. The influence of peptide structure on transport across Caco-2 cells. II. Peptide bond modification which results in improved permeability. *Pharmaceut. res.*, 1992, 9, p. 435-439.
- [49] CORDER R., DOUTHWAITE J.A., LEES D.M., KHAN N.Q., VISEU DOS SANTOS A.C., WOOD E.G., CARRIER M.J. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature*, 2001, 414, p. 863-864.
- [50] CORDONNIER R. Etude des protéines et des substances azotées. Leur évolution au cours des traitements œnologiques. Conditions de la stabilité protéique des vins. *Bull. O. I. V.*, 1966, 39, p. 1475-1489.
- [51] CUSHMAN D.W., CHEUNG H.S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.*, 1971, 20, p. 1637-1648.
- [52] CUSHMAN D.W., CHEUNG H.S., SABO E.F., ONDETTI M.A. Development and design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *Am. J. Cardiol.*, 1982, 49, p. 1390-1394.
- [53] CUSHMAN D.W., ONDETTI M.A. Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Nat. Med.*, 1999, 5, p. 1110-1112.
- [54] CUSHMAN D.W., PLUŠČEC J., WILLIAMS N.J., WEAVER E.R., SABO E.F., KOCY O., CHEUNG H.S., ONDETTI M.A. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by analogs of peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Experientia*, 1973, 29, p. 1032-1035.
- [55] DA CRUZ S.H., CILLI E.M., ERNANDES J.R. Structural complexity of the nitrogen source and influence on yeast growth and fermentation. *J. Inst. Brew.*, 2002, 108, p. 54-61.
- [56] DARTIGUENAVE C., JEANDET P., MAUJEAN A. Study of the contribution of major organic acids of wine to the buffering capacity of wine in model solutions. *Am. J. Enol. Vitic.*, 2000, 51, p. 352-356.
- [57] DAS U.N. Nutritional factors in pathobiology of human essential hypertension. *Nutrition*, 2001, 17, p. 337-346.
- [58] DE FERRANTI S., RIFAI N. C-reactive protein and cardiovascular disease: a review of risk prediction and interventions. *Clin. Chim. Acta*, 2002, 317, p. 1-15.
- [59] DE PERSON M., SEVESTRE A., CHAIMBAULT P., PERROT L., DUCHIRON F., ELFAKIR C. Characterization of small peptides in champagne wine by LC-ESI-MS/MS. *Anal. Chim. Acta*, 2004 (soumis).
- [60] DESPORTES C. Contribution à la connaissance de la fraction peptidique des vins. Isolement, identification et caractérisation organoleptiques de quelques peptides du champagne. *Thèse de Doctorat* : Reims : 1999, 140 p.
- [61] DESPORTES C., CHARPENTIER M., DUTEURTRE B., MAUJEAN M., DUCHIRON F. Liquid chromatographic fractionation of small peptides from wine. *J. Chromatogr. A*, 2000, 893, p. 281-291.
- [62] DESPORTES C., CHARPENTIER M., DUTEURTRE B., MAUJEAN A., DUCHIRON F. Isolation, identification, and organoleptic characterization of low-molecular-weight peptides from white wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 2001, 52, p. 376-380.
- [63] DIEBOLT M., BUCHER B., ANDRIANTSITOHAINA R. Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation, and induce gene expression. *Hypertension*, 2001, 38, p. 159-165.
- [64] DIEUSAERT P. *Guide pratique des analyses médicales* / ed. par P. DIEUSAERT. Paris : Maloine : 2002, 1334 p.

- [65] DODSON P.M., SHINE B. Retinal vein occlusion: C-reactive protein and arterial hypertension. *Acta Ophthalmol.* (Copenh), 1984, 62, p 123-130.
- [66] DOSTAL D.E., BOOZ G.W., BAKER K.M. The Cardiac Renin-Angiotensin System : an Overview. *The Cardiac Renin Angiotensin System/* ed. by Lindpaintner & Ganten. New York : Futura Publishing Co. Inc. : 1994, p. 1-20.
- [67] DUARTE J., PÉREZ-PALENCIA R., VARGAS F., OCETE M.A., PÉREZ-VIZCAINO F., ZARZUELO A., TAMARGO J., Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Brit. J. Pharmacol.*, 2001, 133, p 117-124.
- [68] DUFFY S.J., GOKCE N., HOLBROOK M., HUANG A., FREI B., KEANEY JR J.F., VITA J.A. Treatment of hypertension with ascorbic acid. *The Lancet*, 1999, 354, p. 2048-2049.
- [69] DUKIC S., HEURTAUX T., KALTENBACH M.L., HOISEY G., LALLEMAND A., VISTELLE R. Influence of schedule of administration on methotrexate penetration in brain tumours. *Eur. J. Cancer*, 2000, 36, p. 1578-1584.
- [70] DUNCAN A.C., JÄGER A.K., VAN STADEN J. Screening of Zulu medicinal plants for angiotensin converting enzyme (ECA) inhibitors. *J. Ethnopharmacol.*, 1999, 68, p. 63-70.
- [71] DUTHIE G.G., PEDERSEN M.W., GARDNER P.T., MORRICE P.C., JENKINSON A.M., MCPHAIL D.B., STEELE G.M. The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1998, 52, p. 733-736.
- [72] DZIUBA J., MINKIEWICZ P., NAŁĘCZ D., IWANIAK A. Database of biologically active peptide sequences. *Nahrung*, 1999, 43, p. 190-195.
- [73] ENGEL E., NICKLAUS S., GAREM A., SEPTIER C., SALLES C., LE QUÉRÉ J.L. Taste active compounds in a goat cheese water-soluble extract. 1. Development and sensory validation of a model water-soluble extract. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, p. 4252-4259.
- [74] ERNST E. Cardiovascular effects of garlic (*Allium sativum*): a review. *Pharmatherapeutica*, 1987, 5, p. 83-89.
- [75] ESEN A. A proposed nomenclature for the alcohol soluble proteins (zeins) of maize (*Zea mays* L.). *J. Cereal Sci.*, 1987, 5, p. 117-128.
- [76] FERRARI G., FEUILLAT M. L'élevage sur lies des vins blancs de Bourgogne. I - Etude des composés azotés, des acides gras et analyse sensorielle des vins. *Vitis*, 1988, 27, p. 183-197.
- [77] FERREIRA R.B., PIÇARRA-PEREIRA M.A., MONTEIRO S., LOUREIRO V.B., TEIXEIRA A.R. The wine proteins. *Trends Food Sci. Technol.*, 2002, 12, p. 230-239.
- [78] FERREIRA S.H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *Br. J. Pharmacol.*, 1965, 24, p. 163-169.
- [79] FERREIRA S.H., BARTELT D.C., GREENE L.J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry*, 1970, 9, p. 2583-2593.
- [80] FEUILLAT M. Les constituants azotés des raisins et du vin. *Ann. Univ. et A.R.E.R.S.*, 1973, 11, p. 37-46.
- [81] FEUILLAT M. Contribution à l'étude des composés azotés dans les moûts de raisin et dans les vins. *Thèse de Doctorat* : 1974, 112 p.
- [82] FEUILLAT M. Composition azotée du vin de Champagne. *Stage de formation continue d'œnologie*, 5-7 mai 1976, Reims.

- [83] FEUILLAT M. Brevet d'invention : Autolysat de levures à usage œnologique et leur procédés de fabrication. 1986, Fr : 2 607 147-A1
- [84] FEUILLAT M. Yeast macromolecules: origin, composition, and enological interest. *Am. J. Enol. Vitic.*, 2003, 54, p 211-213.
- [85] FEUILLAT M., CHARPENTIER C. Autolysis of yeasts in champagne. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1982, 33, p. 6-13.
- [86] FEUILLAT M., CHARPENTIER C., MAUJEAN A. Les composés azotés. *Œnologie : Fondements scientifiques et technologiques/* ed. par C.Flanzy. Paris : Lavoisier Tec & Doc, 1998, p. 94-121.
- [87] FORMICA J.V., REGELSON W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.*, 1995, 33, p. 1061-1080.
- [88] FORNAIRON-BONNEFOND C., CAMARASA C., MOUTOUNET M., SALMON J.M. Etat des connaissances scientifiques actuelles sur le phénomène d'autolyse des levures et l'élevage des vins sur lies. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 2001, 35, p. 57-78.
- [89] FREMONT L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.*, 2000, 66, p. 663-673.
- [90] FUGLSANG A., NILSSON D., NYBORG N.C.B. Cardiovascular effects of fermented milk containing angiotensin-converting enzyme inhibitors evaluated in permanently catheterised, spontaneously hypertensive rats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68, p. 3566-3569.
- [91] FUJII M., MATSUMURA N., MITO K., SHIMIZU T., KUWAHARA M., SUGANO S., KARAKI H. Antihypertensive effects of peptides in autolysate of bonito bowels on spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1993, 57, p. 2186-2188.
- [92] FUJITA H., YOSHIKAWA M. LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacology*, 1999, 44, p. 123-127.
- [93] FUJITA H., YAMAGAMI T., OHSHIMA K. Effects of an ace-inhibitory agent, katsuobushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and in the borderline and mildly hypertensive subjects. *Nutr. Res.*, 2001, 21, p. 1149-1158.
- [94] FUJITA H., YOKOYAMA K., YOSHIKAWA M. Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *J. Food Sci.*, 2000, 65, p. 564-569.
- [95] FUJITA H., YOKOYAMA K., YASUMOTO R., YOSHIKAWA M. Antihypertensive effect of thermolysin digest of dried bonito in spontaneously hypertensive rat. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 1995, 22 (suppl.1), p. S304-S305.
- [96] FUJITA T., MORISHITA Y., ITO H., KURIBAYASHI D., YAMAMOTO A., MURANISHI S. Enhancement of the small intestinal uptake of phenylalanyl-glycine via a H⁺/oligopeptide transport system by chemical modification with fatty acids. *Life Sci.*, 1997, 61, p. 2455-2465.
- [97] FUKUI M., OKUDA T., TAKAYANAGI T., YOKOTSUKA K. Changes in amount of nitrogenous compounds from skins and seeds of four grape cultivars during extraction using Juice- or Fermenting must-like model solutions. *J. Wine Res.*, 2002, 13, p. 203-215.
- [98] FUKUNAGA K., TAKADA Y., GU M., ISHIGURO S., SEINO K., TANIGUCHI H., YUZAWA K., OTSUKA M., GOTO K., FUKAO K. Peri- and postoperative kinetics of endothelin-1/Big Endothelin-1 antagonist in porcine liver transplantation from non-heart-beating donors. *Transplant. Proc.*, 2000, 32, p. 1647-1649.
- [99] FURUSHIRO M., SAWADA H., HIRAI K., MOTOIKE M., SANSAWA H., KOBAYASHI S., WATANUKI M., YOKOKURA T. Blood pressure-lowering effect of extract from

- Lactobacillus casei* in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Agric. Biol. Chem.*, 1990, 54, p2193-2198.
- [100] GALLO R.L., MURAKAMI M., OHTAKE T., ZAIYOU M. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2002, 110, p. 823-831.
- [101] GARBERS D.L., DUBOIS S.K. The molecular basis of hypertension. *Annu. Rev. Biochem.*, 1999, 68, p. 127-155.
- [102] GAUTHIER S.F., PAQUIN P., POULIOT Y., TURGEON S. Surface activity and related functional properties of peptides obtained from whey proteins. *J. Dairy Sci.*, 1993, 76, p. 321-328.
- [103] GERMAN J.B., WALZEM R.L. The health benefits of wine. *Annu. Rev. Nutr.*, 2000, 20, p. 561-593.
- [104] GIRARDET J.M., DEBOMY L., COURTHAUDON J.L., MICLO L., HUMBERT G., GAILLARD J.L. Viscoelastic properties of oil-water interfaces covered by bovine β -casein tryptic peptides. *J. Dairy Sci.*, 2000, 83, p. 2410-2421.
- [105] GIZY ANDRIAMANANTENA A. Contribution à l'étude des colloïdes des vins effervescents. *Thèse de Doctorat* : Dijon : 1984, 147 p.
- [106] GLOWA J.R., HANSEN C.T. Differences in response to an acoustic startle stimulus among forty-six rat strains. *Behav. Genet.*, 1994, 24, p. 79-84.
- [107] GOBBETTI M., FERRANTI P., SMACCHI E., GOFFREDI F., ADDEO F. Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66, p. 3898-3904.
- [108] GÓMEZ-RUIZ J.Á., RAMOS M., RECIO I. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *Int. Dairy J.*, 2002, 12, p. 697-706.
- [109] GONZÁLES DE LLANO D., HERRAIZ T., POLO M.C. Peptides. *Handbook of food analysis, vol. 1/* ed. by L.M.L. Nollet. Marcel Dekker Inc. : 1996, p. 229-276.
- [110] GORNALL A.G., BARDAWILL C.J., DAVID M.M. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 1949, 177, p. 751-766.
- [111] GUEVARA I., IWANEJKO J., DEMBIŃSKA-KIEĆ A., PANKIEWICZ J., WANAT A., ANNA P., GOŁABEK I., BARTUŚ S., MALCZEWSKA-MALEC M., SZCZUDLIK A. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by simple Griess reaction. *Clin. Chim. Acta*, 1998, 274, p. 177-188.
- [112] GURR M. *Calcium in nutrition/* ed. by ILSI Europe Concise monographs. Brussels : ILSI press : 1999, 40 p.
- [113] HANCOCK R.E.W. Peptide antibiotics. *The Lancet*, 1997, 349, p. 418-422.
- [114] HANCOCK R.E.W., ROZEK A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol. Let.*, 2002, 206, p. 143-149.
- [115] HAQUE Z.U. Importance of peptides for food emulsion stability. *Food polymers, gels and colloids/* ed. by E. Dickinson. The Royal Society of Chemistry : 1991, p. 159-170.
- [116] HATA Y., NAKAJIMA K., UCHIDA J.I., HIDAKA H., NAKANO T. Clinical effects of brown seaweed, *Undaria pinnatifida* (wakame), on blood pressure in hypertensive subjects. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 2001, 30, p. 43-53.

- [117] HATA Y., YAMAMOTO M., OHNI M., NAKAJIMA K., NAKAMURA Y., TAKANO T. A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1996, 64, p. 767-771.
- [118] HAZATO T., KASE R. Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from porcine plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, 139, P. 52-55.
- [119] HEBERDEN W. Some account of a disorder of the heart. *Royal Coll. Phys. (London)*, 1772, 2, p. 59-67.
- [120] HENKE H. *Chromatographic methods. Preparative gel chromatography on Sephadex LH-20*/ ed. by H. Henke. Heidelberg : Hüthig : 1995, 617 p.
- [121] HEMSÉN A., AHLBORG G., OTTOSSON-SEEBERGER A., LUNDBERG J.M. Metabolism of Big endothelin-1 (1-38) and (22-38) in the human circulation in relation to production of endothelin-1 (1-21). *Reg. Peptides*, 1995, 55, p. 287-297.
- [122] HERNÁNDEZ-LEDESMA B., RECIO I., RAMOS M., AMIGO L. Preparation of ovine and caprine β -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *Int. Dairy J.*, 2002, 12, p. 805-812.
- [123] HERNÁNDEZ-LEDESMA B., MARTÍN-ÁLVAREZ P.J., PEUYO E. Assessment of the spectrophotometric method for determination of angiotensin-converting-enzyme activity: influence of the inhibition type. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, p. 4175-4179.
- [124] HERRMANN H.J., ROHDE H.G.E., SCHULZE W., EICHHORN C., LUFT F.C. Effect of noise stress and ethanol intake on hearts of spontaneously hypertensive rats. *Basic Res. Cardiol.*, 1994, 89, p. 510-523.
- [125] HILL A.V. The possible effects of the aggregation of the molecules of hæmoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol. (London)*, 1910, 40, p. IV-VII.
- [126] HOOPER N.M. Angiotensin converting enzyme: Implications from molecular biology for its physiological functions. *Int. J. Biochem.*, 1991, 23, p. 641-647.
- [127] HOUGH J.S., MADDOX I.S. Yeast autolysis process. *Biochemistry*, 1970, May, p. 50-52.
- [128] HOWITZ K.T., BITTERMAN K.J., COHEN H.Y., LAMMING D.W., LAVU S., WOOD J.G., ZIPKIN R.E., CHUNG P., KISIELEWSKI A., ZHANG L.L., SCHERER B., SINCLAIR D.A. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 2003, 425, p. 191-196.
- [129] HSU F.L., LIN Y.H., LEE M.H., LIN C.L., HOU W.C. Both dioscorin, the tuber storage protein of yam (*Dioscorea alata* cv. Tainong No. 1), and its peptic hydrolysates exhibited angiotensin converting enzyme inhibitory activities. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, p. 6109-6113.
- [130] HUNZIKER M.H.L., SALDANA R.L., NEURINGER A. Behavioral variability in SHR and WKY rats as a function of rearing environment and reinforcement contingency. *J. Exp. Anal. Behav.*, 1996, 65, p. 129-144.
- [131] HYUN C.K., SHIN H.K. Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Process. Biochem.*, 2000, 36, p. 65-71.
- [132] IMHOF A., FROELICH M., BRENNER H., BOEING H., PEPYS M.B., Koenig W. Effect of alcohol consumption on systemic markers of inflammation. *The Lancet*, 2001, 357, p. 763-767.
- [133] INSERM. *Expertise collective : Alcool, effet sur la santé*. Paris : Les Editions Inserm : 2001, 358 p.

- [134] INOKUSHI J.I., OKABE H., YAMAUCHI T., NAGAMATSU A., NONAKA G.I., NISHIOKA I. Antihypertensive substance in seeds of *Areca Catechu L.* *Life Sci.*, 1986, 38, p. 1375-1382.
- [135] ISHIBASHI N., ARITA Y., KANEHISA H., KOUGE K., OKAI H., FUKUI S. Bitterness of leucine-containing peptides. *Agric. Biol. Chem.*, 1987a, 51, p. 2389-2394.
- [136] ISHIBASHI N., SADAMORI K., YAMAMOTO O., KANEHISA H., KOUGE K., KIKUCHI E., OKAI H., FUKUI S. Bitterness of phenylalanine- and tyrosine-containing peptides. *Agric. Biol. Chem.*, 1987b, 51, p. 3309-3313.
- [137] ISHIBASHI N., ONO I., KATO K., SHIGENAGA T., SHINODA I., OKAI H., FUKUI S. Role of hydrophobic amino acid residue in the bitterness on peptides. *Agric. Biol. Chem.*, 1988, 52, p. 91-94.
- [138] ISONO Y. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from Masai fermented milk. *Food Sci. Technol. Int.*, 1996, 2, p. 213-216.
- [139] IUPAC-IUB Commission on biochemical nomenclature symbols for amino-acid derivatives and peptides recommendations (1971). *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, p. 977-983.
- [140] JACKSON D.I., LOMBARD P.B. Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality-A review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, p. 409-430.
- [141] JACKSON E.K., GARRISON J.C. Renin and Angiotensin. *The Pharmacological Basis of Therapeutics/* ed. by J.G. HARDMAN, L.E. LIMBIRD, P.B. MOLINOFF, R.W. RUDDON & A. GOODMAN-GILMAN. New York : Mc Graw-Hill Edition : 1996, p. 733-758.
- [142] JONES E.W. Genetic approaches to the study of protease function and proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast genetics fundamental and applied aspects/* ed. by J.F.T. SPENCER, D.M. SPENCER & A.R.W. SMITH. New York : Springer-Verlag Inc : 1983, p. 167-203.
- [143] JONES E.W. The synthesis and function proteases in *Saccharomyces*: genetic approach. *Annu. Rev. Genet.*, 1984, 18, p. 233-270.
- [144] JONES E.W. Tackling the protease problem in *Saccharomyces cerevisiae*. *Method. Enzymol.*, 1991, 194, p. 428-453.
- [145] JONES E.W., WEBB G.C., HILLER M.A. Biogenesis and function of the yeast vacuol. *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces, vol. III, Cell cycle and cell biology/* ed. by J.R. PRINGLE, J.R. BROACH & E.W. JONES. New York : CSHL Press : 1997, p. 363-470.
- [146] JOS A., MORENO I., GONZÁLEZ A.G., REPETTO G., CAMEÁN A.M. Differentiation of sparkling wines (cava and champagne) according to their mineral content. *Talanta*, 2004 (sous presse).
- [147] KARAKI H., DOI K., SUGANO S., UCHIWA H., SUGAI R., MURAKAMI U., TAKEMOTO S. Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1990, 96C, p. 367-371.
- [148] KARAKI H., KUWAHARA M., SUGANO S., DOI C., DOI K., MATSUMURA N., SHIMIZU T. Oral administration of peptides derived from bonito bowels decreases blood pressure in spontaneously hypertensive rats by inhibiting angiotensin converting enzyme. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1993, 104C, p. 351-353.
- [149] KATO H., SUZUKI T. Bradykinin-potentiating peptides from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. Isolation of five bradykinin potentiators and the amino acid sequences of two of them, potentiators B and C. *Biochemistry*, 1971, 10, 972-980.

- [150] KATO H., RHUE M.R., NISHIMURA T. Role of free amino acids and peptides in food taste. *Flavor Chemistry – Trends and developments/* ed. by R. TERANISHI, R.G. BUTTERY & F. SHAHIDI. Washington D.C. : ACS Press, 1989, p. 58-66.
- [151] KATZUNG B.G. Inhibiteurs de l'Angiotensine. *Pharmacologie Fondamentale et Clinique* / ed. par B.G. KATZUNG. Padova : Piccin : 2000, p 178-188.
- [152] KAWAKAMI A., KAYAHARA H., TADASA K. Taste evaluations of angiotensin I converting enzyme inhibitors, Leu-Lys-Tyr analogues. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1995, 59, p. 709-710.
- [153] KAWASAKI T., OSAJIMA K., SEKI E., YOSHIDA M., ASADA K., MATSUI T., OSAJIMA Y. Antihypertensive effect of Val-Tyr, a short chain peptide derived from sardine muscle hydrolysate, on hypertensives. *J. Hypertens.*, 1998, 16 (suppl.2), p. S25.
- [154] KAWASAKI T., SEKI E., OSAJIMA K., YOSHIDA M., ASADA K., MATSUI T., OSAJIMA Y. Antihypertensive effect of Valyl-Tyrosine, a short chain peptide derived from sardine muscle hydrolysate, on mild hypertensive subjects. *J. Hum. Hypertens.*, 2000, 14, p. 519-523.
- [155] KELLY-TREADWELL P.H. Protease activity in yeast: its relationship to autolysis and champagne character. *Aust. Grape. Wine.*, 1988, April, p. 58-66.
- [156] KI T., DROUARD F., GUILBERT J.M. *Vertus biologiques des champagnes*. Montpellier : Sauramps éditions, 1999, 278 p.
- [157] KIM H.S., IN Y.M., JEONG S.G., HAM J.S. Antihypertensive effects of casein hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *J. Anim. Sci. Technol.*, 2002, 44, p. 483-490 (en Coréen, Résumé, tableaux et figures en Anglais).
- [158] KIM S.K., BYUN H.G., PARK P.J., SHAHIDI F. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, p. 2992-2997.
- [159] KIM Y.K., CHUNG B.H. A novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide from human α_{S1} -casein. *Biotechnol. Let.*, 1999, 21, p. 575-578.
- [160] KIM Y.K., YOON S., YU D.Y., LÖNNERDAL B., CHUNG B.H. Novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human α_{S1} -casein expressed in *Escherichia coli*. *J. Dairy Res.*, 1999, 66, p. 431-439.
- [161] KINOSHITA E., YAMAKOSHI J., KIKUCHI M. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1993, 57, p. 1107-1110.
- [162] KIRIMURA J., SHIMIZU A., KIMIZUKA A., NINOMIYA T., KATSUKA N. The contribution of peptides and amino acids to the taste of foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, 1969, 17, p. 689-695.
- [163] KLEVAY L.M. Interactions copper and zinc cardiovascular disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1980, 355, 140-151.
- [164] KLIONSKY D.J., BANTA L.M., EMR S.D. Intracellular sorting and processing of a yeast vacuolar hydrolase: Proteinase A propetide contains vacuolar targeting information. *Mol. Cell. Biol.*, 1988, 8, p. 2105-2116.
- [165] KOHAMA Y., MATSUMOTO S., OKA H., TERAMOTO T., OKABE M., MIMURA T. Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, 155, p. 332-337.
- [166] KOHAMA Y., OKA H., KAYAMORI Y., TSUJIKAWA K., MIMURA T., NAGASE Y., SATAKE M. Potent synthetic analogues of angiotensin-converting enzyme inhibitor derived from tuna muscle. *Agric. Biol. Chem.*, 1991, 55, p. 2169-2170.

- [167] KOHMURA M., NIO N., KUBO K., MINOSHIMA Y., MUNEKATA E., ARIYOSHI Y. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptides of human β -casein. *Agric. Biol. Chem.*, 1989, 53, p. 2107-2114.
- [168] KOTCHEN T.A., MC CARRON D.A. Dietary electrolytes and blood pressure. A statement for healthcare professionals from the American heart association nutrition committee. *Circulation*, 1998, 98, p. 613-617.
- [169] KUWABARA Y., NAGAI S., YOSHIMITSU N., NAKAGAWA I., WATANABE Y., TAMAI Y. Antihypertensive effect of the milk fermented by culturing with various lactic acid bacteria and a yeast. *J. Ferment. Bioeng.*, 1995, 80, p. 294-295.
- [170] LAGACE L.S., BISSON L.F. Survey of yeast acid proteases for effectiveness of wine haze reduction. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1990, 41, p. 147-155.
- [171] LAKKIS J., VILLOTA R. A study on the foaming and emulsifying properties of whey protein hydrolysates. *Food emulsion and foams: theory and practice/* ed. by AIChE Symposium Series 277. New York : American Institute of Chemical Engineers, 1990, p. 87-101.
- [172] LANTZ I., GLÄMSTA E.L., TALBÄCK L., NYBERG F. Hemorphins derived from hemoglobin have an inhibitory action on angiotensin converting enzyme activity. *FEBS*, 1991, 287, p. 39-41.
- [173] LEBLONDEL G., ALLAIN P. Altered element concentrations in tissues of spontaneously hypertensive rats. *Biomed. Pharmacother.*, 1988, 42, p. 121-129.
- [174] LECLERC P.L., GAUTHIER S.F., BACHELARD H., SANTURE M., ROY D. Antihypertensive activity of casein-enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. *Int. Dairy J.*, 2002, 12, p. 995-1004.
- [175] LEE HS AND LEE K.J. Cathepsin B inhibitory peptides derived from β -casein. *Peptides*, 2000, 21, p. 807-809
- [176] LEE J.R., KWON D.Y., SHIN H.K., YANG C.B. Purification and identification of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide from kidney bean protein hydrolysate. *Food Sci. Biotechnol.*, 1999, 8, p. 172-178.
- [177] LEE V.H.L. Membrane transporters. *Eur. J. Pharmaceut. Sci.*, 2000, 11 (suppl.2), p. S41-S50.
- [178] LEONIL J., MAUBOIS J.L. Milk-derived bioactive peptides and proteins: future perspectives. *Sci. Aliment*, 2002, 22, p. 383-392.
- [179] LEROY M.J. Incidence de la nature des souches de levure et des conditions de préparation des levains sur les phénomènes d'autolyse dans le champagne. *Thèse de doctorat* : Dijon : 1986, 241 p.
- [180] LEROY M.J., CHARPENTIER M., DUTUERTRE B., FEUILLAT M., CHARPENTIER C. Yeast autolysis during champagne aging. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1990, 41, p. 21-28.
- [181] LI C.H., MATSUI T., MATSUMOTO K., YAMASAKI R., KAWASAKI T. Latent production of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from buckwheat protein. *J. Pep. Sci.*, 2002, 8, p. 267-274.
- [182] LIU J.C., HSU F.L., TSAI J.C., CHAN P., LIU J.Y.H., NEIL THOMAS G., TOMLINSON B., LO M.Y., LIN J.Y. Antihypertensive effects of tannins isolated from traditional chinese herbs as non-specific inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Life Sci.*, 2003, 73, p. 1543-1555.
- [183] LOYKE H.F. Copper and zinc in experimental hypertension. *Biol. Trace Elem. Res.*, 1991, 29, p. 45-49.

- [184] LUGUERA C., MORENO-ARRIBAS V., PUEYO E., POLO M.C. Capillary electrophoretic analysis of wine proteins. Modifications during the manufacture of sparkling wines. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45, p. 3766-3770.
- [185] LURTON L. Etude de la protéolyse intervenant au cours du processus d'autolyse chez *Saccharomyces cerevisiae*. Applications œnologiques. *Thèse de doctorat* : Dijon : 1987, 160 p.
- [186] LURTON L., GUERREAU J. Etude de la protéolyse des levure de vinification lors de l'élevage des vins sur ses lies. *Rev. Fr. Oenol.*, 1988, 113, p. 35-41.
- [187] LURTON L., SEGAN J.P., FEUILLAT M. Proetolysis during the autolysis of yeast under acidic conditions. *Sci. Aliment.*, 1989, 9, p. 111-124.
- [188] LÜSCHER T.F., VANHOUTTE P.M. *The Endothelium: Modulator of Cardiovascular function/* ed. by T.F. LÜSCHER, P.M. VANHOUTTE. Boca Raton (USA) : CRC Press : 1990, 248 p.
- [189] LÜSHER T.F., BARTON M. Biology of the endothelium. *Clin. Cardiol.*, 1997, 20 suppl.2), p. 3-10.
- [190] MAENO M., YAMAMOTO N., TAKANO T. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.*, 1996, 79, p. 1316-1321.
- [191] MARCZAK E.D., USUI H., FUJITA H., YANG Y., YOKOO M., LIPKOWSKI A.W., YOSHIKAWA M. New antihypertensive peptides isolated from rapeseed. *Peptides*, 2003, 24, p. 791-798.
- [192] MARÍN J., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ M.A. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol. Ther.*, 1997, 75, p. 111-134.
- [193] MARTIN D.S., BREITKOPF N.P., EYSTER K.M., WILLIAMS J.L. Dietary soy exerts an antihypertensive effect in spontaneously hypertensive female rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2001a, 281, p. R553-R560.
- [194] MARTIN S., DIEBOLT M., ANDRIANTSITOHAINA R. Consommation modérée d'alcool et maladies cardiovasculaires. *Pathol. Biol.*, 2001b, 49, p. 769-774.
- [195] MARTIN S., ANDRIANTSITOHAINA R. Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Ann. Cardiol. Angéiol.*, 2002, 51, p. 304-315.
- [196] MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ A.J., POLO M.C. Characterization of the nitrogen compounds released during yeast autolysis in a model wine system. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, p. 1081-1085.
- [197] MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ A.J., POLO M.C., CARRASCOSA A.V. Structural and ultrastructural changes in yeast cells during autolysis in a model wine system and in sparkling wines. *Int. J. Food Microbiol.*, 2001, 71, p. 45-51
- [198] MARUYAMA S., SUZUKI H. A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.*, 1982, 46, p. 1393-1394.
- [199] MARUYAMA S., MITACHI H., TANAKA H., TOMIZUKA N., SUZUKI H. Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from casein. *Agric. Biol. Chem.*, 1987, 51, p. 1581-1586.
- [200] MARUYAMA S., MIYOSHI S., TANAKA H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from *Ficus carica*. *Agric. Biol. Chem.*, 1989b, 53, p. 2763-2767.
- [201] MARUYAMA S., MIYOSHI S., KANEKO T., TANAKA H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of synthetic peptides related to the tandem repeated sequence of a maize endosperm protein. *Agric. Biol. Chem.*, 1989a, 53, p. 1077-1081.

- [202] MARUYAMA S., NAKAGOMI K., TOMIZUKA N., SUZUKI H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.*, 1985, 49, p. 1405-1409.
- [203] MASUDA O., NAKAMURA Y., TAKANO T. Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr.*, 1996, 126, p. 3063-3068.
- [204] MATOBA N., USUI H., FUJITA H., YOSHIKAWA M. A novel anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin induces nitric oxide-mediated vasorelaxation in an isolated SHR mesenteric artery. *FEBS Lett.*, 1999, 452, p. 181-184.
- [205] MATSUFUJI H., MATSUI T., OHSHIGE S., KAWASAKI T., OSAJIMA K., OSAJIMA Y. Antihypertensive effects of angiotensin fragments in SHR. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1995, 59, p. 1398-1401.
- [206] MATSUFUJI H., MATSUI T., SEKI E., OSAJIMA K., NAKASHIMA M., OSAJIMA Y. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolysate derived from sardine muscle. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1994, 58, p. 2244-2245.
- [207] MATSUI T., LI C.H., OSAJIMA Y. Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I-converting enzyme inhibition from wheat germ. *J. Pept. Sci.*, 1999, 5, p. 289-297.
- [208] MATSUI T., LI C.H., TANAKA T., MAKI T., OSAJIMA Y., MATSUMOTO K. Depressor effect of wheat germ hydrolysate and its novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide, Ile-Val-Tyr, and the metabolism in rat and human plasma. *Biol. Pharm. Bull.*, 2000, 23, p. 427-431.
- [209] MATSUI T., OSAJIMA Y., UEZONO K., KAWASAKI T. Metabolism of endogenous val-tyr with antihypertensive effect in human plasma. *J. Hypertens.*, 1998, 16 (Suppl.2), p. S138.
- [210] MATSUI T., TAMAYA K., SEKI E., OSAJIMA K., MATSUMOTO K., KAWASAKI T. Val-Tyr as a natural antihypertensive dipeptide can be absorbed into the human circulatory blood system. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2002b, 29, p. 204-208.
- [211] MATSUI T., YUKIYOSHI A., DOI S., SUGIMOTO H., YAMADA H., MATSUMOTO K. Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR. *J. Nutr. Biochem.*, 2002a, 13, p. 80-86.
- [212] MATSUMURA N., FUJII M., TAKEDA Y., SHIMIZU T. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1993b, 57, p. 1743-1744.
- [213] MATSUMURA N., FUJII M., TAKEDA Y., SUGITA K., SHIMIZU T. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels autolysate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1993a, 57, p. 695-697.
- [214] MATTHEWS D.M., ADIBI S.A. Peptide absorption. *Gastroenterology*, 1976, 71, p. 151-161.
- [215] MATTHEWS J.N.S., ALTMAN D.G., CAMPBELL M.J., ROYSTON P. Analysis of serial measurements in medical research. *Brit. Med. J.*, 1990, 300, p. 230-235.
- [216] MAUBOIS J.L., LEONIL J., TROUVE R., BOUHALLAB S. Les peptides du lait à activité physiologique III. Peptides du lait à effet cardiovasculaire : activité antithrombotique et antihypertensive. *Lait*, 1991, 71, p. 249-255.
- [217] MAZUR R.H., SCHLATTER J.M., GOLDKAMP A.H.J. Structure-taste relationships of some dipeptides. *J. Am. Chem. Soc.*, 1969, 91, p. 2684-2691.

- [218] MC SWEENEY P.L.H., SOUSA M.J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review. *Lait*, 2000, 80, p. 293-324.
- [219] MEISEL H. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers*, 1997, 43, p. 119-128.
- [220] MENDES A., DESGRANGES C., CHÈZE C., VERCAUTEREN J., FRESLON J.L. Vasorelaxant effects of grape polyphenols in rat isolated aorta. Possible involvement of a purinergic pathway. *Fund. Clin. Pharmacol.*, 2003, 17, p. 673-681.
- [221] MILLERY A., DUTEURTRE B., BOUDAILLE J.P., MAUJEAN A. Différentiation des trois cépages champenois à partir de l'analyse des acides aminés libres des moûts des récoltes 1983 et 1984. *Rev. Fr. Oenol.*, 1986, 103 (cahier scientifique), p. 32-50.
- [222] MITO K., FUJII M., KUWAHARA M., MATSUMURA N., SHIMIZU T., SUGANO S., KARAKI H. Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from hemoglobin. *Eur. J. Pharmacol.*, 1996, 304, p. 93-98.
- [223] MIYAUCHI T., MASAKI T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu. Rev. Physiol.*, 1999, 61, p. 391-415.
- [224] MIYOSHI S., ISHIKAWA H., KANEKO T., FUKUI F., TANAKA H., MARUYAMA S. Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in a α -zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, 1991a, 55, 1313-1318.
- [225] MIYOSHI S., KANEKO T., YOSHIKAWA Y., FUKUI F., TANAKA H., MARUYAMA S. Hypotensive activity of enzymatic α -zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, 1991b, 55, p. 1407-1408.
- [226] MOLINA E., RAMOS M., ALONSO L., LOPEZ-FANDIÑO R. Contribution of low molecular weight water soluble compounds to the taste of cheeses made of cows', ewes' and goats' milk. *Int. Dairy J.*, 1999, 9, p. 613-621.
- [227] MONETON P., SARTHOU P., LE GOFFIC F. Transport and hydrolysis of peptides in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, 1986, 132, p. 2147-2153.
- [228] MOON S.K., CHO G.O., JUNG S.Y., GAL S.W., KWON T.K., LEE Y.C., MADAMANCHI N.R., KIM C.H. Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells: role of ERK1/2, cell-cycle regulation, and matrix metalloproteinase-9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 301, p. 1069-1078.
- [229] MORENO-ARRIBAS M.V., PUEYO E., POLO M.C. Peptides in must and wines. Changes during the manufacture of cavas (sparkling wines). *J. Agric. Food Chem.*, 1996; 44: p. 3783-3788.
- [230] MORENO-ARRIBAS M.V., BARTOLOMÉ B., PUEYO E., POLO M.C. Isolation and characterization of individual peptides from wine. *J. Agric. Food Chem.*, 1998a 46, p. 3422-3425.
- [231] MORENO-ARRIBAS M.V., PUEYO E., POLO M.C. Analytical methods for the characterization of proteins and peptides in wines. *Anal. Chim. Acta*, 2002, 458, p. 63-75.
- [232] MORENO-ARRIBAS M.V., PUEYO E., POLO M.C., MARTÍN-ÁLVAREZ P.J. Changes in the amino acid composition of the different nitrogenous fractions during the aging of wine with yeasts. *J. Agric. Food Chem.*, 1998b, 46, p. 4042-4051.
- [233] MULLALLY M.M., MEISEL H., FITZGERALD R.J. Synthetic peptides corresponding to α -lactalbumin and β -lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1996, 377, p. 259-260.

- [234] MULLALLY M.M., MEISEL H., FITZGERALD R.J. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *Int. Dairy J.*, 1997a, 7, p. 299-303.
- [235] MULLALLY M.M., MEISEL H., FITZGERALD R.J. Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin. *FEBS Let.*, 1997b, 402, p. 99-101.
- [236] MURAKAMI T., SOGA M., MITSUNAGA T., YOSHIZUMI H., ITO H. The vascular tissue angiotensin I-converting enzyme activity and aortic elastin content in stroke-prone spontaneously hypertensive rats fed fish diet. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 1994, 21, p. 453-461.
- [237] NAGEL C.W., WULF L.W. Changes in the anthocyanins, flavonoids and hydroxycinnamic acid esters during fermentation and aging of merlot and cabernet sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1979, 30, p. 111-116.
- [238] NAIDER F., BECKER J.M., KATZIR-KATCHALSKI E. Utilization of methionine-containing peptides and their derivatives by a methionine-requiring auxotroph of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, p. 9-20.
- [239] NAKAGOMI K., EBISU H., SADAKANE Y., FUJII N., AKISAWA T., TANIMURA T. Properties and human origin of two angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from a tryptic hydrolysate of human serum albumin. *Biol. Pharm. Bull.*, 2000b, 23, p. 879-883.
- [240] NAKAGOMI K., FUJIMURA A., EBISU H., SAKAI T., SADAKANE Y., FUJII N., TANIMURA T. Acein-1, a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide isolated from tryptic hydrolysate of human plasma. *FEBS Let.*, 1998, 438, p. 255-257.
- [241] NAKAGOMI K., YAMADA R., EBISU H., SADAKANE Y., AKISAWA T., TANIMURA T. Isolation of acein-2, a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide derived from a tryptic hydrolysate of human plasma. *FEBS Let.*, 2000a, 467, p. 235-238.
- [242] NAKAGOMI K., TAKATSU K., TAKAGI S., EBISU H., SADAKANE Y., FUJII N., AKIZAWA T., TANIMURA T., HATANAKA Y. Isolation of cathepsin B inhibitory peptides, Cabin-A1 and -A2, from a tryptic and chymotryptic hydrolysate of human serum albumin. *Peptides*, 2002, 23, p. 1567-1571.
- [243] NAKAMURA Y., MASUDA O., TAKANO T. Decrease of tissue angiotensin I-converting enzyme activity upon feeding sour milk in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1996, 60, p. 488-489
- [244] NAKAMURA Y., YAMAMOTO N., SAKAI K., TAKANO T. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *J. Dairy Sci.*, 1995b, 78, p. 1253-1257.
- [245] NAKAMURA Y., YAMAMOTO N., SAKAI K., OKUBO A., YAMASAKI S., TAKANO T. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci.*, 1995a, 78, p. 777-783.
- [246] NAKASHIMA Y., ARIHARA K., SASAKI A., MIO H., ISHIKAWA S., ITOH M. Antihypertensive activities of peptides derived from porcine skeletal muscle myosin in spontaneously hypertensive rats. *J. Food Sci.* 2002, 67, p. 434-437.
- [247] NATESH R., SCHWAGER S.L.U., STURROCK E.D., ACHARYA K.R. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature*, 2003, 421, p. 551-554.

- [248] NORRIE P.A. The history of wine as medicine. *Wine, a scientific exploration/* ed. by M. SANDLER & R. PINDER. New York and London : Taylor and Francis Editions : 2003, p. 21-55.
- [249] NOVEL G. Les perspectives ouvertes à l'industrie par la génétique moléculaire et le génie génétique des bactéries lactiques. *Microbiologie Alimentaire, Tome 2 : Aliments fermentés et fermentations alimentaires/* ed. C.M. BOURGEOIS & J.P. LARPENT. Paris : Lavoisier Tec & Doc : 1996, p. 482-509.
- [250] NYBERG F., SANDERSON K., GLÄMSTA E.L. The hemorphins: a new class of opioid peptides derived from blood protein hemoglobin. *Biopolymers*, 1997, 43, p. 147-156.
- [251] OH H., KANG D.G., LEE S., LEE H.S. Angiotensin converting enzyme inhibitors from *Cuscuta japonica* Choisy. *J. Ethnopharmacol.*, 2002, 83, p. 105-108.
- [252] OKAMOTO A., HANAGATA H., KAWAMURA Y., YANAGIDA F. Anti-hypertensive substances in fermented soybean, natto. *Plant Food Hum. Nutr.*, 1995b, 47, p. 39-47.
- [253] OKAMOTO A, MATSUMOTO E, IWASHITA A, YASUHARA T., KAWAMURA Y., KOIZUMI Y., YANAGIDA F. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory action of fish sauce. *Food Sci. Technol. Int.*, 1995a, 1, p. 101-106.
- [254] OHYAMA S., ISHIBASHI N., TAMURA M., NISHIZAKI H., OKAI H. Synthesis of bitter peptides composed of aspartic acid and glutamic acid. *Agric. Biol. Chem.*, 1988, 52, p. 871-872.
- [255] O'LEARY D.S., WANG G. Impaired thermoregulatory cutaneous vasodilatation in spontaneously hypertensive rats. *J. Appl. Physiol.*, 1994, 77, p. 692-696.
- [256] ONDETTI M.A., RUBIN B., CUSHMAN D.W. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: New class of orally active antihypertensive agents. *Science*, 1977, 196, p. 441-444.
- [257] OSHIMA G., SHIMABUKURO H., NAGASAWA K. Peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, 566, p. 128-137.
- [258] PAGE C.L., CURTIS M.J., WALKER M.J., SUTTER M.C., HOFFMAN B.B. Physiopathologie et maladies cardiovasculaires. *Pharmacologie intégrée*. Bruxelles : De Boeck Université : 1999, p. 153-196.
- [259] PARK E., WON M., LEE H.H., SONG K.B. Angiotensin converting enzyme inhibitory pentapeptide isolated from supernatant of pig plasma treated by trichloroacetic acid. *Biotechnol. Tech.*, 1996, 10, p. 479-480.
- [260] PAULETTI G.M., GANGWAR S., OKUMU F.W., SIAHAAN T.J., STELLA V.J., BORCHARDT R.T. Esterase-sensitive cyclic prodrugs of peptides: Evaluation of an acyloxyalkoxy moiety in a model hexapeptide. *Pharmaceut. Res.*, 1996, 13, p. 1615-1623.
- [261] PERROT L., CHARPENTIER M., CHARPENTIER C., FEUILLAT M., CHASSAGNE D., Yeast adapted to wine: Nitrogen compounds released during induced autolysis in a model wine. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, 29, p 134-139.
- [262] PETRITIS K., BRUSSAUX S., GUENU S., ELFAKIR C., DREUX M. Ion-pair reversed-phase liquid chromatography–electrospray mass spectrometry for the analysis of underivatized small peptides. *J. Chromatogr. A*, 2002, 957, p. 173-185
- [263] PIHLANTO-LEPPÄLÄ A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends Food Sci. Technol.*, 2001, 11, p. 347-356.
- [264] PIHLANTO-LEPPÄLÄ A., KOSKINEN P., PIILOLA K., TUPASELA T., KORHONEN H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *J. Dairy Res.*, 2000 67, p. 53-64.

- [265] PIHLANTO-LEPPÄLÄ A., ROKKA T., KORHONEN H. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *Int. Dairy J.*, 1998, 8, p. 325-331.
- [266] PITON F., CHARPENTIER M., TROTON D. Cell wall and lipid changes in *Saccharomyces cerevisiae* during aging of champagne wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1988, 39, p. 221-226.
- [267] POPINEAU Y., HUCHET B., LARRÉ C., BÉROT S. Foaming and emulsifying properties of fraction of gluten peptides obtained by limited enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. *J. Cereal Sci.*, 2002, 35, p. 327-335.
- [268] POUX C., OURNAC A. Acides aminés libres et polypeptides du vin. *Ann. Technol. Agric.*, 1970, 19, p. 217-237.
- [269] POWERS J.P.S., HANCOCK R.E.W. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*; 2004 (sous presse).
- [270] POZO-BAYÓN M.A., HERNÁNDEZ M.T., MARTÍN-ÁLVAREZ P.J., POLO M.C. Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines manufactured with red and white grape varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, p. 2089-2095.
- [271] POZO-BAYÓN M.A., POLO M.C., MARTÍN-ÁLVAREZ P.J., PUEYO E. Effect of vineyard yield on the composition of sparkling wines produced from the grape cultivar Parellada. *Food Chem.*, 2004, 86, p. 413-419.
- [272] RAMKUMAR C., AGBOOLA S.O., SINGH H., MUNRO P.A., SINGH A.M. On the stability of oil-in-water emulsions formed using highly hydrolysed whey protein. *Food emulsion and foams. Interfaces, interactions and stability/* ed. by E. DICKINSON & J.M. RODRIGUEZ PATINO. Cambridge : Royal Society of Chemistry : 1999, p. 117-128.
- [273] RIBERAU-GAYON P., DUBOURDIEU D., DONECHE B., LONVAUD A., GLORIE Y., MAUJEAN A. *Traité d'œnologie, Tome 1 et 2*. Paris : Dunod : 1998, 1136 p.
- [274] RIMM E.B., WILLIAMS P., FOSHER K., CRIQUI M., STAMPFER M.J. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *Brit. Med. J.*, 1999, 319, p. 1523-1528.
- [275] ROHDE L.E.P., HENNEKENS C.H., RIDKER P.M. Survey of C-reactive protein and cardiovascular risk factors in apparently healthy men. *Am. J. Cardiol.*, 1999, 84, p. 1018-1022.
- [276] ROUDOT-ALGARON F. Le goût des acides aminés, des peptides et des protéines : exemple de peptides sapides dans les hydrolysats de caséines. *Lait*, 1996, 76, p. 313-348.
- [277] RUBIO-ALIAGA I., DANIEL H. Mammalian peptide transporters as target for drug delivery. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2002, 23, p. 434-440.
- [278] RUTHERFURD K.J., GILL H.S. Peptides affecting coagulation. *Brit. J. Nutr.*, 2000, 84 (suppl.1), p. S99-S102.
- [279] RYHÄNEN E.L., PIHLANTO-LEPPÄLÄ A., PAHKALA E. A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *Int. Dairy J.*, 2001, 11, p. 441-447.
- [280] SAIGA A., KANDA K., WEI Z., OKUMURA T., KANEKO T., NISHIMURA T. Hypotensive activity of muscle protein and gluten hydrolysates obtained by protease treatment. *J. Food Biochem.*, 2002, 26, p. 391-401.
- [281] SAIGA A., OKUMURA T., MAKIHARA T., KATSUTA S., SHIMIZU T., YAMADA R., NISHIMURA T. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in a hydrolyzed chicken breast muscle extract. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, p. 1741-1745.

- [282] SAITO M., KAWAI M., HAGINO H., OKADA J., YAMAMOTO K., HAYASHIDA M., IKEDA T. Antihypertensive effect of Nori-peptides derived from red alga *Porphira Yessoensis* in hypertensive patients. *Am. J. Hypertens.*, 2002, 15, p. 210A.
- [283] SAITO T., NAKAMURA T., KITAZAWA H., KAWAI Y., ITOH T. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *J. Dairy Sci.*, 2000, 83, p. 1434-1440.
- [284] SAITO Y., WANEZAKI K., KAWATO A., IMAYASU S. Antihypertensive effects of peptide in sake and its by-products on spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1994a, 58, p. 812-816.
- [285] SAITO Y., WANEZAKI K., KAWATO A., IMAYASU S. Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1994b, 58, p. 1767-1771.
- [286] SALLES C., HERVE C., SEPTIER C., DEMAIZIERES D., LESSCHAEVE I., ISSANCHOU S., LE QUERE J.L. Evaluation of taste compounds in water-soluble extract of goat cheeses. *Food Chem.*, 2000, 68, p. 429-435.
- [287] SÁNCHEZ-VIOQUE R., BAGGER C.L., RABILLER C., GUÉGUEN J. Foaming properties of acylated rapeseed (*Brassica napus* L.) hydrolysates. *J. Colloid. Interface Sci.*, 2001, 244, p. 386-393.
- [288] SÁNCHEZ-VIOQUE R., BAGGER C.L., LARRÉ C., GUÉGUEN J. Emulsifying properties of acylated rapeseed (*Brassica napus* L.) peptides. *J. Colloid. Interface Sci.*, 2004 (sous presse).
- [289] SATAKE M., ENJOH M., NAKAMURA Y., TAKANO T., KAWAMURA Y., ARAI S., SHIMIZU M. Transepithelial transport of the bioactive tripeptide, Val-Pro-Pro, in human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2002, 66, p. 378-384.
- [290] SATO M., SUZUKI Y., HANAMURE K.I., KATOH I., YAGI Y., OSTUKA K.I. Winemaking from koshu variety by the sur lies method: behavior of free amino acids and proteolytic activities in the wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1997, 48, p. 1-6.
- [291] SATO M., HOSOKAWA T., YAMAGUCHI T., NAKANO T., MURAMOTO K., KAHARA T., FUNAYAMA K., KOBAYASHI A., NAKANO T. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from wakame (*Undaria pinnatifida*) and their antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.*, 2002b, 50, p. 6245-6252.
- [292] SATO M., OBA T., YAMAGUSHI T., NAKANO T., KAHARA T., FUNAYAMA K., KOBAYASHI A., NAKANO T. Antihypertensive effects of hydrolysates of wakame (*Undaria pinnatifida*) and their angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Ann. Nutr. Metab.*, 2002a, 46, 259-267.
- [293] SCHLIENGER J.L. Alcool et système cardiovasculaire : mécanisme des effets protecteurs. *Pathol. Biol.*, 2001, 49, p. 764-768.
- [294] SEKI E., OSAJIMA K., MATSUFUJI H., MATSUI T., OSAJIMA Y. Angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of the short chain peptides derived from various food proteins. *Nip. Shok. Kaga. Koga. Kaishi*, 1996, 43, p. 839-840 (en Japonais, Résumé et figures en Anglais.).
- [295] SEKI E., KAWASAKI T., YOSHIDA M., OSAJIMA K., TAMAYA K., MATSUI T., OSAJIMA Y. Antihypertensive effect of sardine peptide and Val-Tyr in spontaneously hypertensive rats. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, 1999, 52, p. 271-277 (en Japonais, Résumé et figures en Anglais.).

- [296] SEKIYA S., KOBAYASHI Y., KITA E., IMAMURA Y., TOYAMA S. Antihypertensive effects of tryptic hydrolysate of casein on normotensive and hypertensive volunteers. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, 1992, 45, p. 513-517 (en Japonais, Résumé et figures en anglais).
- [297] SEPPO L., JAUHAINEN T., POUSSA T., KORPELA R. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003, 77, p. 326-330.
- [298] SEPPO L., KEROJOKI O., SUOMALAINEN T., KORPELA R. The effect of a *Lactobacillus helveticus* LBK-16 H fermented milk on hypertension – a pilot study on humans. *Milchwissenschaft*, 2002, 53, p. 124-127.
- [299] SESOKO S., KANEKO Y. Cough associated with the use of captopril. *Arch. Intern. Med.*, 1985, 145, p. 1524.
- [300] SHAPIRO A.P. Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme in the Management of Hypertension. *Clinical Studies in Medical Biochemistry/* ed. by R.H. GLEW, S.P. PETERS. New York : Oxford University Press : 1987, p. 241-252.
- [301] SHIN Z.I., YU R., PARK S.A., CHUNG D.K., AHN C.W., NAM H.S., KIM K.S., LEE H.J. His-His-Leu, an angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from korean soybean paste, exerts antihypertensive activity in vivo. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, p. 3004-3009.
- [302] SHUKLA R., CHERYAN M. Zein: the industrial protein from corn. *Ind. Crop Prod.*, 2001, 13, p. 171-192.
- [303] SILVA A., FUMI M.D., MONTESISSA G., COLOMBI M.G., COLAGRANDE O. Incidence de la conservation en présence de levures sur la composition des vins mousseux. *Conn. Vigne Vin*, 1987, 21, p. 141-162.
- [304] SIMPSON W.J., HUGHES P.S. Stabilization of foams by hop-derived bitter acids chemical interactions in beer foams. *Cerevisiae Biotechnol.*, 1994, 19, p. 39-44.
- [305] SINGLETON V.L., TROUSDALE E. White wine phenolics: varietal and processing differences as shown by HPLC. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1983, 34, p. 27-34.
- [306] SIPOLA M., FINCKENBERG P., KORPELA R., VAPAATALO H., NURMINEN M.L., Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *J. Dairy Res.*, 2002, 69, p 103-111.
- [307] SIPOLA M., FINCKENBERG P., SANTISTEBAN J., KORPELA R., VAPAATALO H., NURMINEN M.L. Long-term intake of milk peptides attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2001, 52, p. 745-754.
- [308] SMACCHI E., GOBBETTI M. Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiol.*, 2000, 17, p. 129-141.
- [309] SMULDER P.E.A., CAESSENS P.W.J.R., WALSTRA P. Emulsifying properties of β -casein and its hydrolysates in relation to their molecular properties. *Food emulsion and foams. Interfaces, interactions and stability/* ed. by E. DICKINSON & J.M. RODRIGUEZ-PATINO. Cambridge : Royal Society of Chemistry : 1999, p. 61-69.
- [310] SOUFLEROS E.H., BOULOUMPASI E., TSARCHOPOULOS C., BILIADERIS C.G. Primary amino acid profiles of Greek white wines and their use in classification according to variety, origin and vintage. *Food Chem.*, 2003, 80, p. 261-273.
- [311] ST LEGER A.S., COCHRANE A.L., MOORE F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *The Lancet*, 1979, 313, p. 1017-1020.

- [312] STEPIEN M., WITTE K., LEMMER B. Chronobiologic evaluation of Angiotensin-Converting Enzyme activity in serum and lung tissue from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Chronobiol. Int.*, 1993, 10, p. 331-337.
- [313] SUETSUNA K. Effects of an oral administration of tripeptides derived from sardine muscle, soybean and pig plasma on blood pressures in hypertensive rats, and angiotensin I-converting enzyme inhibitors. *Clin. Report*, 1991a, 25, p. 2245-2261 (en Japonais, Figures en Anglais).
- [314] SUETSUNA K. Biological properties of angiotensin I-converting enzyme inhibitors, an octapeptide derived from sardine muscle. *Clin. Report*, 1991b, 25, p. 3422-3428.
- [315] SUETSUNA K. Purification and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from the red alga *Porphyra yezoensis*. *J. Mar. Biotechnol.*, 1998a, 6, p. 163-167.
- [316] SUETSUNA K. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitor dipeptides derived from *Allium sativum* L (garlic). *J. Nutr. Biochem.*, 1998b, 9, p. 415-419.
- [317] SUETSUNA K., CHEN J.R. Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. *Mar. Biotechnol.*, 2001, 3, p. 305-309.
- [318] SUETSUNA K., NAKANO T. Identification of an antihypertensive peptide from peptic digest of wakame (*Undaria pinnatifida*). *J. Nutr. Biochem.*, 2000, 11, p. 450-454.
- [319] SUETSUNA K., OSAJIMA K. Blood pressure reduction and vasodilatory effects *in vivo* of peptides originating from sardine muscle. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, 1989, 42, p. 47-54 (en Japonais, Résumés et figures en Anglais).
- [320] SUH H.J., WHANG J.H., LEE H. A peptide from corn gluten hydrolysate that is inhibitory toward angiotensin I converting enzyme. *Biotechnol. Lett.*, 1999, 21, p. 1055-1058.
- [321] SUNG K.C., SUH J.Y., KIM B.S., HANG J.H., KIM H., LEE M.H., PARK J.R., KIM S.W. High sensitivity C-reactive protein as an independent risk factor for essential hypertension. *Am. J. Hypertens.*, 2003, 16, p. 429-433.
- [322] TAKAYANAGI T., YOKOTSUKA K. Angiotensin I converting enzyme-inhibitory peptides from wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1999, 50, p. 65-68.
- [323] TAPIERO H., TEW K.D., NGUYEN BA G., MATHÉ G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed. Pharmacother.*, 2002, 56, p. 200-207.
- [324] TAUZIN J., MICLO L., GAILLARD J.L. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine α_{S2} -casein. *FEBS Lett.*, 2002, 531, p. 369-374.
- [325] TAYLOR J.A., BRUTON C.J., ANDERSON J.K., MOLE J.E., DE BEER F.C., BALTZ M.L., PEPYS M.B. Amino acid sequence homology between rat and human C-reactive protein. *Biochem. J.* 1984, 221, p. 903-906.
- [326] TEICHERT U., MECHLER H., MULLER H., WOLF D.H. Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation and cell survival. *J. Biol. Chem.*, 1989, 264, p. 16037-16045.
- [327] THE MERCK Index, an encyclopedia of chemicals, drugs and biochemicals, 13th edition/ eds. by M.J. O'NEIL, A. SMITH, P.E. HECKELMAN, J.R. OBENCHAIN JR, J.A.R. GALLIPEAU, M.A. D'ARECA, S. BUDAVARI. Whitehouse Station, NJ (USA) : Merck & Co., INC : 2001, 2564 p.

- [328] THUN M.J., PETO R., LOPEZ A.D., MONACO J.H., HENLEY S.J., HEATH C.W. JR, DOLL R. Alcohol consumption and mortality among middle-aged and elderly U.S. adults. *New Engl. J. Med.*, 1997, 11, p. 1705-1714.
- [329] TODD B.E.N. Aspects of the yeast autolysis in sparkling wine production. *Proceeding: Ninth Australian Wine industry Technical Conference* ed. by C.S. STOCKLEY. Adélaïde : 1996, p. 33-38.
- [330] TOME D. Peptides fonctionnels. *Danone World Newsletter*, 1998, n°17.
- [331] TORIJA M.J., BELTRAN G., NOVO M., POBLET M., ROZÈS N., MAS A., GUILLAMÓN J.M. Effect of organic acids and nitrogen source on alcoholic fermentation: study of their buffering capacity. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, p. 916-922.
- [332] TOUYZ R.M., MILNE F.J. Magnesium supplementation attenuates, but does not prevent, development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.*, 1999, 12, p. 757-765.
- [333] TROTON D., CHARPENTIER M., ROBILLARD B., CALVAYRAC R., DUTEURTRE B. Evolution of the lipid contents of champagne wine during the second fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitc.*, 1989, 40, p. 175-182.
- [334] TSUDA K., SHIMA H., KUCHII M., NISHIO I., MASUYAMA Y. Effects of captopril on neurosecretion and vascular responsiveness in hypertension. *Clin. Exp. Theory Prac.*, 1987, A9 (2&3), p. 375-379.
- [335] TURGEON S.L., GAUTHIER S.F., PAQUIN P. Interfacial and emulsifying properties of whey peptide fractions obtained with a two-step ultrafiltration process. *J. Agric. Food Chem.*, 1991, 39, p. 673-676.
- [336] TURGEON S.L., GAUTHIER S.F., MOLLÉ D., LEONIL J. Interfacial properties of tryptic peptides of β -lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.*, 1992, 40, p. 669-675.
- [337] VAN DEN HAZEL H.B., KIELLAND-BRAND M.C., WINTHER J.R. Biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. *Yeast*, 1996, 12, p. 1-6.
- [338] VAN DER VEN C., GRUPPEN H., DE BONT D.B.A., VORAGEN A.G.J. Emulsion properties of casein and whey protein hydrolysates and the relation with other hydrolysate characteristics. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, 5005-5012.
- [339] VASDEV S., LONGERICH L., SINGAL P. Nutrition and hypertension. *Nutr. Res.*, 2002, 22, p. 111-123.
- [340] VASKONEN T. Dietary minerals and modification of cardiovascular risk factors. *J. Nutr. Biochem.*, 2003, 14, p. 492-506.
- [341] VERMEIRSEN V., VAN CAMP J., VERSTRAETE W. Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2002a, 51, p. 75-87.
- [342] VERMEIRSEN V., DEPLANCKE B., TAPPENDEN K.A., VAN CAMP J., GASKINS H.R., VERSTRAETE W. Intestinal transport of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg through a Caco-2 Bbe monolayer. *J. Pept. Sci.*, 2002b, 8, p. 95-100.
- [343] VOSTI D.C., JOSLIN M.A. Autolysis of baker's yeast. *Appl. Microbiol.*, 1954, 2, p. 70-78.
- [344] WAEBER B., NUSSBERGER J., BRUNER H.R. Anti-hypertenseurs. *Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques* ed. by M. SCHORDERET. Frison-Roche & Slatkine Editions : 1992, p. 127-129.
- [345] WAGNER C.A., LANG F., BRÖER S. Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 2001, 281, p. C1077-C1093.

- [346] WAKO Y., ABE Y., HANDA T., ISHIKAWA S. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors in fish water soluble protein hydrolyzates prepared by bioreactor. *Food Sci. Technol. Res.*, 1999, 5, p. 378-380.
- [347] WAKO Y., ISHIKAWA S., MURAMOTO K. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors in autolysates of squid liver and mantle muscle. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1996, 60, p. 1353-1355.
- [348] WALLERATH T., POLEO D., LI H., FÖRSTERMANN U. Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase. A mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2003, 41, p. 471-478.
- [349] WANG K., MAGA J.A., BECHTEL P.J. Taste properties and synergisms of beefy meaty peptide. *J. Food Sci.*, 1996, 61, p. 837-839.
- [350] WHITE J.C., INCORVIA MATTINA M.J., LEE W.Y., EITZER B.D., IANNUCCI-BERGER W. Role of organic acids in enhancing the desorption and uptake of weathered *p,p'*-DDE by *Cucurbita pepo*. *Environ. Poll.*, 2003, 124, p. 71-80.
- [351] WIESER H., BELITZ H.D. Relations between structure and bitter taste of amino acids and peptides. II. Peptides and their derivatives. *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, 1976, 160, p. 383-392 (En Allemand, Résumé en Anglais).
- [352] WOLFF A.M., DIN N., PETERSEN J.G.L. Vacuolar and extracellular maturation of *Saccharomyces cerevisiae* proteinase A. *Yeast*, 1996, 12, p. 823-832.
- [353] WORTH H.G. Measurement of sodium and potassium in clinical chemistry. *Analyst.*, 1998, 113: p. 373-384.
- [354] WU J., DING X. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, p. 501-506.
- [355] YAMAMOTO N. Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Biopolymers*, 1997, 43, p. 129-134.
- [356] YAMAMOTO N., AKINO A., TAKANO T. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.*, 1994a, 77, p. 917-922.
- [357] YAMAMOTO N., AKINO A., TAKANO T. Antihypertensive effects of different kinds of fermented milk in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1994b, 58, p. 776-778.
- [358] YAMAMOTO N., MAENO M., TAKANO T. Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *J. Dairy Sci.*, 1999, 82, p. 1388-1393.
- [359] YANAGISAWA M., KURIHARA H., KIMURA S., TOMOBE Y., KOBAYASHI M., MITSUI Y., YAZAKI Y., GOTO K., MASAKI T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 1988, 332, p. 411-415.
- [360] YANG Y., MARCZAK E.D., YOKOO M., USUI H., YOSHIKAWA M. Isolation and antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from spinach rubisco. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, p. 4897-4902.
- [361] YANO S., SUZUKI K., FUNATSU G. Isolation from α -zein of thermolysin peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1996, 60, p. 661-663.
- [362] YOKOTSUKA K., AIHARA T., UMEHARA Y., KUSHIDA T. Free amino acids and peptides in musts and wines from Japanese grapes. *J. Ferment. Technol.*, 1975a, 53, p. 631-635.

- [363] YOKOTSUKA K., FUKUI M. Changes in nitrogen compounds in berries of six grape cultivars during ripening over two years. *Am. J. Enol. Vitic.*, 2002, 53, p. 69-77.
- [364] YOKOTSUKA K., UMEHARA Y., AIHARA T., KUSHIDA T. Isolation and structural analysis of peptides in koshu white wine. *J. Ferment. Technol.*, 1975b, 53, p. 620-625.
- [365] YOKOYAMA K., CHIBA H., YOSHIKAWA M. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1992, 56, p. 1541-1545.
- [366] YOSHII H., TACHI N., OHBA R., SAKAMURA O., TAKEYAMA H., ITANI T., Antihypertensive effect of ACE inhibitory oligopeptides from chicken egg yolks. *Comp. Biochem. Physiol.*, 2001, C128, p. 27-33.
- [367] YUST M.M., PEDROCHE J., GIRÓN-CALLE J., ALAIZ M., MILLÁN F., VIOQUE J. Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. *Food Chem.*, 2003, 81, p. 363-369
- [368] ZHAO Q., PIOT J.M. Investigation of inhibition angiotensin-converting enzyme (ACE) activity and opioid activity of two hemorphins, LVV-hemorphin-5 and VV-hemorphin-5, isolated from a defined peptic hydrolysate of bovine hemoglobin. *Neuropeptides*, 1997, 31, p. 147-153.
- [369] ZHAO Q., SANNIER F., GARREAU I., GUILLOCHON D., PIOT J.M. Inhibition and inhibition kinetics of angiotensin converting enzyme activity by hemorphins, isolated from a peptic bovine hemoglobin hydrolysate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, 204, p. 216-223.
- [370] ZHAO X., GU Z., ATTELE A.S., YUAN C.S. Effects of quercetin on the release of endothelin, prostacyclin and tissue plasminogen activator from human endothelial cells in culture. *J. Ethnopharmacol.*, 1999, 67, p. 279-285.
- [371] ZIOUDROU C., STREATY R.A., KLEE W.A. Opioid peptides derived from food proteins. *J. Biol. Chem.*, 1979, 254, p. 2446-2449.
- [372] ZUBENKO G.S., JONES E.W. Protein degradation, meiosis and sporulation in proteinase-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 1981, 97, p. 45-64.

ANNEXE

Afin de mieux appréhender le sujet qu'est l'analyse des peptides par spectrométrie de masse en milieu complexe (si toutefois ce manuscrit n'est pas suffisamment explicite), il a été choisi de mettre en annexe l'article sur la mise au point de la méthode de dosage des peptides par LC-ESI-MS/MS dans le champagne. Les résultats exposés sont le fruit d'une collaboration entre le Laboratoire de Recherche Moët & Chandon, le Laboratoire de Microbiologie Industrielle de l'UFR Sciences Exactes et Naturelles de Reims et l'institut de Chimie Organique et Analytique d'Orléans.

Par contre, il n'a pas été jugé bon de mettre les autres articles cités dans la partie « Liste des publications » car d'une part, le manuscrit aurait été alourdi d'au moins 75 pages et d'autre part, les données exposées dans ces articles sont déjà contenues dans ce manuscrit de thèse.

Characterization of Small Peptides in Champagne Wine by LC-ESI-MS/MS.

Marine de Person^a, Aude Sevestre^a, P. Chaimbault^a, Laurent Perrot^b,

Francis Duchiron^c, Claire Elfakir^{a,*}.

^a *Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), CNRS UMR 6005, Université d'Orléans,
BP 6759, F 45067 Orléans Cedex 2, France*

^b *Laboratoire de Recherche Moët & Chandon, 6 rue croix de bussy, 51200 Epernay, France*

^c *Laboratoire de Microbiologie Industrielle, Université de Reims Champagne Ardennes, BP 1039, Moulin de la
Housse, F 51 687 Reims Cedex 2, France.*

*corresponding author. Tel.: +33-238-494-587 ; Fax : +33-238-417-281;

e-mail : claire.elfakir@univ-orleans.fr

Abstract

This paper reports the use of an on-line LC-ESI-MS/MS method for identification and quantification of di- and tripeptides in champagne wine without laborious sample pretreatment. Identification of these compounds, under their underivatized form, was based on identical retention times and ESI-MS spectra with those of reference standards. The presence of nine dipeptides (Arg-Ile, Ile-Arg, Ile-Val, Lys-Phe, Lys-Tyr, Phe-Lys, Tyr-Gln, Tyr-Lys, Val-Ile) and the lack of two tripeptides (Phe-Arg-Arg and Lys-Met-Asn) have been characterised in the matrix. Calibration curves for each analyte were established using Phe-Arg as internal standard. The calibration curves were linear in the concentration range 0.1 to 10 mg.L⁻¹ with a correlation coefficient, r^2 , better than 0.99. The accuracy for calibration standard was estimated from 92% to 102%. This method allows high recovery and satisfies the necessary requirements with respect to accuracy, repeatability and sensitivity. The first application of this analytical method to the measurement of di- and tri-peptides in different vintages of champagne wine is reported. Compositional changes in the peptides occurred according to the vintage.

Keywords : dipeptides; tripeptides ; wine ; Liquid Chromatography; Mass Spectrometry; perfluorinated carboxylic acid.

1. Introduction

Low-molecular weight peptides are well known to exhibit multiple interesting functional properties such as surfactant, antioxidant and antimicrobial activities [1]. Peptides may be technologically important and may have effects on some of the physical-chemical characteristics of wine, as they do on other foodstuffs [2]. Several quantification methods about food-derived peptides have been reported in the literature and related to their real

contribution in flavours [1, 3-6] and/or to their pharmacological effects [1, 7-11]. Most of them are based on the prior isolation of the peptides of interest in order to identify them later by conventional methods [4-7, 12-19]. The isolation of oligopeptides from musts and wines presented an analytical challenge in term of sample preparation, separation and detection because peptides are found in rather low content in the presence of much larger quantities of other polar components such as amino acids, nucleic compounds or phenolic compounds. For many years, attempts have been addressed to achieve isolation and determination of small peptides in such a complex medium. A classical scheme of peptide isolation and fractionation from wine uses ultrafiltration, gel filtration and/or solid phase extraction (SPE) prior reverse phase liquid chromatography (RP-LC) analysis [13, 14]. Based on this methodology, Desportes *et al.* [6, 18] have isolated low-molecular weight peptides from a base wine industrially manufactured from white grapes of the Chardonnay variety. Oligopeptides with a MW below 3000 Da were isolated from the wine by ultrafiltration and nanofiltration. Low pressure liquid chromatography on Sephadex[®] LH-20 allowed separation of small wine peptides into different fractions and HPLC of the fractions particularly rich in peptides using a porous carbon column permitted the isolation of small peptides. The purity of each collected fraction was confirmed by capillary electrophoresis before their identification by an automatic Edman degradation sequencer. Some small peptides (Ile-Arg, Ile-Val, Phe-Lys, Tyr-Lys, Val-Ile, Lys-Met-Asn, Phe-Arg-Arg and Ser-Lys-Thr-Ser-Pro-Tyr) have been finally identified in the white wine [6, 18] and were sensory tested. The sample preparation in this analytical procedure was not easy and constituted a complex operation that could be the principal cause of variability in the results. Although the Edman degradation was commonly employed to sequence and identify peptides, this method presents several disadvantages due to its complex derivatization procedure [20] moreover, during the Edman degradation, there are still often doubts on the first analyzed residue. Therefore an on-line identification with mass

spectrometer (MS) was required to confirm these preliminary studies concerning the peptide identification in base wine and a complementary LC-MS method has to be developed to provide structural information about the isolated peptides. On-line LC-MS allows a rapid mass determination feasible without the need for laborious and time-consuming fractionation and purification steps, as well as an identification capability using only a very small amount of sample [12, 21, 22]. Furthermore recently, electrospray tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) has been found to be the method of choice for the detection of underivatized small peptides due its high sensitivity and incomparable specificity [23].

In this work, on-line ion-pair reversed phase liquid chromatography (IP-RPLC) and mass spectrometry with electrospray ionization (ESI) were used to determine some di or tripeptides occurring in champagne wine and involving no sample pretreatment. The identification of nine dipeptides and one tripeptide was confirmed in different vintages (corresponding to different years of production). The quantification method was developed in term of linearity, mean recovery and repeatability. The effects of the matrix on the analyte ionisation were also examined. This analytical method permits the evaluation of the peptide contents in Chardonnay white wine.

2. Experimental

2.1. Apparatus

The preliminary development of the chromatographic system was carried out with a LC-ELSD system. The HPLC equipment consisted of a Beckman (Fullerton, CA, USA) Model 128 System Gold binary pump, a Gilson (Villiers le Bel, France) Model Bio732 autosampler fitted with a 10 μ L loop. The chromatographic data handling were accomplished using EZChrom Server software. The evaporative light scattering detector (ELSD) was a Sedere (Vitry s/Seine, France) model Sedex 55 set as follows: drift tube temperature: 60 °C,

nebulizer gas pressure: 2,3 bar and photomultiplier: 10. ELSD has proved to be an inexpensive way to develop chromatographic methods that are directly transposable to LC-MS [24].

LC-ESI-MS/MS experiments were carried out using a Perking-Elmer (Toronto, Canada) Model LC-200 binary pump and a Perkin-Elmer Sciex (Forster City, CA, USA) API 300 triple quadrupole mass spectrometer with a TurboIonSpray source heated at 400 °C. The mass spectrometer was operated in positive ion mode. Nitrogen was used as curtain and collision gas. After optimisation of the MS parameters, state and calibration parameters were as follows : nebulizer gas (NEB) = 10, curtain gas (CUR) = 7, collisionally activated dissociation (CAD) = 1, temperature (TEM) = 400 , ionspray voltage (IS) = 5200 V, declustering potential (DP) = 20 V, focusing potential (FP) = 200 V, entrance potential (EP) = 10 V, collision energy (CE) = 20 eV, collision cell exit potential (CXP) = 15, ion energy 1 (IE1) = 1 eV, ion energy 2 (IE2) = 3 eV. The 10- nebulizer value corresponds to a flow-rate of 1.36 L.min⁻¹ and the 7- curtain gas value corresponds to a flow-rate of 1.02 L.min⁻¹. The selective reaction monitoring (SRM) mode was used to monitor the parent and product ions for the tandem MS analysis of peptides. The dwell time was set at 250 ms and the pause time was 5.0 ms. Injections were done by a Perkin-Elmer series 200 autosampler fitted with a 20- μ L loop. A Harvard Model 22 syringe pump was used for the optimisation of the MS parameters by infusing each peptide solution (5 mg.L⁻¹ in mobile phase) in the MS system at a flow-rate of 10 μ L.min⁻¹. All results were acquired with the Analyst version 1.3.1. software (Sciex Applied Biosystems).

Separation was carried out on a Supelcosil ABZ+ Plus 150x4.6 mm I.D., 5 μ m (Supelco, Bellefonte, PA, USA) column. Flow-rate was 1 mL.min⁻¹. For LC-MS/MS, the eluent from the column was split 1 to 5 before the coupling to mass spectrometer. The hold-up time was determined by injecting an aqueous solution of glucose.

Column temperature was regulated by a Gecko-cil (Cluzeau, France) oven at 30 °C.

2.2. Chemicals and reagents.

HPLC-grade acetonitrile (ACN) was obtained from J.T. Baker (Noisy le Sec, France). Nonafluoropentanoic acid (NFPA) was purchased from Aldrich (St. Quentin-Fallavier, France). Arg-Ile, Ile-Arg, Ile-Val, Lys-Phe, Lys-Tyr, Phe-Arg, Tyr-Gln, Tyr-Lys Val-Ile and Phe-Arg-Arg, were purchased from Bachem (Bubendorf, Switzerland); Phe-Lys, Lys-Met-Asn were synthesised from Neosystem (Strasbourg, France). Deionized (18 MΩ) water, using an Elgastat UHQ II system (Elga, Antony, France), was used for the preparation of amino acid and ion-pairing reagent solutions.

2.3. Preparation of standard solutions.

Stock standard solutions (2000 mg.L⁻¹) were prepared by weighing and dissolving the adequate amount of each peptide in a water-acetonitrile mixture (50/50, v/v) and were stored at 4 °C. Seven calibration solutions (from 0.1 mg.L⁻¹ to 10 mg.L⁻¹) were prepared by diluting the corresponding stock standard solution in mobile phase constituted of 2 mM NFPA in water and acetonitrile (90/10). To establish the calibration curves and the within and between batches quality controls, Phe-Arg was used as internal standard and added to the different calibration solutions at a constant concentration (10 mg.L⁻¹). The potential matrix effect was tested for four dipeptides : Lys-Phe, Lys-Tyr, Tyr-Gln and Tyr-Lys. To simulate the matrix, a wine concentrated fraction (selected due to the absence of these 4 peptides in sample) was added to each calibration solution at the dilution 1/15. A second set of calibration curves were established and were then compared with the first set obtained without wine addition.

2.4. Preparation of Champagne wine

The champagne wines prepared from white grapes of the Chardonnay variety and from different vintages (from 1975 to 1999) were obtained from the Laboratoire de Recherche Moët et Chandon, Epernay, France. For determination of peptides, samples of champagne wine were only ultrafiltrated with a 1 KDa cut-off membrane to eliminate high molecular weight compounds and then concentrated to 1/20 of its original volume in a rotary evaporator and finally stored at -20°C . Just before analysis, an aliquot (75 μL) of the wine concentrated fraction was diluted in 425 μL of the mobile phase (a mixture of 2 mM NFPA in pure water and acetonitrile (90/10)) containing 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of Phe-Arg as internal standard. After the sample was vortexed for 1 min, 20 μL was injected into the analytical column.

3. Results and discussion

The tentative identification of the peptides in different champagne wines was based on their MS/MS spectra and their retention time in comparison with peptide standards tested under the same conditions. The high specificity of tandem MS decreases the necessity for powerful chromatographic systems in which all compounds of interest have to be separated before detection. It thus reduces the analysis time. Only certain pairs of peptides need to be separated due to intrinsic problems of MS detection (isobaric and isomeric compounds, in-source collisionally induced dissociation (CID) fragments, ^{13}C isotopes, cross-talk effect due to the slow ion flight times as well as ion suppression).

3.1. Peptide fragmentation and set up of the separation objectives.

The peptide investigated in this study are listed in Table 1 according to an increasing mass order. Peptide fragmentation investigations and MS parameter optimization were performed in the same way as described previously for amino acids [25]. Peptide fragment

ions were listed in accordance with the nomenclature introduced in 1984 by Roepstorff and Fohlman [26] for peptide fragmentation (a-, b- and y-type ions).

As observed for glycyl and lysyl dipeptides [23], the protonated molecule $[M+H]^+$ was the most abundant ion formed in simple MS for all the peptides investigated and only singly charged ions are observed. In order to develop a tandem MS method, the mass spectrometer was set in product-ion scan mode by selecting the $[M+H]^+$ as parent ion and scanning in a mass area from 30 to 500 amu for determination of the product ions. The above procedure was realised for collision energy values ranged from 10 to 50 eV. Table 1 summarizes for each studied peptide, the major collisionally activated dissociation (CAD) fragments observed in positive ion mode. All peaks exceeding 2% of the total fragment ion abundance are recorded. As it can be seen from Table 1, the dipeptides gave principally the loss of ammonia from the protonated molecule, the y_1 ion and a_1 fragment. The loss of water from the protonated molecule was never observed for the studied dipeptides. Depending on the dipeptide, any of the above fragments could be the most abundant. Finally several other CAD fragments were generated whose exact structure has not been elucidated in this study. The fragmentation of the tripeptide Phe-Arg-Arg was more difficult than for the dipeptide and the fragmentation of Phe-Arg-Arg by CAD gave principally y_1 fragment. For this compound, the loss of water from the protonated molecular ion was observed as well as the a_1 fragment corresponding to the immonium ion of Phe residue. In the case of the other tripeptide, Lys-Met-Asn, the b_1 fragment appeared to be the most abundant whereas the y_1 ions were formed in very low abundance and no immonium ions were detected. Both tripeptides gave never y_2 and b_2 fragments.

Figure 1 depicts the breakdown graphs of the relative abundance of the parent ion $[M+H]^+$ and its corresponding major CAD fragments versus the collision energy in the range of 10-50 eV for some typical peptides. By increasing the collision energy, the major CAD

fragment ion abundance passes through a maximum varied between 20 eV for the most of the dipeptides and 30 eV for the tripeptide Phe-Arg-Arg consequently, in the case of the simultaneous analysis of many peptides, an intermediary collision energy value of 20 eV has to be chosen as a compromise for further studies.

The fragmentation of peptides was more or less important according to the structure of the molecule. Therefore, Ile-Val and Val-Ile present a simple fragmentation with only one or two fragments while Tyr-Lys and Phe-Arg-Arg gave multiple fragments from the protonated molecular ion with abundance values below 20 %. For these last compounds, the choice of specific mass transition will be more difficult than for isoleucine containing dipeptides and the sensitivity of detection may be less performant at 20 eV.

The specificity of mass spectrometry allows the determination between two isomers if they have different product ions however, in the case of Ile-Val and Val-Ile (Fig. 1) that have two different but not specific major product ion at m/z 86 and m/z 72 respectively, a chromatographic separation has to be implemented to properly quantify them together in the SRM mode. The problem is similar for Lys-Tyr, Tyr-Lys and Tyr-Gln which are isomers or isobars and have not yielded specific major CAD fragments (Table 1).

Table 2 sums up the two MS/MS transitions selected for each studied peptide in the SRM mode in view of their identification and simultaneous analysis in wine sample. The peptide are listed according to an increasing retention time under the chromatographic conditions described below. For the first transition, the choice of the product ion was made according to two criteria: improvement over selectivity and improvement over detection sensitivity (signal/noise ratio) to permit a suitable quantification in the biological matrix. Indeed, a minimum sensitivity is required in order to avoid small peaks causing greater peak integration errors. The second transition was selected to confirm the first peptide identification.

Even with specific MS/MS detection, LC separation is evidently needed in this study to eliminate interferences among analytes (for example, the interferences between Arg-Ile and Ile-Arg, Lys-Phe and Phe-Lys, Lys-Tyr and Tyr-Lys...) and from the sample matrix.

3.2. LC-MS/MS identification in wine.

Several suitable and complementary chromatographic systems compatible with MS detection are nowadays available for the separation of underivatized proteinogenic amino acids or di- and tripeptides [23-25, 27]. By using perfluorinated carboxylic acids as ion-pairing reagents in mobile phase, high amino acid and peptide selectivities can be obtained on octyl-, octadecyl-silica or porous graphitic carbon stationary phases.

Fig.2a shows the selective reaction monitoring (SRM) of a standard mixture of 12 peptides (9 main ion transitions monitoring as reported in table 2) obtained by LC-MS/MS and Fig. 2b-2j show the extracted ion currents (XIC) of all the ion transitions monitoring. The optimized mobile phase gradient was obtained from eluent A (2 mM NFPA in aqueous solution) and eluent B (acetonitrile) as follows: 10% (v/v) CH₃CN during the first 4 min, then from 10% to 30% CH₃CN (v/v) in 13 min and finally 30% CH₃CN (v/v) maintained until the end of the analysis. As can be seen from all XICs, the specificity of the SRM mode allowed the chromatographic single run analysis of these peptides in less than 20 min. All coelutions that can not be evidenced by XIC have been resolved by the chromatographic separation. No system peaks were observed due to the use of NFPA in the mobile phase.

Figure 3a shows a representative LC-ESI-MS/MS chromatogram of peptides in champagne wine from the 1997 vintage using the optimized methodology described above. As can be seen from the extracted ion currents (XIC) of all the ion transitions monitoring (Fig.3b-3h) nine peptides among several other unknown peaks can be identified in the wine sample due to their two MS/MS transitions and their retention time. For the MS/MS transition

478>175, several unknown analytes were simultaneously detected but their retention time were not corresponding to the one of Phe-Arg-Arg. It was concluded that this tripeptide was not present in the sample. The same peptides are identified in different vintages of champagne wine however, the amount of these compounds varies significantly. Results of this paper demonstrated the complexity of the peptide composition of wine and that on-line LC-MS/MS can be a useful analytical tool for identifying and characterizing small peptides in different biological matrices. These results confirmed the previous identification of Ile-Arg, Ile-Val, Phe-Lys, Tyr-Lys, Val-Ile in a base wine obtained by Desportes et al. [18] after fractionation, purification and derivatization steps whereas tripeptides such as Lys-Met-Asn and Phe-Arg-Arg were never found by LC-MS/MS in our samples. Moreover four additional dipeptides (Arg-Ile, Lys-Phe, Lys-Tyr and Tyr-Gln) were identified in the wine samples .

3.3. Quantitative peptide estimation in Champagne wine.

An internal standard method was used to measure the peptide amounts in wines and Phe-Arg was employed as internal standard. Indeed, by monitoring the specific Phe-Arg ion transition (m/z 322>175) during the LC-MS/MS analysis of different unspiked wine samples, no trace of this substance was found moreover, it appears that under the chromatographic conditions used, the retention time (see Fig.2) and the response factor of Phe-Arg were similar to those of the other analytes. From these observations, it was concluded that Phe-Arg fulfils all the criteria required for an internal standard.

The calibration curves were performed for each compound over the range of concentrations 0.1 – 10 mg.L^{-1} . After a preliminary estimation by an external quantification method, this concentration range was selected according to the peptide content of the wine samples, to allow the determination of all analytes in a single LC-MS/MS run. The calibration curves were constructed at seven concentration levels (0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 and 10 mg.L^{-1})

and three independent determinations ($n=3$) were performed at each concentration. The regression line was calculated as $y = ax + b$, where y was the ratio of peak areas for analyte and internal standard and x the ratio of amount injected for analyte and internal standard. The calibration curve was obtained using the linear least squares regression procedure. The results reported in table 3 show good linearity over the considered concentration range. The determination coefficient (r^2) for Phe-Arg-Arg was 0.992 and for the other dipeptides varied from 0.997 to 0.999.

The precision of the method was evaluated by calculating for all the peptides, the relative standard deviation (RSD%) for the slope values of the calibration curves. These values indicate that for most of the peptides there was little variation between the three series of measurements. RSD% value was 7.93% for Phe-Arg-Arg and varied from 0.94% to 2.26% for the other peptides.

Accuracy for 7 calibration standards used ($n=3$) was back calculated. The minimum acceptance criterion for the relative bias (%) of the calibration standards are within $\pm 15\%$ of the expected concentration. As reported in table 3, suitable accuracy values were obtained over the concentration range of calibration ($0.1 - 10 \text{ mg.L}^{-1}$). It varied from 99% to 102% for the dipeptides and it was 92% for the tripeptide Phe-Arg-Arg.

The potential matrix effect on the peptide signal was then tested for 4 dipeptides (Lys-Phe, Lys-Tyr, Tyr-Gln and Tyr-Lys). A new set of 7 calibration standards were prepared in mobile phase spiked with wine and the corresponding calibration curves were established and compared to the ones obtained from calibration standards prepared in mobile phase. After statistical data treatment of the slope values by the Student's t -test (Table 4), the obtained values were not significantly different (calculated t values inferior to the theoretical value) and then it was concluded that the matrix effects were not significative. When wine

was analysed, the peptides can be co-eluted with other matrix components without any suppression phenomenon occurring during the detection step.

Using this quantitative LC-MS/MS method, the determination of small peptides was carried out in different vintages dated from 1975 to 2000. In order to prove the accuracy of the concentrations found in samples, quality control samples prepared as calibration standards in mobile phase, were introduced within the batch at 3 concentration levels : low, median and high concentrations.

The concentrations of peptides identified in the different samples are presented in Table 5. This table also shows statistics on quality control (QC) samples in term of accuracy and precision demonstrating that no critical deviation of the analytical system has occurred during the assays. The results shows that the same peptidic compounds were found in the different vintages analysed with content variations more or less important according to the peptide studied. In decreasing order, Ile-Arg was quantitatively the most important peptide detected in wine champagne with concentrations ranging from 2.2 – 7.0 mg.L⁻¹, then Arg-Ile (1.0 – 2.1 mg.L⁻¹), Ile-Val (0.6 – 1.6 mg.L⁻¹) and finally Tyr-Lys (0.3 – 3.0 mg.L⁻¹). The other dipeptides were found with calculated concentrations all inferior to 1 mg.L⁻¹ and the tripeptide Phe-Arg-Arg was not detected in all the champagne wine samples analysed, as previously discussed in section 2.2. In fact, no signal (significantly above the background noise) was observed for the m/z transitions 478>175 or 478>322 at a retention time corresponding to Phe-Arg-Arg in the champagne wine samples tested.

4. Conclusion

Combined LC-MS/MS with ESI in positive ion mode allows the efficient identification and quantification of small underivatized peptides in wine samples in a single run. The procedure avoids the time-consuming prepurification and isolation steps and makes

possible the determination of the peptide composition of a large number of champagne samples to provide relevant information about peptide composition according to the ageing and the variety of wine analysed or to investigate the effects of biological parameters and cultural and processing practices. The first results show that the peptide composition of wine is complex. The identified peptides are present at low concentrations ($<10 \text{ mg.l}^{-1}$) in champagne wine and compositional changes in the peptides occurred according to the vintage. Future developments will include the application of this methodology to identify another peptides in Champagne wine and will be to validate the method in term of linearity, sensitivity, accuracy and precision. Another approach of our study will be to lower the detection limits using narrow-bore HPLC column.

Acknowledgments

The authors wish to thank Monique Charpentier (Chef de Projet microbiologie au Laboratoire de Recherche Möet et Chandon) for providing the champagne wine samples especially for the purpose of this research.

References

- [1] I. Gill, R. López-Fandiño, X. Jorba, E.N. Vulfson, *Enzyme Microb. Technol.*, 18 (1996) 162.
- [2] M.C. Polo, M.D. González de Llano, M. Ramos, *Food Analysis by HPLC*, M.L. Nollet (Ed.), Marcel Dekker, Inc., New-York 2000, 2^{ème} ed., p 99.
- [3] K. D. Lee, J.J. Warthesen, *Journal of Food Science*, 61(2) (1996) 291.
- [4] C. Salles, C. Hervé, C. Septier, D. Demaizières, I. Lesschaeve, S. Issanchou, J.L. Le Quéré, *Food Chemistry*, 68 (2000) 429.
- [5] N. Sommerer, C. Salles, D. Promé, J.C. Promé, J.L. Le Quéré, *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2001) 402.
- [6] C. Desportes, M. Charpentier, B. Duteurtre, A. Maujean, F. Duchiron, *Am. J. Enol. Vitic.*, 52(4) (2001) 376.
- [7] T. Takayanagi, K. Yokotsuka, *Am. J. Enol. Vitic.*, 50(1) (1999) 65.
- [8] L. Perrot, M. Charpentier, B. Duteurtre, F. Duchiron, M.L. Kaltenbach, *British Journal of Nutrition* submitted.
- [9] V. Vermeirssen, J. Van Camp, W. Verstraete, *J. Biochem. Biophys. Methods* 51 (2002) 75.
- [10] D.M. Desiderio, *Analytica Chimica Acta*, 352 (1997) 85.
- [11] M. Feuillat, *C. R. Acad. Sci. Paris, Série D : Sciences Naturelles*, 285(9) (1977) 1013.
- [12] T. Herraiz, *Analytica Chimica Acta*, 352 (1997) 119.
- [13] C.J. Dale, T.W. Young, *J. Inst. Brew.*, 95 (1989) 35.
- [14] M.I. Acedo, E. Pueyo, M.C. Polo, *Am. J. Enol. Vitic.*, 45(2) (1994) 167.
- [15] V. Moreno-Arribas, E. Pueyo, M.C. Polo, *J. Agric. Food Chem.*, 44 (1996) 3783.

- [16] B. Bartolomé, V. Moreno-Arribas, E. Pueyo, M.C. Polo, *J. Agric. Food Chem.*, 45 (1997) 3374.
- [17] M.V. Moreno-Arribas, B. Bartolomé, E. Pueyo, M.C. Polo, *J. Agric. Food Chem.*, 46 (1998) 3422.
- [18] C. Desportes, M. Charpentier, B. Duteurtre, A. Maujean, F. Duchiron, *J. Chromatogr. A*, 893 (2000) 281.
- [19] M.V. Moreno-Arribas, E. Pueyo, M.C. Polo, *Analytica Chimica Acta*, 458 (2002) 63.
- [20] V. Walker, G.A. Mills, *Ann. Clin. Biochem*, 32 (1995) 28.
- [21] B. Mehlis, U. Kertscher, *Analytica Chimica Acta*, 352 (1997) 71-83.
- [22] J. Léonil, V. Gagnaire, D. Mollé, S. Pezenec, S. Bouhallab, *J. Chromatogr. A*, 881 (2000) 1.
- [23] K. Petritis, S. Brussaux, S. Guenu, C. Elfakir, M. Dreux, *J. Chromatogr. A* 957 (2002) 173.
- [24] P. Chaimbault, K. Petritis, C. Elfakir, M. Dreux, *J. Chromatogr. A* 855 (1999) 191.
- [25] K. Petritis, P. Chaimbault, C. Elfakir, M. Dreux, *J. Chromatogr. A*, 896 (2000) 253.
- [26] P. Roepstorff, J. Fohlman, *Biomed. Mass Spectrom.*, 11 (1984) 601.
- [27] J. Qu, Y. Wang, G. Luo, Z. Wu, C. Yang, *Anal Chem.* 74 (2002) 2034.

Figure captions

Figure 1. Breakdown graphs of the major CAD fragments versus collision energy of the peptides Ile-Val, Val-Ile, Tyr-Lys and Phe-Arg-Arg.

Figure 2. LC-ESI-MS/MS analysis of a standard mixture of 12 small peptides (Tyr-Gln, Ile-Val, Val-Ile, Tyr-Lys, Ile-Arg, Lys-Tyr, Phe-Lys, Phe-Arg, Arg-Ile, Lys-Phe, Phe-Arg-Arg and Lys-Met-Asn) in a gradient elution on Supelcosil ABZ+ Plus C₁₈ column (150 x 4.6 mm i.d., 5 µm). Column temperature is at 30 °C. Gradient elution : solvent A water containing NFPA 2 mM, pH 2,8. Solvent B : acetonitrile; 0→4 min 10% B, 4→17 min linear to 30% B, 17→30 min 30% B is maintained. Flow-rate 1 ml.min⁻¹; split 1/5; injection volume: 20 µl. (a) Selected reaction monitoring (SRM) of a 10 mg.l⁻¹ standard solution of the 12 peptides (9 main ion transitions); (b) – (j) Extracted ion currents (XICs) of the analysed peptides.

Figure 3. LC-ESI-MS/MS analysis of a champagne wine sample containing Phe-Arg added as internal standard. Column : Supelcosil ABZ+ Plus C₁₈ column (150 x 4.6 mm i.d., particle size 5 µm). Column temperature is at 30 °C. Gradient elution : solvent A water containing NFPA 2 mM, pH 2,8. Solvent B : acetonitrile; 0→4 min 10% B, 4→17 min linear to 30% B, 17→20 min 30% B is maintained. Flow-rate 1 ml.min⁻¹; split 1/5; injection volume: 20 µl. (a) Selected reaction monitoring (SRM) of a wine sample; (b) – (i) Extracted ion currents (XICs) of the present peptides.

Figure 1

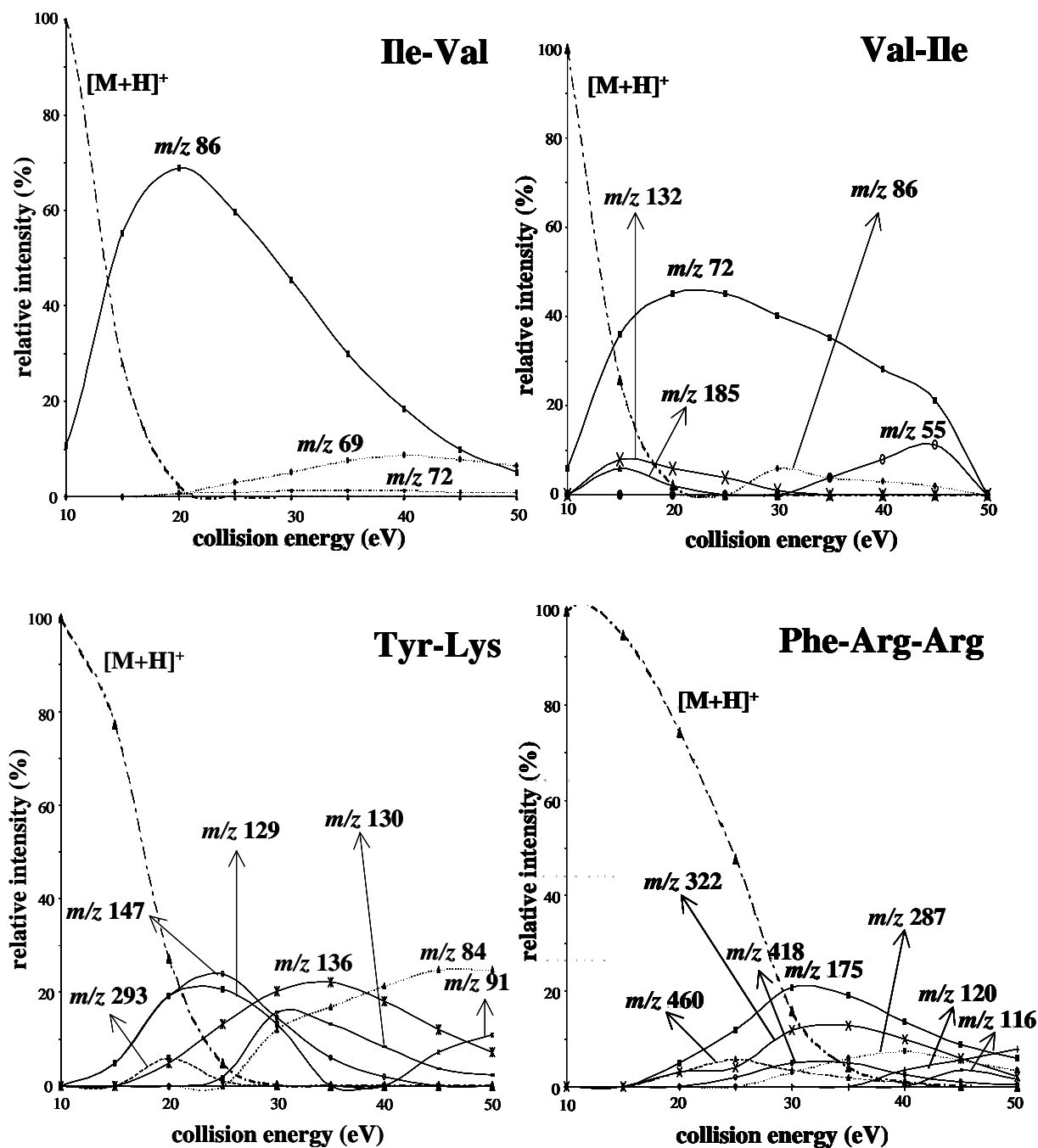


Figure 2.

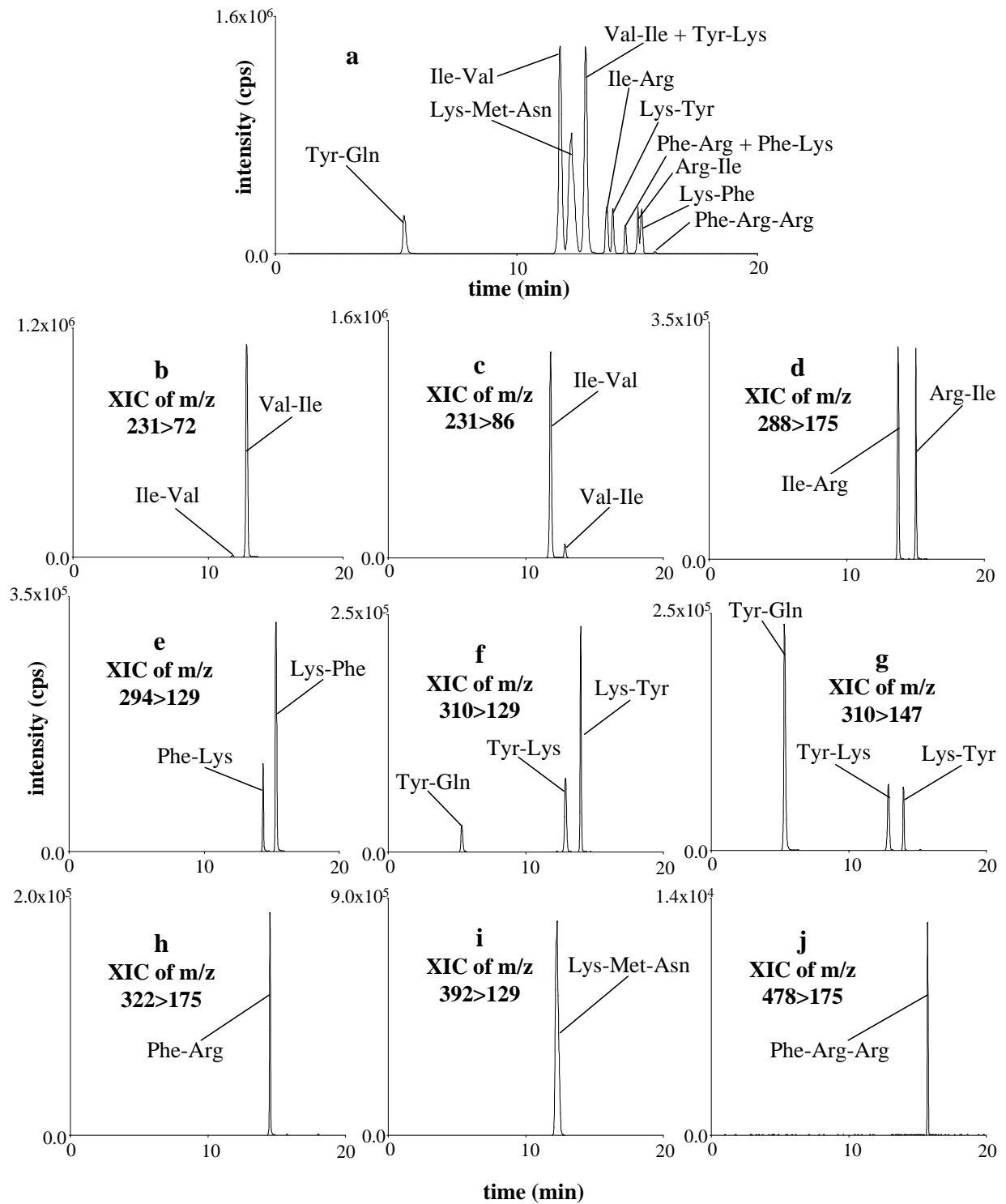


Figure 3

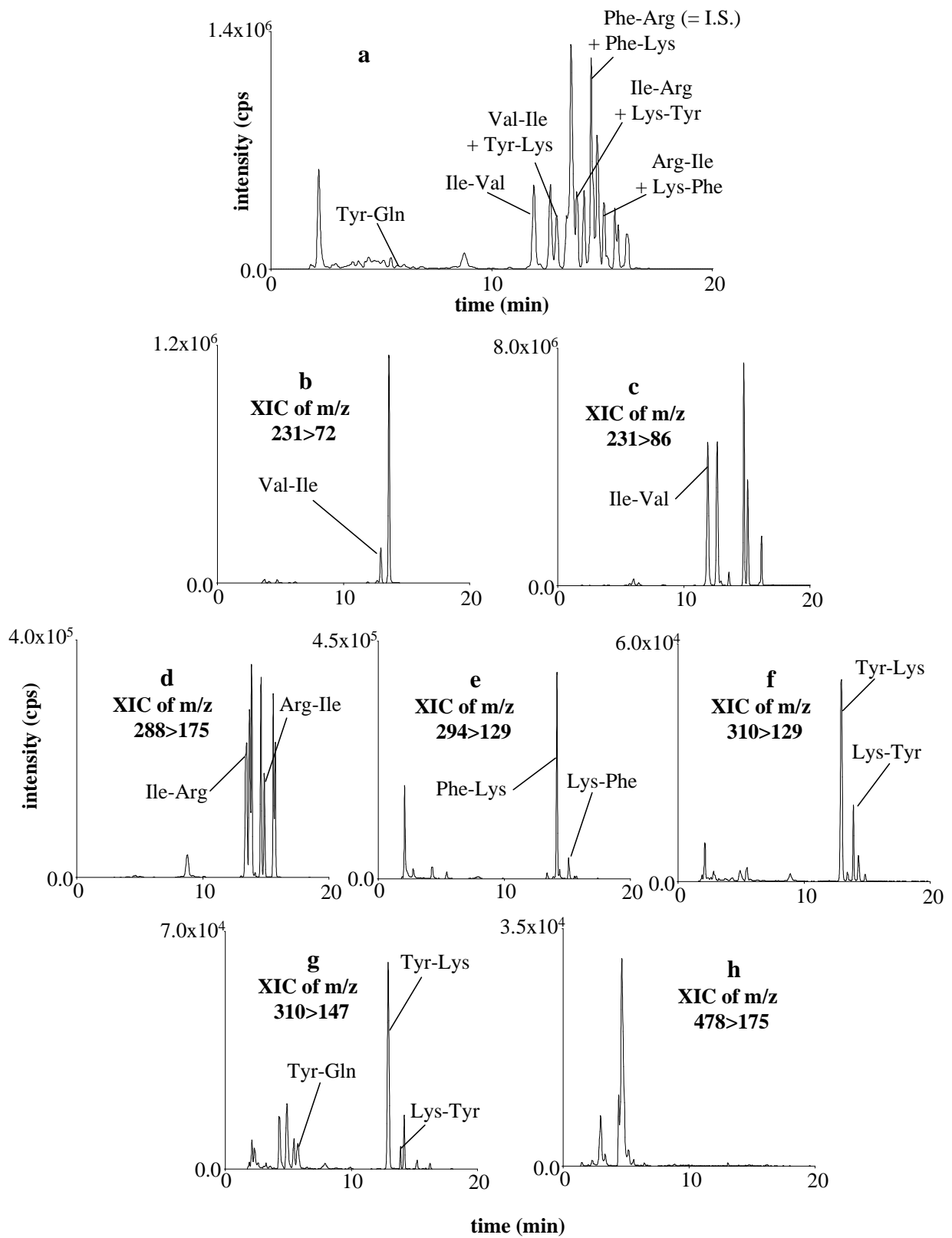


Table 2. Choice of the two MS/MS transitions for each studied peptide and retention times under the chromatographic conditions.

Peptide	Main MS/MS transition	Confirmation MS/MS transition	Retention time (min)
Tyr-Gln	310>147	310>129	5.6
Ile-Val	231>86	231>69	11.9
Lys-Met-Asn	392>129	392>264	12.2
Val-Ile	231>72	231>132	12.9
Tyr-Lys	310>129	310>147	12.9
Ile-Arg	288>175	288>86	13.7
Lys-Tyr	310>129	310>147	13.9
Phe-Lys	294>129	294>84	14.3
Phe-Arg	322>175	322>120	14.5
Arg-Ile	288>175	288>86	14.9
Lys-Phe	294>129	294>84	15.1
Phe-Arg-Arg	478>175	478>322	15.7

Table 3. Calibration curve, precision (relative standard deviation, RSD%, on slope value) and accuracy

peptide	Calibration curve		RSD% (n=3) of slope value	Accuracy (%) (7 calibration standards and n=3)
	equation	r ²		
Tyr-Gln	$y = 0.154x + 0.010$	0.997	1.70%	102
Ile-Val	$y = 0.976x + 0.067$	0.998	1.82%	102
Val-Ile	$y = 0.674x + 0.045$	0.998	1.37%	101
Tyr-Lys	$y = 0.0491x + 0.001$	0.997	0.94%	100
Ile-Arg	$y = 0.151x + 0.004$	0.999	2.26%	99
Lys-Tyr	$y = 0.0897x + 0.003$	0.999	2.22%	99
Arg-Ile	$y = 0.108x + 0.003$	0.999	2.17%	100
Lys-Phe	$y = 0.103x + 0.002$	0.998	1.40%	99
Phe-Arg-Arg	$y = 0.0014x - 0.0002$	0.992	7.93%	92

Calibration was performed by plotting the ratio of peak areas for analyte and internal standard (y) against the ratio of amount injected for analyte and internal standard (x)

Table 4. Slope value comparison of slope of calibration curve by a Student's *t*-test.

Peptide	calculated <i>t</i> * value	Test's result
Tyr-Gln	0.624	not significant
Tyr-Lys	0.519	not significant
Lys-Tyr	0.431	not significant
Lys-Phe	0.495	not significant

* calculated *t* values were determined by applying the formula $t = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{S_{a_1}^2 + S_{a_2}^2}}$ where *a*₁ and *a*₂ are the slopes of the calibration curves prepared in mobile phase and in matrix, respectively.

*S*_{a1} and *S*_{a2} are the corresponding standard deviations. These values were then compared with theoretical *t* value (=2.228), determined from a student table for a 95% confidence interval

Table 5. Concentration ranges (mg.L⁻¹) of di- and tripeptides found in Champagne wine and

Peptide	Concentration range (mg.L ⁻¹) in Champagne wine ^a	Accuracy (%) ^b		
		low concentration (0.25 mg.L ⁻¹)	median concentration (1 mg.L ⁻¹)	high concentration (5 mg.L ⁻¹)
Tyr-Gln	nd – 0.295	100 (2.01)	101 (1.73)	96 (3.14)
Ile-Val	0.615 – 1.627	85 (3.36)	103 (3.39)	103 (2.92)
Val-Ile	0.250 – 0.802	102 (3.35)	101 (3.47)	99 (3.27)
Tyr-Lys	0.311 – 3.067	95 (2.86)	99 (3.50)	100 (3.00)
Ile-Arg	2.242 – 7.005	97 (3.12)	87 (4.77)	92 (3.92)
Lys-Tyr	nd – 0.179	100 (3.01)	96 (2.67)	92 (3.51)
Arg-Ile	1.042 – 2.138	97 (3.09)	92 (2.67)	100 (2.52)
Lys-Phe	nd – 0.325	100 (2.29)	99 (2.03)	94 (3.71)
Phe-Arg-Arg	nd	114 (12.28)	114 (13.06)	114 (8.35)

statistics on quality control samples (accuracy and precision)

^a **nd**: not detected

^b in parentheses, values of relative standard deviation % calculated from three determinations

Table 1. m/z values of the protonated peptides and interpretation of their corresponding CAD fragments in product-ion-scan mode from 5 to 30 eV collision energy. All fragments exceeding 2% of the total fragment ion abundance are recorded. $[\text{Im}]^+ = [\text{H}_2\text{N}=\text{CH-R}]^+$ where R is the residue of the amino acid. In parentheses : typical sequence a, b, y fragment ions.

Peptide	m/z												
AB	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_3]^+$	$[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$	$[\text{A}+\text{H}]^+$	$[\text{B}+\text{H}]^+$	$[\text{A}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$	$[\text{B}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$	$[\text{A Im}]^+$	$[\text{B Im}]^+$	other			
					(y ₁)	(b ₁)		(a ₁)					
Ile-Val	231							86	72	69			
Val-Ile	231				132			72	86	55, 185			
Arg-Ile	288	271		175		157			86	70, 112, 229			
Ile-Arg	288				175			86		70, 116, 158			
Lys-Phe	294	277		147		129		101		84, 259			
Phe-Lys	294	277			147		129	120	101	84, 259			
Lys-Tyr	310	293		147	182	129		101	136	247, 275			
Tyr-Gln	310	293		182	147			136		107, 119, 130, 276			
Tyr-Lys	310	293			147		129	136		91, 130			
Phe-Arg	322	305			175			120		70, 116			
ABC	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_3]^+$	$[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$	$[\text{A}+\text{H}]^+$	$[\text{B}+\text{H}]^+$	$[\text{C}+\text{H}]^+$	$[\text{A}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$	$[\text{B}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$	$[\text{C}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$	$[\text{A Im}]^+$	$[\text{B Im}]^+$	$[\text{C Im}]^+$	other
						(y ₁)	(b ₁)			(a ₁)			
Phe-Arg-Arg	478		460		175	175				120			116, 287, 322, 418
Lys-Met-Asn	392	375				133	129						357, 264, 260, 84

GLOSSAIRE

Acétylcholine : neurotransmetteur chimique qui favorise la transmission de l'influx nerveux dans les synapses du système nerveux central et du système nerveux périphérique.

Amphipatique : se dit de molécules (de type phospholipides, protéines, etc...) ayant des régions hydrophobes et hydrophiles.

Analésique : se dit d'un médicament qui diminue ou supprime la douleur.

Antihypertenseur : se dit de tout agent qui fait diminuer la pression artérielle anormalement élevée.

Antipyrétique : se dit d'un médicament ayant pour propriété de prévenir, de réduire ou de faire disparaître la fièvre.

Antiseptique : substance chimique, bactériostatique ou bactéricide, applicable sur les tissus vivants.

Apoptose : ou « mort cellulaire programmée », elle correspond aux phénomènes qui conduisent normalement à la mort « programmée » de cellules, fait indispensable à l'homéostasie du corps pour tenir compte du renouvellement des tissus.

Athérosclérose : désigne la perte d'élasticité des artères due à l'accumulation de corps gras (lipides, essentiellement cholestérol LDL) au niveau de la paroi des artères.

Autocrine : fonctionnement où la cellule productrice est également la cible de la substance produite.

Bio-disponibilité : fraction d'une substance (aliment, médicament, hormone, etc.), captée dans l'organisme sous forme biologiquement active. La bio-disponibilité se mesure en fonction du pourcentage de substance effectivement assimilé par l'organisme et, s'il y a lieu, en fonction de la rapidité avec laquelle elle atteint le site visé.

Cathepsine B : il s'agit d'une protéine lysosomale à cystéine (EC : 3.4.22.1) impliquée dans la protéolyse intracellulaire ainsi que certains processus pathologiques (dystrophies musculaires, résorption osseuse et métastases tumorales).

Chaptalisation : procédé utilisé en vinification et qui consiste à introduire une certaine quantité de sucre dans le moût, avant fermentation pour remonter le degré alcoolique du vin. Ce procédé est très réglementé.

Cirrhose : attaque du foie qui résulte de l'alcoolisme chronique et de la dénutrition qui s'ensuit (dans le cas de la cirrhose alcoolique le foie présente un aspect roussâtre caractéristique).

Coalescence : l'union des choses diverses dans un corps ou forme ou groupe; la croissance ensemble des pièces (synonyme : coalition)

Diurétique : substance entraînant l'augmentation la sécrétion urinaire.

Entérocyte : cellule épithéliale cylindrique de la muqueuse intestinale, comportant à son pôle apical, un plateau strié jouant un rôle prépondérant dans les phénomènes d'excrétion et d'absorption intestinaux.

Erythropoïèse : ensemble des processus cellulaires se déroulant normalement dans la moelle osseuse sous la dépendance de l'érythropoïétine aboutissant aux globules rouge adultes.

Fibrinogène : ce sont des protéines du plasma sanguin fabriquées par le foie et jouant un rôle important dans la coagulation sanguine.

Hémolyse : destruction des globules rouges.

Hépatite : inflammation aiguë ou chronique du tissu du foie.

Hépatocyte : cellule du parenchyme hépatique, de forme cubique, volumineuse.

Homéostasie : tendance de l'organisme à maintenir ses différentes constantes à des valeurs ne s'écartant pas de la normale (l'homéostasie assure, par exemple, le maintien de la température, du débit sanguin, de la tension artérielle, du pH, des volumes liquidiens de l'organisme, de la composition du milieu intérieur, etc.).

Hypotenseur : se dit de tout agent qui fait diminuer la pression artérielle en dessous de la normale.

Morbidité : il s'agit de l'apparition de maladie, dont il est prouvé qu'elle est favorisée par un facteur. Elle peut être exprimée soit en fonction des cas nouveaux (incidence), soit de l'ensemble des cas, anciens et nouveaux (prévalence).

Natrémie : taux de sodium dans le plasma sanguin.

Œdème : infiltration séreuse excessive, indolore et sans rougeur des tissus conjonctifs sous-cutanés et sous-muqueux.

Œdème angioneurotique : variété d'urticaire caractérisée par la formation brusque d'infiltrations œdémateuses sous-cutanées.

Osmolarité : pression osmotique d'une solution.

Paracrine : fonctionnement qui correspond à la sécrétion dans le milieu intérieur d'une substance dont les cibles sont distinctes de la cellule productrice, par opposition à « autocrine » où la cellule productrice est également la cible de la substance produite.

Parathormone : hormone sécrétée par les glandes parathyroïdes et qui joue un rôle essentiel dans le maintien de l'équilibre phospho-calcique de l'organisme.

Pression diastolique : le ventricule gauche du cœur une fois vidé se remplit à nouveau (c'est la pression de décontraction du cœur).

Pression systolique : correspond à la pression exercée par le cœur lors de sa contraction, dont la finalité est l'éjection du sang en dehors de celui-ci (c'est la pression de contraction du cœur).

Rhéologie : étude de l'écoulement et de la déformation de la matière.

Rhumatisme : maladie dégénérative articulaire et périarticulaire, d'origine souvent imprécise, qui se manifeste principalement par de la douleur et de la raideur, et qui n'évolue pas vers la suppuration.

Stéatose : il s'agit d'une accumulation de corps gras (essentiellement des triglycérides) à l'intérieur des cellules de l'organisme qui habituellement n'en contiennent pas ou dans de très faibles proportions. Les causes de la stéatose peuvent être dues à une intoxication alcoolique (cause la plus fréquente dans les pays développés), une malnutrition, un régime hypercalorique, des problèmes liés à l'obésité ou au diabète.

Système endocrine : ce système a la faculté d'augmenter ou de ralentir le fonctionnement des organes par l'intermédiaire des hormones.

Système nerveux sympathique : ce système correspond à la mise en état d'alerte de l'organisme et à la préparation à l'activité physique et intellectuelle. Il est associé à l'activité de 2 neurotransmetteurs : la noradrénaline et l'adrénaline (dilatation des bronches,

accélération de l'activité cardiaque et respiratoire, dilatation des pupilles, augmentation de la sécrétion).

Thrombose : formation d'un caillot sanguin (thrombus) dans une artère, une veine ou cavité du cœur.

Vasculaire : qui concerne les vaisseaux ou qui est largement desservi par des vaisseaux sanguins.

Vasoconstriction : c'est la réduction du calibre des vaisseaux. C'est un phénomène naturel qui, avec la vasodilatation (augmentation du diamètre des vaisseaux), participe à la vasomotricité (régulation de la circulation du sang).

Volémie : volume total du sang circulant (plasma et éléments figurés).

Wakame : algue marine japonaise aux larges feuilles.

Xénobiotique : se dit d'une substance étrangère à l'organisme vivant.

Nom **Laurent PERROT**

Titre **Evaluation de l'effet antihypertenseur de la fraction
oligopeptidique du vin de Champagne.**

Identification et caractérisation d'oligopeptides.

Mots clés Champagne ; Vieillessement ; Peptides ; Enzyme de conversion de
l'angiotensine 1 ; Hypertension ; Pression artérielle ; Rats spontanément
hypertendus (SHR) ; Maladies cardiovasculaires

Résumé A l'heure actuelle, il est reconnu qu'une consommation régulière et modérée de vin a un effet bénéfique sur la mortalité, toutes causes confondues, et plus particulièrement sur les décès par maladies cardiovasculaires. Si les propriétés cardio-protectrices des vins rouges sont essentiellement dues à la présence des composés phénoliques, l'identité des molécules biologiquement actives en relation avec ces effets reste à établir dans les champagnes.

Depuis plusieurs années, les études démontrant la présence de peptides biologiquement actifs dans les aliments sont nombreuses. Des études préliminaires ont permis d'identifier, dans le champagne, des oligopeptides inhibiteurs in vitro d'une enzyme majeure impliquée dans la régulation de la tension artérielle. Actuellement, 9 d'entre eux ont été testés, parmi lesquels, 4 présentent cette propriété. In vivo, l'administration répétée par voie orale d'un extrait de champagne contenant ces peptides a permis de mettre en évidence un effet antihypertenseur significatif chez des rats hypertendus après 12 jours de traitement. Cet effet apparaît 2 heures après administration orale et se maintient durant les 8 heures d'expérimentation.

Issus pour la plupart du métabolisme des levures et de leur autolyse, les peptides des vins sont encore peu connus. Ainsi, la caractérisation de l'extrait a permis d'identifier et de quantifier 11 peptides dans le champagne, dont 7 ont montré des propriétés inhibitrices vis-à-vis de l'ECA (Arg-Pro-Pro, Arg-Tyr, le-Arg, Lys-Phe, Lys-Tyr, Tyr-Arg et Tyr-Gln). De plus, 6 peptides (Arg-Tyr, Lys-Tyr, Tyr-Arg, Tyr-Gln et Tyr-Lys et Val-Ile) ont montré un intérêt quant au suivi du vieillissement des vins de Champagne.

Il est à noter également que de nombreux oligopeptides sont reconnus pour leurs propriétés gustatives. Le suivi qualitatif et quantitatif de ces composés au cours de la maturation permettrait de distinguer des peptides marqueurs de vieillissement, voire d'isoler des peptides en relation avec l'évolution gustative des champagnes.

De plus, l'identification de molécules physiologiquement actives pourrait, d'une part, contribuer à résoudre l'énigme du « French Paradox » et d'autre part, participer à l'établissement de nouvelles pistes moléculaires dans la recherche pharmacologique.
