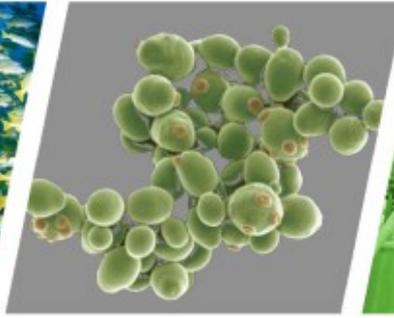


adebiotech



Peptides issus des procédés d'hydrolyse Filières Industrielles

2 et 3 octobre 2012

Biocitech - Paris-Romainville



COMPTE-RENDU

Avec le soutien de

ingredia
GROUP


ROQUETTE
Offering the best of nature™



Colloque Adebiotech/SFGP



Peptides issus des procédés d'hydrolyse : Filières Industrielles

2 et 3 octobre 2012

Parc Biocitech, Romainville

COMPTE-RENDU

Auteurs

Laetitia Canabady-Rochelle^a, Karima Hedhili^b,

Coordinateurs

Romain Kapel^a, Pascal Dhulster^b

^a Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, U.M.R. 7274 - C.N.R.S., Université de Lorraine, Plateforme S.V.S., 13 rue du bois de la Champelle, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy.

^b ProBioGEM, UPRES-EA 1026, Polytech'Lille, Boulevard Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq.

Table des matières

Introduction Générale.....	5
1. Domaines d'application des hydrolysats et/ou fraction d'hydrolysats protéiques	6
1.1 Applications dans le domaine de la nutrition	6
1.2 Applications en texturation de produits alimentaires	8
1.3 Applications dans le secteur de la santé et des nutraceutiques.....	8
1.3.1. Effets sur le syndrome métabolique	8
1.3.2. Effet sur le système cardio-vasculaire (activité anti hypertensive).....	9
1.3.3. Effet sur le système nerveux.....	10
1.3.4. Effet sur le système digestif	11
1.3.5. Effet antimicrobien	12
1.3.6. Peptides antioxydants et anti-radicalaires.....	12
2. Procédés d'hydrolyse, d'extraction, de séparation, de purification et outils de caractérisation.	13
2. 1. Procédés d'hydrolyse.....	13
2.2 Caractérisation, identification, quantification de petits peptides au sein d'un mélange complexe.....	14
2.3 Fractionnement et extraction de peptides/protéines	15
2.3.1 Fractionnement de peptides d'hydrolysats protéiques.....	15
2.3.2 Extraction de matière protéique issues de coproduits.....	16
2.4 Séchage et conservation des peptides bioactifs.....	17
3. Aspects réglementaires : innocuité, bio-marqueurs et modèles soutenant les allégations	18
3.1. La première liste allégations de santé génériques	18
3.2. Bio-marqueurs d'intérêt dans le cadre de l'évaluation des allégations santé	21
3.3. Réglementation des produits chimiques dans l'Union Européenne.....	24
3.4. Réglementation des cosmétiques dans l'Union Européenne	25
3.5. Autres réglementations	26
3.6. Réglementation des auxiliaires technologiques dans l'Union Européenne.....	26
4. Succès et verrous industriels, perspectives de développement.....	28
4.1. Les succès et verrous industriels	28
4.2. Perspectives de développement	31
4.3. Rôle de la DGCIS pour promouvoir l'innovation et l'économie industrielle	35
Résumés des Posters.....	37
Relation entre l'Affinité d'un Acide Aminé pour un Ion métallique Immobilisé et sa Bioactivité : Etude à l'Echelle Moléculaire d'un Procédé de Séparation Sélectif de type IMAC	38
État de structuration des protéines : un nouveau paramètre de contrôle de la protéolyse enzymatique	39
Use of electrodialysis with ultrafiltration membrane for the simultaneous enzymatic hydrolysis production and fractionation of bioactive peptides from beta-lactoglobulin	40
Préparation à l'échelle pilote d'un hydrolysats pepsique décoloré et actif de l'hémoglobine : Source de peptides antibactériens.....	41

Voie de valorisation de l'hémoglobine bovine : modélisation de la cinétique enzymatique des peptides antimicrobiens.....	42
Influence de la micro fluidique sur la modulation de la cinétique enzymatique	43
Production and resistance of bioactive peptides from bovine hemoglobin during an in vitro simulated digestion.	44
Fractionnement de peptides issus de l'hydrolyse des caséines par les protéases de surface de Lactobacillus	45
Caractérisation structurale de peptides composants un hydrolysats protéique complexe	46
Immobilisation d'enzymes par la technologie des plasmas froids	47
Conception de membranes hydrophobes par fonctionnalisation en C18 : application pour la séparation de biomolécules de nature protéique	48
Séparation sélective de peptides et d'acides aminés par des membranes cationiques de nanofiltration à base de poly(étherimide).....	49
Stacking of ultrafiltration membranes with different molecular weight cut-offs on the production of glucose captation bioactive flaxseed peptide fractions by electrodialysis with ultrafiltration membranes	50
Anti-diabetic soy peptides fractions recovered by membrane processes: comparison of UF and EDUF.	51
Cryptides marins et syndrome métabolique : quels modes d'action ?	52
Activités d'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 1 d'hydrolysats de peaux de poisson.	53
Effect of in vitro simulated digestion on peptidic profiles and CGRP-like activity of fish protein hydrolysates (FPH).....	54
Activités antioxydante et inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I d'un lait de chamelle fermenté par une souche protéolytique de Streptococcus thermophilus	55
Inhibition de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine I par des peptides issus de protéines du lait bovin : Etude des interactions moléculaires par la technologie Biacore.....	56
Hydrolyse pepsique de la caséine bovine : Obtention de peptides à activité antimicrobienne.....	57
Effet du serocolostrum, du lait et du lactosérum camélins et de leurs hydrolysats pepsiques sur la croissance de Listeria innocua	58
Le peptidome exocellulaire de <i>Lactococcus lactis</i> révèle une protéolyse de surface importante et suggère l'existence de phénomènes de communication cellulaire.	59
L'hydrolyse enzymatique du lactosérum bovin sous micro-ondes diminue l'allergénicité de la BLG chez le modèle animal d'allergie.	60
Intervenants	61
<i>Laurent BAZINET</i>	61
<i>Grégoire BERTHE</i>	61
<i>Jean-Pascal BERGÉ</i>	61
<i>Stéphanie BORDENAVE-JUCHEREAU</i>	61
<i>Leslie BOUDESOCQUE</i>	62
<i>Joseph BOUDRANT</i>	62
<i>Jean-François BOUSSARD</i>	62
<i>Pascal DHULSTER</i>	62
<i>Charles DELANNOY</i>	63
<i>Vincent DELATOUR</i>	63
<i>Vincent FOURNIER</i>	64
<i>Renato FROIDEVEAUX</i>	64
<i>Jean-Luc GARRIGUE</i>	64
<i>Claire GAUDICHON</i>	64
<i>Bruno GEHIN</i>	64
<i>Fabienne GUERARD</i>	65

<i>David GUERRAND</i>	65
<i>Thomas HAERTLÉ</i>	65
<i>Romain KAPEL</i>	66
<i>Pedro LAMEIRAS</i>	66
<i>Danielle LANDO</i>	66
<i>Yves LE ROUX</i>	66
<i>Karl LINTNER</i>	67
<i>André MARETTE</i>	67
<i>Laurent MICLO</i>	67
<i>Pierre MORTAMAIS</i>	67
<i>Camille NOURY</i>	67
<i>Christophe RIPOLL</i>	68
<i>Alix ROGER</i>	68
<i>Luce SERGENT</i>	68
<i>Adrien SCHEFFER</i>	68
<i>Jean-luc SIMON</i>	68
<i>Corinne SOLEAU</i>	69
<i>Daniel THOMAS</i>	69
<i>Julie UNZEITIG</i>	69
<i>Rémi URBAIN</i>	70
<i>John VAN CAMP</i>	70
<i>Jean-Michel WAL</i>	70

Introduction Générale

(J.L. Simon, société Ingredia Arras)

Les protéines, molécules constitutives ou fonctionnelles de tout organisme vivant, quelle qu'en soit l'origine, sont bio synthétisées à partir des briques élémentaires que sont les acides aminés ; certains de ceux-ci étant essentiels aux mammifères qui sont incapables de les produire.

L'alimentation nous apporte, via les protéines des organismes vivants que nous consommons, des sources d'azote indispensables pour fabriquer nos propres protéines. La digestion puis le catabolisme cellulaire sont le siège naturel des hydrolyses enzymatiques de ces protéines.

Depuis longtemps, l'Homme a cherché à reproduire ces hydrolyses industriellement pour obtenir une grande diversité d'hydrolysats de protéines aux propriétés rhéologiques, organoleptiques, de conservation, nutritionnelles et de santé très diverses.

La maîtrise des procédés de production, des techniques de caractérisation physico-chimiques et des propriétés fonctionnelles des hydrolysats sont au cœur de ses préoccupations. S'agissant de denrées alimentaires ou d'ingrédients pour la Cosmétique ou la Pharma, la réglementation encadre cette activité de façon stricte.

La mise sur le marché d'un hydrolysats de protéine nécessite donc de lever un grand nombre de verrous scientifiques, technologiques et réglementaires largement identifiés au cours de la tenue du colloque qui a permis d'aborder sous différents angles cette nouvelle filière industrielle en devenir.

1. Domaines d'application des hydrolysats et/ou fractions d'hydrolysats protéiques

Les peptides présentent des compositions en acides aminés, des propriétés des physico-chimiques, des séquences et ou des structures particulières qui permettent un éventail très large de fonctionnalités qui vont intéresser divers secteurs d'applications industrielles. La composition en acides aminés et la digestibilité de certains hydrolysats ou de fractions peptidiques vont conférer d'excellentes propriétés nutritionnelles avec des applications dans le secteur de l'alimentation, voire de la santé. Les propriétés physico-chimiques des peptides dues à la variété de fonctions chimiques des chaînes latérales exposées sont à l'origine des propriétés de texturation de produits agro-alimentaires (propriétés dites fonctionnelles) ou cosmétiques. Enfin, les activités biologiques portées par de nombreux peptides permettent d'envisager des applications dans le secteur de la santé ou des nutraceutiques. D'une manière générale, le contenu de la seconde session du congrès a permis d'établir le large spectre des possibilités d'application des peptides provenant de l'hydrolyse enzymatique de protéines issues d'agro-ressources.

1.1. Applications dans le domaine de la nutrition

Deux conférences ont été proposées dans ce cadre d'application. L'une sur l'apport des hydrolysats dans les processus de synthèse musculaire (Pr. Van Loon, université de Maastricht, Pays-bas) et l'autre sur l'effet de la protéolyse enzymatique sur la réduction de l'allergénicité des protéines alimentaires (Jean-Michel Wal, laboratoire d'Immuno-Allergie Alimentaire INRA, équipe de Pharmacologie et Immunologie, UMR INRA / CEA de Saclay).

La présentation du Pr. Van Loon portait sur la stimulation de la synthèse protéique par des protéines alimentaires, qui s'avère intéressante dans les cas de pertes musculaires (vieillesse, personnes à mobilité réduite, les patients atteints de sarcopénie, de diabète de type 2, ou de maladies cardiovasculaires) et aussi pour l'augmentation de la masse musculaire des sportifs.

Chaque jour, 1 à 2% de la fraction musculaire est synthétisée et l'ingestion d'aliment constitue le principal stimulus anabolique responsable de cette synthèse. Les hydrolysats protéiques favorisent la synthèse musculaire de manière dose-dépendante. L'apport de protéines et la contraction musculaire stimulent la synthèse protéique. L'ingestion de protéines suivant un exercice physique augmente l'accrétion de protéines musculaires.

Le Dr. Wal, a présenté dans une conférence introductive à la session 2 l'apport de l'hydrolyse enzymatique sur la réduction de l'allergénicité des protéines alimentaires en précisant les verrous et les limitations du procédé toujours existants en la matière.

Les allergies alimentaires constituent un nouveau problème de santé publique. En effet, la prévalence des allergies alimentaires touche environ 3 à 5 % de la population adulte et elle est en constante augmentation. 7 à 8 % des enfants sont concernés et cela double tous les 5 ans. Les allergies ont été classées au quatrième rang mondial des maladies selon l'OMS. De plus en plus d'aliments sont responsables d'allergies alimentaires et aujourd'hui plus de 170 aliments sont mis en cause. Les allergies sont de plus en plus sévères avec un nombre de chocs multiplié par 5 en 10 ans. Aussi, les allergies alimentaires ont un fort impact économique avec des raisons encore mal connues. Une allergie alimentaire se définit comme une réaction secondaire non-toxique, immunologique, médiée par des immunoglobulines (IgE). C'est une réponse immuno-pathologique à un composant protéique provenant d'un aliment allergène, par un individu génétiquement prédisposé dit atopique.

La réaction allergique présente des aspects multifactoriels. Elle est déclenchée par un allergène chez un individu atopique, sous certaines conditions d'exposition et de facteurs

environnementaux.

Les allergènes alimentaires sont généralement des protéines avec une structure globulaire, compacte, stabilisée par des liaisons internes. Ils sont impliqués dans d'importantes fonctions métaboliques et activités biologiques. Stables aux traitements thermiques, ils résistent à la protéolyse par les enzymes digestives. Afin de réduire les allergies alimentaires chez les nouveau-nés, des formules lactées hydrolysées ont été mises au point. Celles-ci sont préparées par hydrolyse enzymatique (par exemple, trypsine porcine, enzyme bactérienne) combinée à des traitements thermiques sur un substrat (comme le lactosérum ou la fraction de caséine).

L'hypoallergénicité peut être évaluée par différentes méthodes. Les méthodes physico-chimiques s'avèrent plus efficaces qu'une simple détermination du degré d'hydrolyse. Les gels d'électrophorèse (SDS-PAGE) et la CLHP permettent une analyse de protéines résiduelles et l'obtention de profils peptidiques. Ces méthodes peuvent être couplées à de la spectrométrie de masse afin de caractériser les peptides. Par ailleurs, des méthodes immunochimiques (EAST, EAST inhibition, immunoblotting) permettent d'évaluer le potentiel allergène d'un produit en évaluant la capacité de liaison d'un peptide ou d'une protéine aux IgE humaines. Enfin, des expériences réalisées sur des modèles animaux permettent de déterminer la capacité de sensibilisation ; en dernier lieu, l'hypoallergénicité est déterminée par des essais cliniques réalisés chez l'homme.

Les laits hydrolysés hypoallergéniques sont testés *in vitro*, par des essais cellulaires (modèle animal) et par des essais *in vivo*. Le tableau suivant présente la modulation de la réponse allergique chez l'animal dans différents laits (i.e. lait infantile, hydrolysats partiels, hydrolysats extensifs).

Ces formules lactées hydrolysées hypoallergéniques sont données en prévention pour les enfants à risque atopique ; en thérapeutique, les enfants allergiques reçoivent des formules anallergiques. Les formules hypoallergéniques ont une allergénicité réduite ; tolérogènes, elles préviennent la sensibilisation à long terme et correspondent à des hydrolysats partiels. Les formules anallergiques ont une allergénicité supprimée ; elles évitent le déclenchement d'une réaction allergique chez les enfants sensibilisés et correspondent à des hydrolysats extensifs.

Les formules lactées hydrolysées hypoallergéniques ont été l'objet d'études cliniques. L'étude GINI (German Infant Nutritional Intervention) est une étude aléatoire, réalisée en double aveugle. De 1995 à 1998, 2252 enfants à risque atopique ont été soumis à 4 régimes : formule lactée, hydrolysats partiels de lactosérum, hydrolysats « poussés » de lactosérum ou de caséines, de la naissance à l'âge de 4 mois. Cette cohorte a été suivie jusqu'à l'âge de 6 ans.

L'effet de l'hydrolyse sur la réduction de l'allergénicité se manifeste à la fois sur des critères sérologiques et cliniques (prévention et "thérapeutique"). Néanmoins, la diminution de l'allergénicité n'est jamais totale et dépend de plusieurs facteurs : la protéine, le degré d'hydrolyse, le terrain génétique (sévérité de l'a.a et des formes de manifestations cliniques). Cela implique divers mécanismes tels que la réassociation des peptides (ponts S-S et/ou formation d'agrégats), et la taille des peptides. En effet, les petits peptides peuvent encore être IgE-réactifs et fonctionnels.

Malgré une diminution de l'allergénicité, le risque de réactivité est maintenu chez certains patients (diminution insuffisante > seuil d'allergénicité) et conduit à une réaction allergique. La prudence est de mise pour les enfants à risque quant à l'utilisation d'hydrolysats en nutrition et de peptides isolés en immunothérapie.

De manière intéressante, il est montré qu'une combinaison de protéolyse enzymatique et d'un traitement par micro-onde (entre 50 W et 200 W) sur des durées de 3 à 5 minutes permet d'améliorer significativement la réduction de l'allergénicité de la β -lactoglobuline bovine ([poster de El Mecherfi](#) et coll., UR 1268 BIA, INRA, Nantes), ce qui ouvre des perspectives notoires dans certains cas de figures.

1.2. Applications en texturation de produits alimentaires

Les propriétés physico-chimiques particulières des protéines et des peptides liés à leurs propriétés nutritionnelles permettent une utilisation comme ingrédients de texturation de produits alimentaires formulés.

Valérie Gagnaire (INRA) a présenté dans ce cadre une conférence centrée sur l'implication de la présence de peptides hydrophobes de taille supérieure à dix résidus d'acides aminés sur les propriétés de filage de l'emmental.

1.3. Applications dans le secteur de la santé et des nutraceutiques

Certains peptides ont la capacité d'interagir avec une cellule ou un type cellulaire et de déclencher une réaction physiologique. Ces peptides sont dits « peptides bioactifs ». Les différents types de peptides bioactifs ont été déclinés au cours de la conférence introductive de la session 1 (Romain Kapel, LRGP – UMR CNRS 7274, université de Lorraine), et de la présentation de Vincent Fournier, du groupe Diana Ingrédients, qui présente la variété importante des types de bioactivités portées par des peptides. De nombreuses bases de données regroupent les séquences de peptides bioactifs mis en évidence (à partir d'hydrolysats mais aussi isolés dans différents organismes vivants). Ces bases de données peuvent être utilisées pour prédire le potentiel d'intérêt de l'hydrolyse de certaines protéines contenant ces séquences dans leur séquence primaires.

Chaque type de bioactivités a été exposé dans les présentations décrites ci-après. L'obtention de peptides bioactifs présentés a été obtenue dans la plupart des cas par protéolyse enzymatique de protéines issues d'agro-ressources et/ou de coproduits d'origines variées (lait, végétaux, coproduits de la mer...), montrant bien l'intérêt de la valorisation de ce type de protéines par protéolyse enzymatique.

1.3.1. Effets sur le syndrome métabolique

Le syndrome métabolique regroupe un certain nombre de perturbations de voies métaboliques conduisant à diverses pathologies (obésité, diabète, maladies cardiovasculaires...). Les effets de peptides ou de fraction de peptides enrichies en peptides bioactifs permettant de limiter les effets de ce syndrome métabolique ont été présentés par Yasmine Ben Henda (université La Rochelle, France) et le Dr. Roblet (Institut National des Aliments Fonctionnels, Université Laval, Québec).

La présentation de Y. Ben Henda rappelle ce qu'est le syndrome métabolique et précise que certains peptides (issus de l'hydrolyse de coproduits de la mer) ont une action sur un certain nombre de ses conséquences, en particulier sur la dyslipidémie en diminuant le cholestérol sanguin et hépatique, sur l'hypertension artérielle en inhibant l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) ou encore le diabète en augmentant la sensibilité à l'insuline et en retardant l'absorption du glucose. Ils peuvent également agir indirectement sur l'obésité par un effet satiétogène, un contrôle de la prise alimentaire, et en augmentant le taux d'acides biliaires dans le sang. Ces peptides peuvent présenter une approche thérapeutique efficace pour traiter l'obésité et les maladies associées en régulant l'hyperplasie et l'hypertrophie des adipocytes. Ils régulent la prolifération et inhibent la différenciation des adipocytes par leur capacité cytotoxique et antiproliférative. Des résultats montrent qu'un peptide (Val-Trp, VW) influe sur l'obésité par son effet sur la différenciation adipocytaire.

D'autres résultats présentés indiquent que le diabète de type 2 peut être limité par inhibition de l' α -amylase et de l' α -glucosidase, ce qui ralentit la digestion des glucides et diminue leur absorption : la glycémie postprandiale est ainsi abaissée. Cette stratégie s'avère intéressante pour le contrôle de la glycémie chez les patients diabétiques et présente une alternative aux molécules chimiques utilisées (comme l'acarbose, le miglitol). Suite à leurs utilisations, les troubles digestifs, les douleurs abdominales et les ballonnements disparaissent.

André Marette, a présenté les travaux de son équipe portant sur la purification, la caractérisation et la validation des effets sur le syndrome métabolique d'hydrolysats de protéines de poissons et de peptides également issus d'hydrolyses de produits et/ou coproduits d'origine marine. L'obésité viscérale est associée à un ensemble de désordres métaboliques parmi lesquels l'hypertriglycéridémie, un faible cholestérol HDL, un niveau d'apolipoprotéine B élevé, des particules petites et denses de LDL, une résistance à l'insuline, l'hyper-insulinémie, une intolérance au glucose, une fibrinolyse altérée, et un dysfonctionnement endothélial. L'ensemble de ces caractéristiques peut conduire au diabète de type 2, à l'hypertension et aux maladies cardiovasculaires. La pathogénèse de la résistance à l'insuline entraîne un diabète avec maladie cardiovasculaire. L'obésité, le diabète et les maladies cardiovasculaires augmentent l'insulinémie, la glycémie, l'inflammation, la triglycéridémie, le cholestérol LDL et diminuent le cholestérol HDL. Or, la consommation de poisson peut lutter contre ces effets néfastes.

Les travaux d'André Marette et de son équipe portent sur les protéines et peptides extraits de poissons comme nouvelle approche nutraceutique pour la prévention et le traitement de la résistance à l'insuline et du diabète chez les sujets obèses.

Les résultats portent sur des fractions de peptides obtenus par hydrolyse enzymatique de déchets de poissons et ultrafiltration (taille moléculaire inférieure à 1 kDa). Ces peptides favorisent le prélèvement du glucose dans les cellules musculaires (c'est-à-dire le myocytes L6). Par ailleurs, d'autres fractions peptidiques provoquent une diminution significative de la production de glucose dans des cellules hépatocytaires cultivées. Enfin, une autre fraction module la libération du monoxyde d'azote des macrophages.

Ces peptides bioactifs *in vitro* ont été testés chez un modèle animal : des souris atteintes d'obésité et d'athérosclérose. Le gain de poids et l'apport énergétique de souris LDLr/ApoB a été étudié après 12 semaines de régime alimentaire supplémenté ou non de peptides de saumon et/ ou d'huile de poisson. Les régimes supplémentés en peptides de saumon et/ou d'huile de poisson améliorent la tolérance au glucose chez les souris atteintes d'obésité et d'athérosclérose.

Les perspectives de ces recherches sont d'identifier de nouveaux peptides bioactifs issus de poissons, de valider leur bioactivité avec des modèles animaux, de réaliser des essais cliniques avec des aliments fonctionnels enrichis en ces peptides bioactifs.

1.3.2. Effet sur le système cardio-vasculaire (activité anti hypertensive)

Les travaux de l'équipe du professeur Van Camp (Université de Gent, Belgique) concernent les peptides antihypertenseurs ayant une activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) ou agissant sur le récepteur CCK1. La bioactivité des peptides antihypertenseurs obtenus par protéolyse est testée sur l'activité du récepteur CCK1, sur un modèle de cellules CHO *in vitro*. Les peptides ayant une bioactivité avérée sont identifiés et la relation entre leur structure et leur activité est établie. *In fine*, l'activité biologique des peptides antihypertenseurs est *qualifiée in vivo* chez le rat.

Par ailleurs, le laboratoire Littoral, Environnement et Sociétés (LIENSs, UMR CNRS 7266, la Rochelle) étudie l'activité anti hypertensive de cryptides marins. Parmi les peptides bioactifs d'origine marine (présentation de Yasmine Ben Henda), certains dipeptides (tels IY, VY, KY,

VW et AP) et tri-peptides (comme GLP, LKP, VIY, AKK et VAP) sont de puissants inhibiteurs de l'ECA. La valeur IC50 du peptide VW est très intéressante comparée à celle du captopril, inhibiteur commercial de référence. Ces peptides peuvent être issus de protéines provenant de sources très variées et peuvent être générées par différentes voies.

Trois posters concernant la mise en évidence d'activité de type inhibition de l'ECA dans des hydrolysats protéiques de sources diverses ont été présentés ([Labidi](#), [Cakir-Kiefer](#), [El HAtm](#)).

1.3.3. Effet sur le système nerveux

Certains peptides agissent sur le système nerveux et entraînent des effets biologiques de type anti-stress, anxiolytiques, antalgiques et analgésiques. Par exemple, les peptides de poissons tel le gabolysat ont un effet similaire au diazépam ; l'hydrolysate de mollusque module la perception de la douleur par effet opioïde.

Les travaux de l'Unité de Recherche Animal et Fonctionnalité des Produits animaux (URAFPA, Université de Lorraine) présentés par Yves Leroux et Laurent Miclo (Equipe Protéolyse et Bio-fonctionnalité des Protéines et des Peptides) portent sur les peptides anxiolytiques issus du lait, leur biodisponibilité et leur activité.

L'objectif de leurs travaux est de déterminer si les peptides d'origine alimentaire peuvent exercer des fonctions régulatrices dans l'organisme humain, dans le cadre d'une alimentation équilibrée. Les cibles d'action potentielles des peptides bioactifs du lait sont les systèmes cardiovasculaire, nerveux, digestif et immunitaire. Cependant ces activités sont mises en évidence majoritairement par des études *in vitro*.

L'activité anxiolytique de l'hydrolysate trypsique de caséine α 1(HT) a été mise en évidence chez le rat par une étude comportementale. Par ailleurs, l'activité anticonvulsive de l'hydrolysate trypsique de caséine a été également étudiée. L'hydrolysate trypsique de caséine déplace le 3H-flunitrazépam avec un IC50 de 72 μ M. Le fragment (f91-100) de la caséine α 1 déplace le 3H-flunitrazépam avec un IC50 de 88 μ M. Ce dernier fragment est nommé α -casozépine.

Après administration per os, l'hydrolysate trypsique de caséines (fabrication industrielle – Lactium[®]) entraîne chez le rat un effet anxiolytique, une diminution des perturbations du sommeil induites par le stress, une amélioration de la phobie sociale; chez le chien des effets similaires à la séléphine (inhibiteur de la MAO) et une réduction du stress ont été observés chez le chien.

Des études cliniques ont été réalisées pour le Lactium[®]. La première étude clinique a été réalisée chez 43 volontaires masculins, sans pathologie cardiovasculaire ; l'étude aléatoire a été conduite en double aveugle, contrôlée contre un placebo. L' α -casozépine (8 mg par prise, 3 prises de J-1 à J0) a été administrée per os. Cela a entraîné une diminution de la pression artérielle lors d'un stress. Une seconde étude clinique a été réalisée sur 63 femmes présentant des symptômes avérés de stress. L'étude clinique a été réalisée en double aveugle, contrôlée contre un placebo et croisée. L' α -casozépine a été administrée à raison de 3 mg par prise, pendant 30 jours. Ce traitement a induit une diminution significative des symptômes digestifs, cardiovasculaires, intellectuels, émotionnels et sociaux dus au stress.

D'après ces résultats, des allégations santé ont été accordées au Lactium[®] en 2007 par la DGCCRF et autorisées par l'AFSSA. L'allégation santé stipule que le Lactium[®] peut modérer la réponse tensionnelle au stress notamment chez les personnes particulièrement sensibles. Des allégations formulées différemment n'ont pas été autorisées par l'EFSA en 2011. En 2009, des allégations ont été accordées par l'Australian Therapeutic Goods Administration. Ce produit a été approuvé par l'US FDA, avec des statuts GRAS et NDI (Generally Recognized As Safe et New Dietary Ingredient, respectivement).

1.3.4. Effet sur le système digestif

Pascale Plaisencé (chercheur dans une UMR INSERM/INRA, rattachée au laboratoire de recherche en cardiovasculaire, métabolisme, diabétologie et nutrition) et Joëlle Léonil (UMR INRA/Agrocampus Ouest, laboratoire STLO, Rennes) ont présenté les travaux portant sur un peptide bioactif issu des laits fermentés, modulateurs de la protection intestinale : le peptide β -CN.

En cas d'infection par des microbiotes, des endotoxines sont libérées entraînant des pathologies intestinales. Les cellules à mucus et les cellules de Paneth jouent un rôle primordial dans la barrière intestinale. Les cellules à mucus forment une barrière épithéliale fonctionnelle et l'altération de celle-ci au niveau des cellules à mucus est responsable de l'inflammation intestinale. Les cellules de Paneth impliquent la libération d' α -défensines (HD5, HD6) de phospholipase A2 et de lysozyme. Ces cellules jouent un rôle de défense antimicrobienne en contrôlant la composition du microbiote. De fait, la barrière intestinale est une cible de peptides fonctionnels.

Les protéines laitières contiennent des protéines sériques et différentes caséines. La caséine β forme par digestion enzymatique des β -casomorphines (peptides opioïdes) qui agissent sur les cellules à mucus. Celles-ci expriment MUC2, provoquant une sécrétion rapide et massive de mucus (MUC2), ce qui protège immédiatement la barrière intestinale.

La découverte du peptide β -CN (94-123) a été réalisée par criblage *in vitro*. La β -caséine bovine est riche en peptides opioïdes tels que la β -casomorphine (60-70) ou la néocasomorphine-6 (114-119). Les bactéries lactiques utilisées dans les laits fermentés produisent des précurseurs de β -casomorphines (séquence 57-68 et 75-72).

L'objectif de ce travail était de déterminer si les peptides précurseurs de peptides opioïdes présents dans les yaourts étaient capables de stimuler la production de mucines intestinales. Deux ensembles peptidiques « totaux » de deux yaourts (un yaourt commercial et un yaourt préparé en laboratoire) ont été caractérisés. Les effets des pools peptidiques totaux ont été étudiés sur des cellules mucipares *in vitro* et plus particulièrement sur la sécrétion (MUC2) et l'expression (MUC2, MUC4) de mucines intestinales. Puis, les effets de certaines fractions peptidiques issues des pools C et F ont été étudiés *in vitro* sur les cellules mucipares. Une seule fraction était active et l'analyse des séquences peptiques présentes dans la fraction a permis d'isoler la séquence β -CN (94-123) comme précurseur de la néocasomorphine-6 (114-119). Cette séquence β -CN (94-123) a ensuite été étudiée *in vitro* sur des cellules de la lignée intestinale mucipare humaine HT29-MTX. La séquence β -CN (94-123) induit une sécrétion de MUC2 (0.01 à 1 μ M), ainsi que l'expression de MUC2 et de MUC4 (ARNm, protéines), avec un effet indépendant de la voie μ -opioïdérique. Ce nouveau peptide fonctionnel ciblant l'épithélium intestinal fait l'objet d'un brevet déposé en 2009 comme « composé augmentant la sécrétion d'au moins une mucine gastro-intestinale ». L'effet de ce peptide bioactif a été étudié chez le rat wistar par cannulation gastrique. Ce peptide β -CN (94-123) augmente le nombre de cellules à mucus dans le duodénum, le jéjunum et l'iléon mais ne présente aucun effet au niveau du côlon. Il augmente également l'expression de MUC2 et de MUC4 au niveau des ARNm et des protéines. Le peptide β -CN (94-123) présente également un effet *in vivo* sur les cellules de Paneth à partir de 0,01 μ M.

En conclusion, le peptide β -CN (94-123) est un nouveau peptide ciblant le tractus intestinal. Actif *in vivo*, il résiste aux enzymes digestives. Son action au niveau des cellules à mucus favorise la sécrétion de mucus, protégeant ainsi la muqueuse intestinale; il entraîne une modulation du microbiote intestinale. Ce peptide bioactif *in vivo* agit au niveau des cellules de Paneth en augmentant la sécrétion d' α -défensine et de lysozyme. L'utilisation de peptides bioactifs est une piste à approfondir pour maintenir voire renforcer la protection intestinale ou pour traiter des pathologies intestinales.

1.3.5. Effet antimicrobien

Certains peptides présentent des propriétés bactériostatiques et/ou bactéricides. Ils apparaissent comme des molécules naturelles alternatives aux antibiotiques qui font faces à des problèmes de multi-résistance. D'autres applications en sécurité alimentaire peuvent être envisagées. Ces peptides antimicrobiens possèdent soit une structure amphiphile, ce qui perturbe la fluidité membranaire, soit une structure cationique qui interagit et s'insère dans la couche de phospholipides membranaires. Cela provoque la formation d'agrégats grâce à leur structure hélicoïdale et la formation d'un canal ionique qui perturbe le flux d'ions. D'autres peptides possèdent des structures anioniques (ex. la kappacine).

La nisine est un exemple de peptide antimicrobien synthétisé par les bactéries. Elle agit de façon synergique contre la *Listeria monocytogenes*. L'activité antimicrobienne est aussi communément rencontrée au niveau d'hydrolysats protéiques.

Trois posters ont traité de la mise en évidence de peptides à activité antimicrobienne dans des hydrolysats protéiques ([Jrad](#), [Adaoui](#), [Nedjar-Arroume](#)).

1.3.6. Peptides antioxydants et anti-radicalaires

Les antioxydants trouvent de nombreuses applications soit dans le secteur des cosmétiques, de la santé, dans les ingrédients alimentaires, l'alimentation animale, les nutraceutiques, diététiques et aliments fonctionnels.

La capacité antioxydante des hydrolysats protéiques peut être améliorée par réaction de Maillard, effectuée en conditions contrôlées (Présentation de Fabienne Guérard, Université de Bretagne Occidentale). La réaction de Maillard, entre la fonction réductrice d'un sucre et un groupement aminé, peut induire la formation de composés antioxydants. Actuellement, peu de travaux rapportent l'étude de la réaction de Maillard sur des hydrolysats. Or, cette réaction en elle-même présente de nombreux intérêts par des propriétés technofonctionnelles et biologiques diverses. L'équipe de Guérard a optimisé de manière progressive les facteurs de la réaction de Maillard en milieu liquide par un choix approprié notamment de l'hydrolysat protéique et d'un glucide

La problématique de cette étude était de savoir si la réaction de Maillard pouvait être utilisée pour améliorer les propriétés antioxydantes et technofonctionnelles d'un hydrolysat protéique de coproduits marins. Différents systèmes réactionnels ont été étudiés comme la source protéique (comme par exemple hydrolysat de crevettes, caséinate de sodium) et glucidique (des monosaccharides, oligo et polysaccharides). Les résultats de cette étude ont démontré que la réactivité des glucides (xylose > glucose > FOS >> dextrans) avait un impact sur la fonction aminée libre et sur les réarrangements moléculaires. Par ailleurs, il a été démontré une amélioration de la capacité antioxydante par réaction de Maillard avec le xylose, en lien avec sa concentration.

Les pentoses sont plus réactifs que les hexoses. Le système modèle SH-xyl (source de SH non glyqué) a son activité antioxydante augmentée. Par ailleurs, l'addition de produits de la réaction de Maillard modifie les propriétés rhéologiques et stabilise une émulsion. Ce nouvel ingrédient est donc bi-fonctionnel.

2. Procédés d'hydrolyse, d'extraction, de séparation, de purification et outils de caractérisation.

2. 1. Procédés d'hydrolyse

La présentation de David Guerrand et André De Roos, (DSM Food Specialities), portait sur le développement récent de protéases spécifiques et leurs applications.

A l'heure actuelle, les industriels utilisent essentiellement des protéases non spécifiques à large spectre afin de cliver les protéines de manière aléatoire et non ciblée (papaïne, protéases alcalines, acides ou neutres). Une protéase spécifique, par son mode d'action déterminé, permet le contrôle de la réaction d'hydrolyse et des peptides générés (en quantité, tailles et natures). L'utilisation d'enzymes spécifiques, permet de contrôler le profil des segments protéiques libérés au cours de la réaction d'hydrolyse. Un choix judicieux de l'enzyme permet ainsi de prévoir la composition d'un hydrolysate protéique afin de satisfaire les exigences industrielles dans le cadre d'une application particulière.

Dans le cadre de cette présentation, l'exemple d'utilisation d'une protéase spécifique des protéines riches en proline « Prolin Specific Protease » ou PSP) pour des applications dans le secteur de la transformation des céréales (production des produits sans gluten), de la brasserie et la valorisation de sous-produits animaux a été présenté. La PSP est une exo protéase produite par le champignon filamenteux '*Aspergillus niger*' qui hydrolyse les peptides en C des proline qui fonctionne à pH acide (<5).

Les résultats présentés montrent que l'action de la PSP améliore la biodisponibilité et la digestibilité des protéines de laits (laits infantiles), diminue l'allergénicité (produits sans gluten), et améliore les propriétés sensorielles (diminution de l'amertume des peptides). Par ailleurs, la PSP agit sur les propriétés techno-fonctionnelles (solubilité, émulsification et gélification) des protéines. D'autre part, elle réduit la toxicité des épitopes allergènes du gluten (riches en proline (P)). Cette protéase est très utilisée pour la production des produits « sans Gluten » sans avoir à modifier les recettes (ex : remplacement du blé par du riz) et sans impact négatif sur le goût et la texture des produits finis tout en évitant le risque d'allergénicité lié au gluten.

La session de poster présente six travaux académiques sur le procédé de protéolyse enzymatique sur :

- des innovations technologiques ([Poster, El Mecherfi](#), [Poster Froidevaux](#)),
- les modélisations cinétiques de libération de peptides ([Poster Hedhili](#))
- l'influence de la structure des protéines sur la protéolyse ([poster Nioi](#))
- la protéolyse gastro-intestinale ([poster Cudennec, Dequines](#)).

2.2 Caractérisation, identification, quantification de petits peptides au sein d'un mélange complexe

Le développement d'outils de caractérisation de petits peptides en mélanges complexes a été abordé par Christelle Harscoat-Schiavo (Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, Université de Lorraine).

Le laboratoire Réactions et Génie des Procédés de Nancy a mis au point une méthodologie de caractérisation de petits peptides en mélanges complexes, permettant de déterminer la composition élémentaire en acides aminés et les séquences de peptides en mélanges complexes. Cet outil s'appuie sur (i) les informations obtenues par combinaison de techniques analytiques (CLHP, électrophorèse capillaire) couplées à la spectrométrie de masse et (ii) l'intégration de ces informations par un algorithme génético-évolucionnaire.

La masse de chaque peptide détecté (via la spectrométrie de masse) est utilisée par le logiciel pour établir la liste de toutes les combinaisons en acides aminés correspondant à cet intervalle de masses. D'autre part, des corrélations établies au préalable sont utilisées pour évaluer les indices d'hydrophobie et d'hydrophilie de chaque peptide via leur temps de rétention en CLHP. De la même manière, la charge est déterminée via la migration électrophorétique en électrophorèse.

A partir de ces trois informations, un tri dans la liste initiale de combinaisons possibles établie selon la masse seule est réalisé par l'algorithme. Cette méthodologie, validée avec des mélanges de peptides de synthèse permet une identification efficace de la composition en peptides allant jusqu'à 5 acides aminés voire plus.

Cette méthode, basée sur une « analyse multicomposé », s'avère intéressante puisque plusieurs dizaines de peptides présents en mélange sont analysés en un seul passage. Enfin, ce logiciel permet d'orienter le fractionnement et la purification afin d'augmenter la pureté d'un mélange en une propriété ciblée, dès lors que la relation entre propriétés physico-chimiques et bioactivité est déterminée.

L'apport de la Résonance magnétique nucléaire ou « RMN » dans l'étude de peptides en solution ou sous forme solide a été également présenté par Pedro Lameiras (Brucker BioSpin).

La RMN permet d'étudier la structure des molécules, leurs interactions ainsi que la composition de mélanges ou composites biologiques ou synthétiques. La taille des molécules intéressantes va de celle d'une petite molécule organique ou d'un métabolite microbien, à un peptide ou un produit « naturel » de taille moyenne, en passant par des protéines dont le poids moléculaire peut atteindre plusieurs dizaines de kDa.

La RMN vient compléter d'autres techniques analytiques telles que la radiographie, la cristallographie et la spectrométrie de masse. La RMN permet une analyse non-invasive et quantitative de molécules en solution ou à l'état solide ainsi que l'étude de fluides biologiques. La nouvelle gamme des produits RMN de Bruker comporte : Cryosonde Prodigy BBO/TCI, Console Avance™ III HD Cryosonde BBFO, Aimants Ascend™, SampleCase™, CMC-se, CMC-assist, Assure™ et RMN du solide DNP. Les nouvelles avancées technologiques de l'instrumentation Bruker en RMN favorisent l'étude de peptides de différentes tailles, de différentes concentrations, purs ou en mélange, en solution ou sous forme solide. Elles permettent également l'étude de la relation structure-activité des peptides ou des protéines en solution ou sous forme solide, la caractérisation structurale et la quantification de mélanges complexes en solution avec ou sans séparation chromatographique avant analyse via le couplage LC-(SPE)-RMN.

Concernant les aspects identification/caractérisation de peptides, deux posters ont été présentés, l'un concernant la caractérisation et quantification de peptides (poster Delatour) et l'autre, la caractérisation structurale de peptides ([poster Robert](#)).

2.3. Fractionnement et extraction de peptides/protéines

2.3.1. Fractionnement de peptides d'hydrolysats protéiques

Diverses technologies de séparation de peptides en mélanges complexes ont été présentées.

Leslie Boudesocque de l'équipe Infectiologie et Santé Publique de l'Université François-Rabelais de Tours, a proposé un outil novateur pour la capture de peptides d'intérêt au sein d'un hydrolysats de RuBisCO : la chromatographie de partage centrifuge en mode échange d'ions (CPC).

La CPC est une technique chromatographique qui présente l'avantage d'une très grande modularité. L'exploration de cette technique pour la purification de peptides apparaît alors comme un choix naturel. Cette méthode de chromatographie liquide/liquide est basée sur les différences de partage des solutés entre deux phases non miscibles d'un même système diphasique de solvants. Une phase liquide, appelée phase stationnaire, est maintenue dans la colonne par un champ de force centrifuge issu de la rotation de la colonne chromatographique. L'autre phase liquide, c'est-à-dire la phase mobile, est alors pompée au travers de la phase stationnaire. Les solutés se partagent entre les deux phases en fonction de leurs constantes de distribution respectives.

Cette étude présente une utilisation prometteuse de la chromatographie de partage centrifuge en mode échange d'ions mixtes (MIXCPC) pour l'enrichissement d'un hydrolysats de RuBisCO en un peptide antihypertenseur (VW). Une méthode analytique par RP-LC/MS-MS a été développée pour quantifier le peptide cible VW dans la matière de départ et dans les fractions enrichies. Les meilleurs résultats pour le fractionnement MIXCPC ont été obtenus par l'utilisation conjointe du système quaternaire de solvant diphasique, le méthyl-tert-butyléther/acétonitrile / n-butanol/water (2 :1:2:5, v / v) dans le mode descendant, de l'acide phosphorique lipophile di (2-éthylhexyle) (DEHPA) échangeur de cations avec un échangeur (DEHPA) / rapport peptides de 15, et de deux déplaceurs : le chlorure de calcium et l'acide chlorhydrique

A partir de 1 g d'hydrolysats contenant 0,26 % de VW en masse, 30,7 mg d'une fraction enrichie en VW (pureté de 10,9 % de VW en masse, correspondant à un facteur de purification de 41) présentant un rendement d'extraction de 97 %.

Laurent Bazinet du Centre de recherche en sciences et technologies du lait (STELA) de l'Institut des Nutraceutiques et des Aliments Fonctionnels (INAF) de l'Université Laval (Québec, Canada) a présenté un procédé de séparation couplant électrodialyse et membranes d'ultrafiltration (EDUF).

Cette nouvelle technologie permet une sélectivité selon la charge via le "champ électrique" et selon la taille des molécules via le "seuil de coupure des membranes de filtration". Ce procédé hybride associe une cellule d'électrodialyse (ED) conventionnelle à des membranes de filtration. Aucune pression n'est appliquée dans la cellule d'ED ; seules les molécules chargées migrent sous l'effet du champ électrique alors que les molécules neutres restent théoriquement dans la solution mère sans franchir la membrane de filtration.

L'EDUF a été utilisée avec succès en présence de différents hydrolysats de protéines, mais aussi pour l'enrichissement en polyphénols et la séparation d'oligosaccharides bioactifs. L'avantage de cette méthode innovante est de préserver la valeur commerciale des fractions non-bioactives de l'hydrolysats puisqu'aucun solvant n'est utilisé, d'avoir une haute sélectivité du procédé (taille/charge) et de réduire le risque de colmatage des membranes. Cette

technologie est adaptable à grande échelle, par empilement de membranes afin d'augmenter la surface d'échange, et peut s'intégrer facilement dans une ligne de production existante.

Jusqu'à présent, l'ultrafiltration était la meilleure méthode disponible pour l'enrichissement des peptides ayant un poids moléculaire spécifique, mais la sélectivité entre les peptides de poids moléculaires proches était faible. L'EDUF apparaît comme une technologie de séparation prometteuse, du fait de sa haute sélectivité.

La session de posters comportait sept travaux sur le fractionnement de peptides en mélanges complexes. Cinq traitaient de procédés membranaires innovants ([Gassara](#), [Kapel](#), [Bazinet 1](#), [Bazinet 2](#) et [Roblet](#)). Deux étaient dédiés à des procédés chromatographiques ([Canabady](#), [Roudj](#))

2.3.2. Extraction de matière protéique issues de coproduits

Matthieu Rigal (Laboratoire de Chimie Agro-industrielle, Université de Toulouse) a présenté un procédé d'extraction d'une fraction soluble de protéines à partir d'un coproduit du jambon (partenariat avec la société AOSTE, le Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle et le CATAR).

La présentation traite d'un procédé de fractionnement aqueux de co-produit de jambon issu de l'opération de désossage du jambon séché. Le procédé mis au point comporte quatre étapes principales d'extraction et de séparation :

- le broyage du co-produit.
- l'extraction liquide/solide par de l'eau. Les principaux facteurs étudiés à l'aide d'un plan d'expériences sont le temps de contact (30 à 90 mn), la température (40 à 90 °C) et le ratio eau/co-produit (4 à 10). Ainsi, 26 à 55 % de la matière sèche du co-produit concassé sont extraits ou entraînés par l'eau, essentiellement sous forme de lipides et de protéines.
- la filtration du milieu d'extraction à chaud permet de séparer un granulats, enrichi en matière minérale (39 à 56 %), et en protéines insolubles (11 à 55 %), et appauvri en lipides (9 à 31 %).
- la décantation du filtrat à froid permet de séparer tout ou partie des lipides sous forme de matière grasse solide. La phase aqueuse de décantation des matières grasses contient les protéines solubilisées.

Dans les meilleures conditions, 14 % des protéines sont extraites dans la phase aqueuse. L'étude des surfaces de réponse des rendements d'extraction en lipides et en protéines permet, par conséquent, de dégager plusieurs orientations pour optimiser, en pureté et proportion, la fraction de protéines solubles. Elle contient majoritairement des protéines (52 %), une fraction minérale (29 %) correspondant essentiellement au chlorure de sodium extrait (90 % de la matière minérale) et très peu de lipides (3 % correspondant à moins de 1 % des lipides du co-produit). Les propriétés de solubilité dans l'eau, épaississante et gélifiante, thermique et adhésive, ainsi qu'émulsifiante, font de cette fraction un produit avec de multiples applications à forte valeur ajoutée. En effet, cette fraction peut être utilisée comme source de peptones pour la culture de champignons et de levures, comme adhésif naturel ou agent d'enrobage et de texturation.

2.4. Séchage et conservation des peptides bioactifs

Les produits biologiques nécessitent bien souvent une opération de séchage. A l'échelle industrielle, la lyophilisation, l'atomisation et la fluidisation sont les techniques souvent utilisées pour le séchage des hydrolysats et des peptides bioactifs issus de l'hydrolyse. Le séchage des peptides et des protéines par atomisation et fluidisation a été présenté lors de l'exposé de Philippe Thonart de Université de Liège - Gembloux AgroBioTech.

Comme tout traitement thermique, le séchage peut entraîner des pertes de l'activité des peptides, des réactions de brunissement, une insolubilisation ou une oxydation des protéines. Lors du séchage, la diminution de l'activité des peptides est liée à l'effet de la température, étant donné leur thermo-sensibilité, et aux phénomènes physico-chimiques, dépendants de la modification de la teneur et de la structure de l'eau.

Les pertes d'activité peuvent être privilégiées par lyophilisation (travail à basse température) ou par atomisation (temps de séjour faible). Néanmoins, ces techniques sont les plus coûteuses en énergie. Pour limiter la consommation énergétique, une étape d'ultrafiltration peut être réalisée avant séchage.

L'atomisation d'une solution peptidique consiste à sa pulvérisation dans un courant de gaz chaud de manière à obtenir une poudre. L'atomisation se déroule en quatre grandes étapes : (1) la nébulisation ou dispersion en un spray homogène du liquide, (2) le contact du spray avec l'air chaud, (3) l'évaporation de l'eau des gouttelettes et (4) la séparation du produit déshydraté et de l'air. Cependant, cette technique, par suite du chauffage, de faire diminuer l'activité de certains peptides.

La lyophilisation est une déshydratation d'un produit liquide, pâteux ou solide, à l'aide de l'action combinée du froid et du vide. L'élimination de l'eau d'un hydrolysate congelé se fait progressivement principalement par sublimation. La lyophilisation d'un hydrolysate de protéine s'effectue en trois étapes. Dans la première étape (congélation), le produit doit être congelé afin que l'eau qu'il contient soit transformée en glace. Lors de la seconde étape, la pression ambiante diminue puis la glace se retire du produit par sublimation. Pour que la sublimation ait lieu, l'atmosphère environnante de l'échantillon doit conserver une pression de vapeur d'eau inférieure à la pression de vapeur saturante du produit congelé. Il est donc nécessaire de soumettre le produit congelé à une pression inférieure à celle correspondant au point triple de l'eau. Finalement, l'eau fortement liée à la matrice solide est enlevée par désorption.

La fluidisation s'applique aux produits solides sous forme de particules ou susceptibles de se désagréger par frottement. La fluidisation consiste à faire passer une phase fluide (très souvent un gaz) à travers un lit de particules, supportées par une grille, afin de les mettre en suspension. Le terme « fluidisation » vient du fait que la suspension gaz/solide est amenée dans un état semblable à celui des fluides.

La technique du séchage en lit fluidisé est la combinaison du séchage et de la fluidisation. Le but de la fluidisation est notamment d'augmenter la surface de contact gaz-solide afin de faciliter le séchage. Il existe trois grands types de lit fluidisé. Dans le lit fluidisé simple, l'air assure à la fois la fluidisation, l'apport de chaleur et l'évacuation des vapeurs désorbées.

Cependant comme expliqué par Philippe Thonart lors de sa présentation, quelle que soit la méthode utilisée pour sécher un peptide actif, la perte d'activité doit être limitée lors des procédures de séchage en maîtrisant l'effet de la température, l'effet de transfert d'eau et l'effet de l'oxydation.

3. Aspects réglementaires : innocuité, bio-marqueurs et modèles soutenant les allégations

3.1. La première liste allégations de santé génériques

L'établissement de la première liste des allégations de santé générique et ses conséquences ont été exposées par Julie Unzeitig de la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes.

La DGCCRF a pour rôle la régulation concurrentielle des marchés, la protection économique et la sécurité des consommateurs, dans le domaine des produits alimentaires et non-alimentaires. Cette administration a participé à la mise en œuvre de la première liste des allégations en participant à la négociation de la réglementation à Bruxelles, en tant que porte-parole pour la France. De ce fait, la DGCCRF est responsable de la mise en œuvre du texte au niveau national, et doit vérifier l'application de ce règlement communautaire en France.

Mai 2012 a été un tournant pour les allégations de santé génériques, en effet la première liste des allégations santé constituée a été publiée. En 2007/2008, les allégations santé ont été collectées sur le marché Européen : au total, 44 000 allégations ont été répertoriées puis réduites à 4600. Depuis 2008, AESA a évalué 2758 allégations santé (AS), dont 80 % ont été refusées. Les Etats Membres de l'UE ont voté le 5 décembre 2011 la première liste AS ; celle-ci a été puis publiée en mai 2012 (RE 432/2012) avec 2 ans de retard. Le 5 décembre 2011 a marqué la fin des périodes transitoires : à partir de cette date, toutes allégations qui n'étaient pas dans la liste positive, ont dû être retirées, ce qui constitue un bouleversement économique majeur. Plus de 2000 allégations sont encore en attente d'évaluation.

La première liste est constituée de 222 allégations santé autorisées. Votée par la commission le 16 mai 2012, elle fait l'objet du règlement 432/2012 publié le 25 mai 2012 au Journal Officiel de l'Union Européenne. Cette liste est applicable depuis le 14 décembre 2012.

Le registre <http://ec.europa.eu/nuhclaims/> de la CE a été actualisé et comporte les ANS (Allégations Nutrition Santé) autorisées et les AS (Allégations Santé) spécifiques et génériques refusées. Le site de la Commission européenne comporte aussi les AS spécifiques et génériques « en attente » et d'autres allégations non-autorisées.

Les allégations de santé génériques autorisées constituent une liste de 222 allégations. Cette liste contient essentiellement des AS concernant les vitamines et minéraux, des acides gras et des fibres, des protéines, des substances isolées (charbon actif, choline, la lactase, les ferments du yaourt, polyphénols d'huile d'olive, chewing gums, etc.), quelques allégations sur la substitution (édulcorants intenses vs sucres, AGS vs AGI, amidons résistants, pauvres en sodium), des substances spécifiques (lactulose, mélatonine, bétaine, monacolone K), des AS en lien avec les DDAP (substituts de repas, solutions de glucides et d'électrolytes), 1 AS viande/poisson, et une AS concernant les noix.

Voici quelques exemples d'allégations santé concernant les protéines : « les protéines contribuent à augmenter la masse musculaire », « Les protéines contribuent au maintien de la masse musculaire, « les protéines contribuent au maintien d'une ossature normale », etc.

A chaque allégation sont attribués un libellé, des conditions d'utilisation spécifiques, et des

conditions générales à respecter. La référence peut être rapportée à 100 g, 100 ml, 100 kcal (ex : DHA), par portion journalière (ex : créatine), par portion quantifiée (ex : pectine), avec parfois des mentions d'avertissement (ex : HPMC, glucomanane), des mentions supplémentaires à celles requises notamment à l'art.10 (ex : acide linoléique), sans condition d'utilisation spécifique (ex : stérols/stanols) mais avec des restrictions (ex : eau).

Les libellés sont flexibles cependant une stratégie consiste à utiliser le libellé autorisé pour éviter tout rejet de dossier d'AS. Aussi la modification du libellé doit se faire avec prudence. Il faut garder le même sens (interprétation stricte), rester strictement dans le champ défini (fonctionnement normal vs amélioration), mentionner de manière claire le nutriment ou la substance à l'origine de l'effet allégué, apporter preuve équivalence de sens (contrôles). Dans ce but, l'avis de l'AESA (ex: fonction cognitive) peut être utilisé dans certaines limites.

Les périodes transitoires ont été appliquées aux allégations de santé génériques. Les allégations autorisées ou refusées ont dès lors un délai de 6 mois pour se mettre en conformité jusqu'au 14 décembre 2012.

Pour les allégations « en attente » (cf. liste communautaire), la période transitoire continue à être appliquée à condition d'être conforme aux autres dispositions du texte et dispositions nationales applicables. Enfin, les allégations n'ayant jamais intégré la procédure ou ayant été retirées doivent disparaître du marché sans délai.

Les allégations évaluées et refusées sont dans le registre communautaire avec les raisons du rejet. La CE a également publié la liste des allégations « en attente » concernant les plantes, les probiotiques, les décisions restées en suspens pour diverses raisons (sécurité, détermination de conditions d'utilisation, etc.). Enfin, certaines allégations non-autorisées ont été écartées du registre (erreur de champ d'application, etc.).

Concernant les allégations en attente, un rendu des avis scientifiques a eu lieu entre juin et juillet 2012 pour les allégations en réévaluation. Le calendrier est encore incertain pour les allégations concernant les « plantes ».

Pour développer un actif à allégation santé, certains aspects réglementaires exposés par Pascal Vandekerckove lors du colloque, doivent être respectés. Les denrées alimentaires sont classées en différentes catégories : compléments alimentaires, les DDAP, les aliments enrichis, les aliments fonctionnels, les aliments nouveaux (novel food).

Les principes de la réglementation sont basés sur la sécurité et l'information du consommateur. Pour chaque aliment et ingrédient, les risques doivent être indiqués ainsi que leur origine (traçabilité, lots), la transformation subie (ajout d'auxiliaires technologiques, solvant), la présence de contaminants et d'additifs alimentaires (identification et pureté). Le consommateur doit être informé par étiquetage et publicité. Ceux-ci doivent être précis, et clairs (i.e. identité, composition) et vraie (métrologie, preuves d'efficacité, etc.). La réglementation régit les allégations nutrition santé et les nouveaux ingrédients alimentaires (mise sur le marché). Les allégations nutrition santé sont énoncées dans le règlement EC 1924/2006 pour les aliments. Les allégations indiquent qu'une denrée alimentaire possède un bénéfice nutritionnel particulier ou suggérant une relation entre cette denrée et la santé humaine. Les allégations nutrition santé sont recensées dans une liste positive établie par l'EFSA, agence chargée d'évaluer les allégations. L'information, l'efficacité et le mode d'action doivent être vérifiés. Les allégations nutrition santé sont soumises à un avis scientifique.

Quelques exemples d'allégations nutritionnelles sont citées ci-après : « faible teneur en » (matières grasses, sucres), « pauvre en » (sodium, sel), « sans » (matières grasses, sucres, sucres ajoutés, sel), « riche en » (fibres, protéines, vitamines, minéraux), « naturellement riche en », « source de » (fibres, protéines, vitamines, minéraux), « contient », « allégé en » (ou « réduit en »), « faible valeur énergétique », etc. Certaines allégations sont non-

autorisées ou non concernées. C'est le cas pour les allégations donnant à penser que s'abstenir de consommer la denrée alimentaire pourrait être préjudiciable à la santé, les allégations faisant référence au rythme et l'importance de la perte de poids, à des recommandations d'un médecin ou d'un professionnel de la santé déterminé ou d'une association autre qu'une association nationale de professionnels des secteurs médical, nutritionnel ou diététique. Il est également interdit de faire référence à un usage thérapeutique.

L'article 13 concerne les Allégations autres que celles faisant référence à la réduction du risque de maladie ainsi qu'au développement et à la santé infantile, l'article 13.1 et l'article 13.5 concernent respectivement les allégations génériques, et les allégations spécifiques.

L'article 14 concerne les allégations faisant référence à la réduction du risque de maladie ainsi qu'au développement et à la santé infantile. L'évaluation d'une allégation se fait selon trois critères. L'effet allégué doit être bien défini c'est à dire mesurable, avec un biomarqueur reconnu par la communauté scientifique. Les preuves d'efficacité doivent être validées par des essais in vitro, ex vivo ou in vivo, par des essais cliniques et le mode d'action étudié.

Pour obtenir une allégation santé, un dossier doit être établi, contenant une étude bibliographique, des tests précliniques sur des modèles éprouvés et adaptés. L'étude clinique (article 13.5 et 14) doit être randomisée, menée en double aveugle contre un placebo sur une cohorte de sujets sains (n'ayant pas de maladie déclarée). Le critère principal doit être défini en fonction de l'allégation recherchée, d'où l'importance des biomarqueurs. L'allégation doit être caractérisée avec des méthodes de dosage validées.

Le règlement EC 258/97 concerne les nouveaux aliments (novel food) et les nouveaux ingrédients alimentaires. Les nouveaux aliments correspondent aux « Produits alimentaires et ingrédients alimentaires qui n'ont pas été utilisés en consommation humaine dans des proportions significatives dans le territoire de la Communauté Européenne avant le 15 mai 1997 ». Ils désignent les aliments et ingrédients alimentaires présentant une structure moléculaire primaire nouvelle ou délibérément modifiée, les aliments et ingrédients alimentaires composés de micro-organismes, les aliments et ingrédients alimentaires composés de végétaux ou isolés à partir de ceux-ci et les ingrédients alimentaires isolés à partir d'animaux, les aliments et ingrédients alimentaires auxquels a été appliqué un procédé de production qui n'est pas couramment utilisé, lorsque ce procédé entraîne dans la composition ou dans la structure des aliments ou des ingrédients alimentaires des modifications significatives de leur valeur nutritive, de leur métabolisme ou de leur teneur en substances indésirables.

Les nouveaux aliments sont évalués. Ils ne doivent pas présenter pas d'effets adverses sur la santé humaine et animale, ni sur l'environnement, pas de tromperies pour le consommateur, pas de différences avec l'aliment qui est remplacé par l'OGM, de sorte qu'une consommation normale pourrait être désavantageuse pour le consommateur sur le plan nutritionnel.

Pour un dossier « novel food », la composition détaillée du produit et l'équivalence substantielle sont énoncés. L'analyse nutritionnelle doit être faite par analogie avec d'autres aliments. La présence de facteurs antinutritionnels et les carences doivent être spécifiées. Le cas échéant, une analyse toxicologique complète doit être réalisée sur la toxicité chronique, la mutagénicité (carcinogénicité, tératogénicité), la fertilité/reproduction.

3.2. Bio-marqueurs d'intérêt dans le cadre de l'évaluation des allégations santé

Dans le cadre de l'évaluation des allégations santé, des bio-marqueurs d'intérêt sont indispensables et ont été présentés par Adrien Scheffer et Camille Noury (Biofortis, entreprise Merieux Nutri-sciences). Un bio-marqueur est une caractéristique biologique mesurable, liée à un processus normal ou non. Dans cet exposé, les (bio)-marqueurs au sens large du terme (questionnaires, imagerie, etc.) et pas uniquement les bio-marqueurs quantifiables ont été pris en considération.

Dans le contexte des dossiers de demande d'allégations de santé de l'EFSA (Autorité Européenne de Sécurité des Aliments), il est indispensable de s'intéresser aux bio-marqueurs. L'obtention d'une autorisation pour une allégation de santé nécessite de démontrer l'effet revendiqué chez l'homme sain en réalisant des études cliniques dans lesquelles des variations significatives de (bio)-marqueurs doivent être démontrées.

Les recherches proposées par l'EFSA concernent cinq axes : (1) l'intestin et l'immunité, (2) la satiété, le contrôle du poids, et la glycémie, (3) la santé osseuse, articulaire et orale, (4) les fonctions neurologiques et psychologiques, et (5) les antioxydants, les dommages oxydatifs et la santé cardiovasculaire. Les sources utilisées sont les suivantes : les documents d'orientation de l'EFSA, les publications PASSCLAIM (Process for the Assessment of Scientific Support for Claims and Foods) de l'ILSI (International Life Sciences Institute), les nombreux avis EFSA publiés, ainsi que les publications scientifiques.

La méthodologie est la suivante. La base de travail est constituée de publications de l'EFSA et de l'ILSI. Ces publications rassemblent des données sur les effets physiologiques bénéfiques, les mesures, les méthodes et la population d'étude. L'analyse des avis de l'EFSA publiés donne des précisions sur les méthodes adéquates et les populations d'études. La recherche bibliographique permet d'aller plus loin dans les méthodes de mesures.

Lors d'une évaluation par l'EFSA, l'ingrédient est caractérisé, l'effet bénéfique pour la santé doit être démontré et la relation de cause à effet établie.

Pour l'acceptation d'un dossier de demande d'une allégation santé, le constituant bioactif doit être caractérisé, l'effet bénéfique pour la santé doit être établi, la méthode et le marqueur appropriés doivent être choisis, et mis en place pour un échantillon adéquat et pour une durée suffisante. Enfin, l'effet clinique doit être démontré et prouvé de manière statistique. Le choix de bio-marqueurs pertinents reste un point crucial d'où l'importance de projet de recherche et de validation

Naturalpha est une société lilloise créée en 2001, dont l'objectif est de démontrer la preuve de l'effet santé d'un ingrédient alimentaire. Christophe Ripoll, expert chez Naturalpha, a présenté les nouveaux ingrédients alimentaires, de l'idée à l'obtention de l'allégation santé. Cette société a des activités de conseil, mène des recherches précliniques (in vivo et in vitro) et cliniques. Les innovations sur le marché des hydrolysats de protéines et de peptides actifs sont importantes et le nombre de publications sur l'effet santé d'hydrolysats de protéines et de peptides actifs augmente régulièrement depuis 2005. Un ingrédient santé se développe selon certaines étapes clefs.

Les points clefs à prendre en compte dans la stratégie de développement d'un nouvel ingrédient santé sont l'environnement technologique (choix des méthodes d'hydrolyse, des techniques de filtration et de purification), l'environnement scientifique (recherche et analyse des informations publiées, les données précliniques et cliniques d'intervention), l'environnement réglementaire (caractérisation des positionnements réglementaires possibles, clarification du cadre réglementaire avec la base de données EUR-Lex, base de données Novel food et l'historique des allégations déposées (avis des autorités compétentes), allégations déposées dans le cadre de l'article 13), l'environnement concernant la propriété intellectuelle (synthèse des brevets déposés) et l'environnement

concurrentiel (synthèse des produits concurrents et des projets similaires).

La mise sur le marché des aliments/ingrédients alimentaires ne doit pas présenter de danger pour le consommateur, l'induire en erreur, différer des aliments et ingrédients alimentaires qu'ils sont destinés à remplacer à un point tel que leur consommation normale impliquerait des inconvénients nutritionnels pour le consommateur.

La réglementation novel food est apparue avec la circulaire européenne CE 258/97. Avant le 27/01/1997, les disparités des législations nationales entravaient la libre circulation des denrées alimentaires, et empêchaient la concurrence déloyale. De même, l'émergence de risques pour l'environnement et pour la santé (OGM) a dû être considérée. Les objectifs de cette circulaire étaient d'harmoniser les pratiques, de garantir le fonctionnement du marché intérieur de l'UE et de protéger la santé publique et le consommateur (information claire - mentions d'étiquetage spécifiques).

Un nouvel ingrédient se définit comme un aliment ou un ingrédient alimentaire pour lequel la consommation humaine est restée négligeable dans la CE avant le 15 mai 1997 et relevant de l'une des catégories spécifiques de nouveaux aliments. Par définition, tous les produits issus de l'alimentation traditionnelle en provenance de pays tiers constituent un nouvel aliment/ingrédient alimentaire.

Les catégories de nouvel ingrédient alimentaire ou aliment concernent les aliments ou ingrédients alimentaires : (1) contenant des OGM* ou produits à partir d'OGM mais n'en contenant pas* (selon le règlement 1829/2003), (2) présentant une structure moléculaire primaire nouvelle ou délibérément modifiée, (3) composés de micro-organismes, de champignons ou d'algues ou isolés à partir de ceux-ci, (4) composés de végétaux ou isolés à partir de ceux-ci, ou d'ingrédients alimentaires isolés à partir d'animaux (sauf ceux obtenus par des techniques traditionnelles de multiplication/reproduction et ayant un historique de consommation alimentaire sûr), (5) auxquels a été appliqué un procédé de production qui n'est pas couramment utilisé, lorsque ce procédé entraîne dans la composition ou dans la structure des aliments/ingrédients alimentaires des modifications significatives de leur valeur nutritive, de leur métabolisme ou de leur teneur en substances indésirables.

Ne peut être déclaré Novel Food, tout aliment/ingrédient alimentaire dont la consommation humaine dans la Communauté n'était pas négligeable avant le 15 mai 1997 ou toutes nouvelles formulations dont les ingrédients ne relèvent d'aucune catégorie de Novel Food.

Si l'aliment n'est pas un aliment santé, la mise sur le marché est possible dans la CE, sous réserve qu'il respecte toutes les autres dispositions légales applicables à la fois au niveau de la communauté et des EM. Par ailleurs, il est nécessaire de prouver que la consommation humaine de cet aliment n'était pas négligeable dans la CE avant le 15 mai 1997.

Si l'aliment/ingrédient alimentaire entre dans la définition du Food, deux procédures communautaires sont envisageables. La procédure complète est une procédure d'autorisation via une évaluation décentralisée. La procédure simplifiée est une notification sur le principe d'équivalence substantielle à un ingrédient alimentaire existant.

Le dossier permettant d'obtenir le label novel food doit contenir la spécification de l'aliment/ingrédient, les procédés de production et analyse, l'historique de l'organisme utilisé comme source (origine), l'estimation de la consommation/niveau d'utilisation attendu, l'information sur des données d'exposition chez l'homme, de l'ingrédient ou de sa source, la valeur nutritionnelle, l'information microbiologique et l'information toxicologique.

Plusieurs classes de novel food existent. La classe 1 concerne les produits chimiques purs ou mélanges simples issus de sources non OGM. La classe 2 caractérise les produits complexes issus de sources non OGM, la classe 3 à 5 concerne la réglementation OGM ; enfin les aliments produits par un procédé nouveau sont regroupés dans la classe 6.

La procédure simplifiée est applicable uniquement pour un aliment/ingrédient substantiellement équivalent à un produit déjà commercialisé en Europe (même composition, valeur nutritive, métabolisme, utilisation, teneur en substances indésirables). Elle est applicable uniquement pour les catégories de composés de micro-organismes, de champignons ou d'algues ou isolés à partir de ceux-ci, de composés de végétaux ou isolés à partir de ceux-ci, ou d'ingrédients alimentaires isolés à partir d'animaux (sauf ceux obtenus par des techniques traditionnelles de multiplication/reproduction et ayant un historique de consommation alimentaire sûre). Les données justifiant l'équivalence substantielle sont obtenues à partir de base des données scientifiques disponibles et « généralement reconnues ». Un avis est rendu par un organisme compétent en matière d'évaluation des denrées alimentaires.

Reconnu légalement, le statut novel food confère certains avantages. Il est possible d'effectuer une procédure simplifiée pour obtenir ce statut qui est accepté dans l'UE par tous les états membres (reconnaissance mutuelle). Le novel food bénéficie d'une exclusivité : son autorisation de mise sur le marché est valable uniquement pour le demandeur à l'origine de la première demande de commercialisation du produit dans UE. La décision d'autorisation donne par ailleurs un passeport pour faire accepter d'autres produits.

Néanmoins, le statut d'aliment nouveau présente aussi des inconvénients tels que les critères d'évaluation de l'innocuité uniformes à tous les types d'aliments (y compris aliments traditionnels en provenance de pays tiers), des procédures très longues et lourdes, la complexité et la multiplicité des démarches ; ce statut nécessite une procédure distincte du dossier allégation santé.

Pour soutenir une allégation santé, des études pré-cliniques et cliniques doivent être réalisées (Présentation de Claire Gaudichon). Certains critères de jugement sont nécessaires en fonction du niveau de l'allégation demandée. En cas d'un renforcement d'une fonction ou d'un bénéfice sur la santé, un marqueur est nécessaire. Pour une allégation spécifiant la réduction d'un risque, un marqueur spécifique à l'événement indésirable ou à la pathologie est nécessaire.

Les études pré-cliniques permettent de vérifier préalablement à une étude chez l'homme l'existence d'un effet du principe actif dans des conditions contrôlées. Elles permettent aussi de sélectionner les molécules, nutriments ou aliments qui provoquent la meilleure réponse, et de raisonner les conditions expérimentales optimales. Elles sont réalisées sur des modèles in vitro ou in vivo.

Certaines lignes directrices générales sont émises par EFSA. L'étude doit être réalisée avec l'aliment ou le principe actif pour lequel l'allégation est demandée. Les quantités efficaces doivent être cohérentes avec la consommation réelle. La qualité des études (planification et méthodologie) et la hiérarchie des preuves (étude d'intervention, étude d'observation, étude croisée, étude parallèle, étude double aveugle, étude ouverte, témoins appropriés) sont recommandées. La population cible doit être cohérente avec la population utilisée dans les études, enfin les paramètres mesurés doivent être pertinents.

Certaines recommandations sont spécifiques, notamment en ce qui concerne l'homéostasie du glucose, le contrôle du poids, la prise alimentaire, et la satiété, (3) la protection contre les dommages oxydatifs, (4) la santé cardiovasculaire, (5) la santé osseuse/dermique et buccale, (6) la neurologie et psychologie, (7) les performances physiques, (8) l'intestin et le système immunitaire.

Des règles de bonne pratique sont à respecter pour les études cliniques et pré-cliniques et leur planification doit répondre à la question posée en tenant compte de la faisabilité. Enfin, l'obtention d'allégation dépend de la qualité des études, de la clarté des effets allégués et de l'existence de mécanismes d'actions, hypothétiques voire démontrés.

3.3. Réglementation des produits chimiques dans l'Union Européenne

La réglementation REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals), présentée par Jean-Luc Garrigue de la société BIOAGRI, concerne l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques ; ses restrictions d'usage sont édictées en annexe XIV. La liste des substances candidates à la réglementation REACH est répertoriée sur internet (<http://echa.europa.eu/web/guest/candidate-list-table>). Cette réglementation alimente la liste des substances indésirables et encourage l'évaluation des dangers liés aux substances chimiques par des méthodes alternatives afin de réduire les essais sur les animaux. Les législations concernant les produits chimiques dans l'Union Européenne sont très complexes et font l'objet de nombreuses directives.

Dans un dossier de réglementions, les études de toxicité doivent être menées à la fois selon des protocoles spécifiques et la recommandation de tests OCDE pour les produits chimiques (i.e. méthode validée, système test approprié, sélection de la dose). Ces études de toxicité doivent être menées en accord avec les bonnes pratiques de laboratoire, dans des laboratoires accrédités, et validées par des tests in vitro ou in vivo, chez l'animal, voire in silico ; l'importance de ces tests varie selon le secteur industriel.

Certaines substances sont exemptées d'enregistrement REACH tels que les médicaments pour l'homme ou l'animal, les denrées alimentaires (Règlement EC No 178/2002) tels que les additifs alimentaires pour l'homme, ou pour les animaux, les aliments pour animaux ou les agents parfumants.

La réglementation REACH est entrée en vigueur le 1er Juin 2007. Pour chaque substance chimique concernée par cette réglementation, les fabricants et importateurs de l'UE (>1 tonne/an) doivent collecter ensemble les informations relatives à ses propriétés et s'assurer de son innocuité sur la santé humaine et l'environnement. Cette preuve doit être fournie par le fabricant et l'importateur et non par l'autorité réglementaire. Les informations standards requises sur les propriétés de la substance dépendent du tonnage annuel (>1, 100 ou 1000 t/an). Les demandes d'analyses sont à soumettre à l'ECHA pour les études "longues" (100 et 1000 t/an) mais des méthodes alternatives sont parfois proposées. Un régime transitoire est accordé pour les substances en cours d'acceptation ; leur enregistrement s'effectue en trois phases.

L'enregistrement d'une substance à la liste REACH requiert des tests physico-chimiques, de toxicité et d'écotoxicité.

Selon la réglementation REACH, une substance se définit comme un élément chimique et ses composés, à l'état naturel ou obtenus par un procédé de fabrication. Cela inclue tout additif nécessaire pour en préserver la stabilité et toute impureté (>1%*) résultant du procédé mis en œuvre, mais exclue tout solvant qui peut être séparé sans affecter la stabilité de la substance ou modifier sa composition. Une substance peut être mono-constituant, multi-constituant, une préparation ou une substance inconnue de composition variable. Cela concerne les produits de réaction complexes ou les matériaux biologiques. Ces substances ne peuvent pas être identifiées de façon satisfaisante par leur composition chimique. En effet, le nombre de leurs constituants est relativement élevé, leur composition est en partie inconnue, et/ou variable et difficilement prédictible.

3.4. Réglementation des cosmétiques dans l'Union Européenne

La réglementation des cosmétiques dans l'UE a également été présentée par Jean-Luc Garrigue, de la société BIOAGRI. Au sein de l'UE, les cosmétiques font l'objet d'une réglementation spécifique et sont définis par l'usage auquel ils sont destinés. L'article L5131-1 du code de la santé publique définit un cosmétique comme « une substance ou une préparation destinée à être mise en contact avec les diverses parties superficielles du corps humain, notamment l'épiderme, les systèmes pileux et capillaire, les ongles, les lèvres et les organes génitaux externes, ou avec les dents et les muqueuses buccales, en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles ».

La réglementation Américaine (Federal Food, Drug and Cosmetics Act, USA) s'avère plus spécifique et précise qu'un cosmétique ne doit pas affecter la structure ni la fonction corporelle.

Les listes négatives répertorient les substances interdites dans les produits cosmétiques (Annexe II de la réglementation des cosmétiques), et celles que les cosmétiques ne peuvent contenir que sous certaines conditions (Annexe III). Les listes positives répertorient les colorants, les conservateurs, et les écrans solaires autorisés (Annexe IV, V et VI, respectivement).

Les cosmétiques ne sont pas soumis à un accord préalable avant la mise sur le marché, à l'accord d'un ingrédient ou même à l'évaluation du risque et du bénéfice. Néanmoins en Europe, le fabricant industriel ou la personne plaçant le produit sur le marché est responsable et doit être capable de démontrer l'innocuité du produit pour le consommateur dans les conditions normales d'utilisation. L'innocuité est évaluée sur la sécurité des ingrédients individuels : leur profil de toxicité, leur structure chimique et le niveau d'exposition anticipé. Le législateur doit disposer d'un dossier technique contenant la formulation du produit fini, la description de l'industriel et les conditions de contrôle, et l'évaluation de l'innocuité sur la santé humaine. Le produit fini, contrôlé par l'industriel, est décrit dans une spécification.

La directive concernant les cosmétiques dans l'UE est à son 7ième amendement ; depuis 2004 et 2009, respectivement, les produits finis et les ingrédients ne peuvent plus être testés chez l'animal, à l'exception des tests de toxicité, de repro-toxicité et de toxico-cinétique. A partir du 11 mars 2013, les tests des ingrédients et les produits finis seront interdits chez l'animal, dès la validation de méthodes alternatives équivalentes.

La nouvelle réglementation 1223/2009 du 30 novembre 2009 sur les produits cosmétiques remplacera la directive 76/768 du 27 juillet 1976 ; elle sera applicable à partir du 11 juillet 2013. Les interdictions et les régimes restrictifs concernant l'expérimentation animale ne seront pas modifiés.

Cette nouvelle clause sur les produits cosmétiques inclue : l'interdiction de dévoyer des réclamations publicitaires, l'étiquetage des cosmétiques, le suivi de la sécurité des produits cosmétiques contenant des nanomatériaux (applicable à partir du 1er janvier 2013), l'indication de la présence de nanomatériaux dans la liste des ingrédients, l'interdiction de substances cancérogènes/mutagènes/reprotoxiques depuis le 1er décembre 2010, excepté dans des circonstances exceptionnelles et sous certaines conditions.

En conclusion, les essais toxicologiques pré-cliniques constituent un élément essentiel des dossiers réglementaires concernant les ingrédients chimiques, quel que soit la réglementation en vigueur. Les demandes ou exigences scientifiques strictes doivent être remplies impérativement. L'extrapolation de données de toxicité à l'homme nécessite l'utilisation de marges de sécurité bien que l'incertitude ne puisse être totalement éliminée. En effet, des études de toxicité inappropriées peuvent affecter directement la recherche et le développement de nouvelles molécules en industrie.

3.5. Autres réglementations

D'autres réglementations existent et régissent la commercialisation de produits alimentaires ou cosmétiques, dont la réglementation sur l'expérimentation animale (Directive 2010/63/UE). Par ailleurs, la directive 2009/32/UE concerne les solvants d'extraction utilisés dans la fabrication des ingrédients alimentaires et de leurs ingrédients. La directive 89/107/CEE concerne les additifs alimentaires. Le règlement EC 1829/2003 concerne les denrées alimentaires et les aliments pour animaux génétiquement modifiés. Les auxiliaires technologiques sont également régis par une réglementation.

3.6. Réglementation des auxiliaires technologiques dans l'Union Européenne

La notion d'auxiliaires technologiques, introduite par Elisabeth Goidin de la société Roquette, est une particularité française en Europe.

Par définition, un « auxiliaire technologique » est une substance non consommée comme ingrédient alimentaire, volontairement utilisée dans la transformation de matières premières, de denrées alimentaires ou de leurs ingrédients pour répondre à un objectif technologique déterminé. Son utilisation peut induire la présence non intentionnelle de résidus - inévitable - dans le produit fini. Le décret limite l'application de la procédure d'autorisation préalable après évaluation du risque de certains auxiliaires technologiques.

Les auxiliaires technologiques sont par exemple les anti-mousses, les catalyseurs, les agents de clarification/adjuvants de filtration, les agents décolorants, les agents de lavage et de pelage/épluchage, les agents de plumaison et d'épilation, les résines échangeuses d'ions, les agents de congélation par contact et agents de refroidissement, les agents de dessiccation/antiagglomérants, les enzymes, les agents d'acidification, d'alcalinisation ou de neutralisation, les agents de démoulage, les flocculants et coagulants, les agents de décontamination de produits d'origine végétale, les antitartres, les solvants d'extraction, etc.

Les auxiliaires technologiques n'ont pas de cadre réglementaire en Europe pour les denrées destinées à l'alimentation humaine. Par contre, la France dispose d'un ensemble de dispositions concernant l'autorisation d'auxiliaires technologiques.

L'arrêté du 19 octobre 2006 est relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans certaines denrées alimentaires (version renforcée le 22 juin 2011). Le décret n°2011-509 du 10 mai 2011 fixe les conditions d'autorisation et d'utilisation des auxiliaires technologiques présents dans les denrées destinées à l'alimentation humaine. L'arrêté en date du 7 mars 2011 est relatif à la constitution des dossiers de demande d'autorisation d'emploi des auxiliaires technologiques.

Certaines catégories d'auxiliaires technologiques sont soumises à autorisation préalable en application de l'article 2, notamment les anti-mousses, les enzymes, les agents de décontamination des produits d'origine végétale, les solvants d'extraction, les huiles minérales de basse densité, les substances chimiquement réactives, oxydantes ; les substances cancérigènes, mutagènes, ou toxiques ne sont pas autorisées en vertu du règlement (CE) n° 1272/2008 du 16 décembre 2008 comme auxiliaires technologiques. La réglementation concernant les enzymes alimentaires est particulière et nécessite son harmonisation au niveau Européen avec création à terme d'une liste européenne d'enzymes

autorisées à l'exclusion de toutes autres.

Seules les enzymes ajoutées à l'aliment pour une raison technologique (fabrication, préparation, traitement, emballage, transport, stockage) peuvent être utilisées en tant qu'auxiliaire technologique.

Les principaux textes relatifs aux auxiliaires technologiques sont le règlement CE 1332/2008 (enzymes), le règlement CE 1333/2008 (additifs), et le règlement CE 1331/2008 (arômes). Enfin le règlement CE 234/2011 CAP concerne la procédure commune d'autorisation ; paru en 2011, il est toujours en cours de discussion.

Pour obtenir la commercialisation d'un produit alimentaire, il faut déterminer si les produits utilisés sont des additifs ou des auxiliaires technologiques, si par ailleurs ils sont déjà permis (QSP, additifs, domaine particulier) et dans le cas où un dossier doit être constitué, quelles ont les informations nécessaires.

4. Succès et verrous industriels, perspectives de développement

La production de peptides bioactifs par des procédés d'hydrolyse en vue applications industrielles nécessite le respect d'un cadre réglementaire défini précédemment. Cependant malgré les succès potentiels, de nombreux verrous notamment scientifiques, technologiques, financiers et réglementaires sont à lever avant d'atteindre l'étape finale de commercialisation d'un hydrolysate, de produits fonctionnels ou de nutraceutiques contenant un peptide bioactif.

4.1. Les succès et verrous industriels

La table ronde intitulée « Succès et verrous industriels » a été animée par Alix Roger de la société ARD (structure de recherche privée et mutualisée ; plateforme d'innovation ouverte contractualisée par le ministère de l'industrie en décembre 2009, localisée à Reims). Elle réunissait quatre intervenants : Alain Baniel de la société Ingrédia (Arras, France), Bruno Gehin (société Roquette, Lestrem), David Guerrand (société DSM, Delft, Pays-Bas), et Luce Sergent (Copalis, Boulogne-sur-Mer). Les différentes entreprises ont été présentées brièvement par chacun des intervenants.

Ingrédia est une coopérative laitière basée dans la région Lilloise et dont les activités sont principalement centrées sur la valorisation par craquage de la matière première, la valorisation de protéines pour leurs fonctionnalités ou leurs bioactivités. L'un des produits commercialisés par Ingrédia, Actinium®, est une protéine hydrolysée. Lancé début de l'année 2000, cet ingrédient à visée santé pour la gestion du stress par l'alimentation remporte un franc succès sur le plan commercial. Ce nutraceutique est un complément alimentaire ce qui démontre la possibilité à l'heure actuelle de valoriser ce type d'actif.

La société Roquette possède une longue expérience en hydrolyse enzymatique et procédés fermentaires. Elle valorise des matières premières végétales telles que le blé, le maïs, le pois, la pomme de terre, et les micro-algues ; 7 millions de tonnes sont valorisées chaque année, à travers plus de 700 produits différents et le budget consacré à la R&D s'élève à 3% du chiffre d'affaires. Un gisement important de matières premières est à valoriser dans l'alimentation humaine et animale avec 500000 tonnes de fractions riches en protéines végétales. Une vingtaine de brevets a été déposée sur les protéines et leurs applications comme par exemple, Nutralys®.

DSM est une société Néerlandaise ; cette entreprise agroalimentaire travaille sur les milieux de culture, les bactéries lactiques et produit notamment des hydrolysats de peptides ; elle possède une forte expérience d'hydrolysats de protéines, utilisés pour la récupération des sportifs (i.e. Peptopro®) ou encore pour d'autres applications santé.

Enfin Copalis est une coopérative localisée à Boulogne-sur-Mer ; Cette société valorise les coproduits de poisson pour des applications en nutrition animale, en nutraceutique ou comme arômes. Afin de s'assurer de la fraîcheur de la matière première, les prélèvements sont réalisés à 5 km maximum de l'usine. Ces coproduits (i.e. hydrolysate protéique, cartilage, minéraux) sont récupérés et valorisés comme compléments alimentaires pour l'alimentation humaine et animale sans pour autant épuiser les réserves naturelles.

L'alimentation humaine, contrairement à l'alimentation animale, représente de faibles volumes à très fortes valeurs ajoutées.

Plusieurs verrous industriels ont été identifiés concernant la commercialisation d'un hydrolysate, de produits fonctionnels ou de nutraceutiques contenant un ou plusieurs peptides bioactifs.

L'un des verrous majeur est l'aspect réglementaire et plus précisément le coût lié à la constitution d'un dossier allégation ou d'un dossier REACH. Celui-ci est très variable selon le dossier établi ; en fonction de différents paramètres, il peut atteindre plusieurs milliers d'euros, or, ces dépenses sont financées sur fond propre. Par ailleurs, certaines indications cliniques sont plus abordables sur le plan financier que d'autres et il existe des programmes incitatifs pour développer ce type de procédure.

A l'heure actuelle, les dossiers REACH sont traités en plusieurs phases selon le tonnage de produits commercialisés. Les dossiers traités en 2010 concernaient des groupes industriels ; relativement complets avec peu d'études nouvelles, ces dossiers nécessitaient quelques tests complémentaires. De manière générale, le coût de revient d'un tel dossier oscillait entre 50000 et 100000 euros. Les dossiers établis pour 2013 concernent davantage de Petites et Moyennes Entreprises (PME) ayant moins de moyens, et dont les dossiers sont plus vides. Dans ce cas d'étude, le nombre de tests requis pour la validation d'un dossier réglementaire engendre des frais de l'ordre de 100000 à 2 millions d'euros à partager entre le nombre de registrant. En 2018, moins de tests seront nécessaires mais cependant les dossiers seront moins complets. Des PME voire des Très Petites Entreprises (TPE) seront concernées avec des coûts avoisinant les 100000 euros, à diviser par le nombre de registrant.

Par ailleurs, l'exclusivité d'une allégation accordée au premier demandeur constitue un verrou pour les entreprises lors d'une demande ultérieure. Lorsqu'un second demandeur sollicite une allégation, le protectionnaire est protégé pendant cinq ans et l'étude clinique centrale lui appartient. Si un concurrent souhaite obtenir cette même allégation, ce dernier doit réaliser sa propre étude clinique bien que la seconde allégation soit beaucoup moins coûteuse et plus simple à obtenir. De ce fait, il faut inciter les développeurs à protéger leur formation, en plus de l'étude clinique qui développe de la connaissance utile à la concurrence. D'où l'intérêt du nouvel ingrédient.

Le délai d'obtention d'un label nouvel ingrédient (Novel Food, NF) peut s'avérer très long, ce qui constitue un frein industriel. De plus, la moitié des dossiers relatifs à une demande NF sont rejetés bien qu'il y ait encore de nombreux dossiers à évaluer au cas par cas. Le catalogue NF disponible en ligne répertorie l'ensemble de ces nouveaux ingrédients.

Durant le processus d'obtention du label NF, aucune autorisation provisoire ne peut être délivrée par principe de précaution contrairement à d'autres zones géographiques comme par exemple en Amérique du Nord. Néanmoins, ce nouvel ingrédient peut quand même être administré à l'homme dans le cadre d'essais cliniques. Aux USA, une autorisation provisoire (Gras Status) peut être délivrée.

De manière générale, il faut une réflexion plus large au niveau de l'innovation. La réglementation doit apparaître très tôt lors d'un projet pour éviter de réaliser à mi-parcours que le produit ne peut être vendu du fait du cadre réglementaire.

En résumé, la réglementation peut s'avérer à la fois être un frein et un levier pour développer de nouveaux hydrolysats de protéines. Si c'est un frein pour les industriels, cela favorise néanmoins une réflexion plus logique et plus efficace lors du développement d'ingrédients. Cette dimension réglementaire pousse à considérer tous les aspects dès le démarrage du projet permettant ainsi de mieux planifier la recherche. A terme, la rationalisation de cette activité d'innovation est plus intéressante en terme économique. Le développement d'un produit tel que le Lactium® se ferait aujourd'hui de manière plus efficace et à moindre coût.

Lors de la constitution d'un dossier NF, l'estimation de la consommation d'un produit est un point crucial à ne pas négliger. Certaines matrices alimentaires sont autorisées contrairement à d'autres. L'extrait peut être autorisé dans un type d'application spécifique uniquement et interdit par ailleurs par l'évaluateur, en lien avec un risque de surconsommation voire de surexposition.

Selon le produit à commercialiser, il est parfois possible d'engager une procédure simplifiée. C'est le cas notamment lors du simple changement de matrice alimentaire et non de l'ingrédient actif par lui-même. Une nouvelle évaluation doit alors être réalisée en fonction de cette nouvelle matrice, et la consommation autorisée doit être extrapolée en fonction de données toxicologiques.

Dans la réglementation NF, l'acceptation d'un dossier repose principalement sur les informations transmises concernant le type d'ingrédient et la consommation estimée.

Etant donné les coûts liés au développement d'un produit et à l'aspect réglementaire, cela impacte directement sur le choix des projets et pousse les industriels à protéger leurs produits par des brevets. Sur un ensemble de projets industriels, seuls les plus intéressants seront sélectionnés faute de moyens et de rentabilité.

Par certains aspects, la communication constitue également un verrou. Par exemple, un industriel ne peut communiquer sur l'aspect antihypertenseur d'un produit qui contiendrait le peptide anti-hypertensif Val-Tyr (VW) car pour clamer une allégation, celle-ci doit être au préalable validée. En effet, l'enrichissement en Val-Tyr par chromatographie puis membrane séparative a déjà été testé en clinique et l'effet anti hypertensif d'un extrait enrichi en Val-Tyr n'a pas été démontré.

Si à l'issue de ce colloque, les peptides bioactifs et hydrolysats peuvent être sans conteste valorisés comme ingrédients fonctionnels et nutraceutiques, la question de la valorisation de ressources naturelles se pose néanmoins lorsque seule une fraction infime de coproduits est valorisée (de l'ordre 0.1%). Malgré l'extraction de composés bioactifs, la valorisation de coproduits reste toujours un problème auquel s'ajoute la gestion d'effluents liés à cette extraction supplémentaire. Pour autant, l'enrichissement en peptide bioactif est une solution nutrition/santé, et celle-ci peut être considérée comme une alternative au traitement des problèmes de santé publique d'autant que la biodisponibilité est favorisée pour les mélanges de peptides en comparaison à des peptides isolés.

Il est difficile de définir ces peptides bioactifs et ces hydrolysats en terme de santé et d'autant plus par rapport à un produit alimentaire classique, ce qui freine leur développement lors de la mise sur le marché. Si l'équilibre d'un produit alimentaire peut être amélioré par la présence de peptides bioactifs, celui-ci doit néanmoins rester un aliment. Les problèmes de santé liés à l'alimentation ne vont pas être résolus par des produits "miracles" (ex. les phytostérols) d'autant qu'en nutrition, la notion d'équilibre alimentaire est primordiale et dépend d'une molécule d'intérêt. Les composés bioactifs ayant un effet bénéfique pour la santé représentent une part minoritaire des produits alimentaires. L'utilisation d'un hydrolysats de protéines extensif constitue une niche alimentaire.

Pour un dossier allégation, l'étude clinique est établie sur une population saine : cette réglementation a été mise en place pour distinguer un aliment d'un médicament. Afin d'obtenir une allégation santé, le principe actif et la relation de cause à effet doivent être identifiés et le mécanisme d'action décrit.

Comme soulevé par Yves Leroux, chercheur à l'URAFPA (Université de Lorraine, Nancy), un des freins majeurs à l'utilisation d'hydrolysats est lié à la difficulté d'obtenir une allégation santé, en dépit d'un nombre élevé de publications scientifiques démontrant leurs bioactivités. Selon Claire Gaudichon, chercheuse à AgroParisTech, cette difficulté à obtenir une allégation santé est directement liée au choix d'un marqueur approprié pour les protéines et les peptides du fait de la régulation homéostatique. Dans le métabolisme général, il est difficile de mettre en évidence un effet positif de ce type de biomolécules du fait de l'homéostasie. Comme souligné par David Guerrand de DSM, il existe un fossé entre les nombreuses publications sur les hydrolysats peptidiques et les réelles applications industriels. Dans ce contexte, se pose la question de la valorisation économique des hydrolysats.

Souvent, malgré la publication de résultats scientifiques dans des journaux de renommée internationale, les critères de l'EFSA ne sont pas validés. Lors de la constitution d'un dossier, l'EFSA a des attentes spécifiques telles que la cible, le bio-marqueur et la population étudiée en vue d'apporter une preuve de concept. L'étude clinique doit apporter la preuve de l'efficacité de la molécule d'intérêt en absence de bio-marqueur précisément identifié.

Comme souligné par André Marrette (chercheur à l'Université de Laval, Québec), certains petits peptides peuvent diminuer l'efficacité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) mais peu mais vont réellement diminuer l'hypertension in vivo d'où l'importance de choisir un modèle approprié. L'avantage d'un hydrolysats par rapport à un peptide isolé est l'effet synergique et il y a dès lors plus de chance de démontrer l'effet sur l'homme et sur l'animal.

4.2. Perspectives de développement

Lors de cette seconde table ronde, animée par Alix Roger (ARD) et Charles Delannoy (Procidys), cinq industriels étaient présents pour débattre des perspectives de développement des hydrolysats et peptides bioactifs issus des procédés d'hydrolyse dans les filières industrielles : Vincent Fournier (Aquativ), Karl Lintner (Kal'idees), Pierre Mortamais (Soft-Ingredient, Takabio, Vatan), Daniel Thomas (Pôle IAR, Compiègne) et Philippe Thonart (Université de Liège, Belgique). Les différentes entreprises ont été présentées brièvement par chacun des intervenants.

Les perspectives de développement sont basées sur des programmes de recherche impliquant des acteurs industriels et académiques. Les objectifs finaux étant différents, cela entraîne parfois des problèmes de collaboration ; cependant, cela permet une mise en commun de compétences complémentaires et de visions différentes, qui s'avère au final très enrichissant. Bien que les industriels aient une vision plus pragmatique des problèmes, pour une PME, il est important de collaborer avec un partenaire académique. Les objectifs industriels et académiques ne sont pas identiques mais cela n'est pas forcément lié à la publication de résultats car aux USA et en Asie, par exemple, les autorités nationales demandent que les articles soient publiés dans des journaux reconnus.

Selon Alain Baniel (Ingrédia), la complémentarité entre partenaires industriels et académiques est essentielle même si certains points doivent être débattus au préalable tels que le droit à l'information avant publication. Un des verrous potentiels d'une collaboration entre le secteur public et le secteur privé est la gestion du temps lors d'un projet ainsi que les verrous financiers à savoir, comment partager la valeur économique en cas de dépôt de brevet. Pour s'assurer d'une collaboration sereine, tous les points sont à débattre avant l'engagement d'un partenariat public/privé.

David Guerrand (entreprise DSM, Delft) affirme qu'il n'y a pas de friction particulière aux Pays-Bas, puisque les chercheurs sont sollicités pour déposer des brevets et communiquer leurs résultats sous forme de publications. En effet, le monde académique Néerlandais est très pragmatique, ce qui favorise de nombreuses collaborations public-privé. Il faut savoir qu'un grand groupe fonctionne avec différents départements et que chacun d'eux fonctionne comme une PME qui doit défendre ses propres projets et chercher des financements au sein de la multinationale.

La mutualisation des moyens et des compétences s'avère enrichissante et permet de gagner en efficacité.

Quand la collaboration entre partenaires industriels et académiques est financée par le gouvernement, cela devient alors plus facile, selon André De Roos (DSM). La plupart des laboratoires académiques présents lors de ce colloque Adebitech travaillent d'ailleurs facilement avec les industriels, notamment par le biais de relations de type contractuelles. Dans certains cas, les résultats des recherches sont protégés et restent confidentiels pendant

une certaine période, date au-delà de laquelle les résultats tombent dans le domaine public. Cela est d'autant plus vrai pour une PME ou un centre technique.

La recherche sur les coproduits - caractérisés auparavant de "sous-produits" voire de déchets par manque de connaissance- constitue un problème pour les chercheurs en France dans le domaine de la biotechnologie, notamment lors de l'évaluation de l'AERES (Agence d'Evaluation de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur). En effet, lors de cette évaluation quadriennale, il est important de publier dans des journaux à hauts facteurs d'impact, ce qui n'est pas forcément le cas dans le domaine des bioprocédés et des coproduits, à priori mal caractérisés. Aussi, la méconnaissance de coproduits peut constituer un frein pour les chercheurs académiques notamment lors de la publication de leurs résultats.

A l'inverse du monde académique, la valorisation de coproduits d'un point de vue économique est considérée d'entrée de jeu par les industriels lors de développement de nouveaux produits et de nouveaux ingrédients, et c'est même une question cruciale. Actuellement, ces coproduits sont systématiquement pris en compte dans une démarche industrielle générale qui prend conscience de l'impact environnemental sans négliger l'aspect marketing.

Par ailleurs, la transformation de coproduits en hydrolysat présente un avantage économique indéniable du fait des applications existantes dans l'alimentation animale ou humaine, en cosmétique, parapharmacie voire dans le secteur médical. Il y a donc un réel retour sur investissements avec des perspectives de marché pour les produits et hydrolysats peptidiques.

Alain Baniel (Ingrédia) a souligné que l'hydrolyse ne devait pas être perçue comme une finalité mais plutôt comme une piste potentielle de valorisation de matières premières, notamment par le biais des ingrédients fonctionnels. Il existe effectivement des débouchés comme par exemple la valorisation de sucres et celle d'hydrolysats protéiques.

Un frein au développement de ces peptides est le lien direct avec la réglementation. En effet, l'engouement autour des alicaments a entraîné la mise sur le marché de nombreux produits qui ont dû par la suite être retirés suite à un refus du label allégations santé. Cependant, qu'il s'agisse de peptides fonctionnels ou bioactifs, cela implique la même démarche et le projet doit être orienté en fonction des besoins (David Guerrand, DSM).

Pour l'entreprise Ingredia qui valorise des hydrolysats, avec un objectif santé et fonctionnalité des protéines hydrolysées, les perspectives de développement reposent à la fois sur un intérêt économique mais aussi sur un intérêt pour l'hydrolyse.

La fonctionnalité recherchée d'un hydrolysat doit permettre de dépasser une contrainte et améliorer ainsi les propriétés (i.e. solubilité, dispersibilité, etc.) d'un produit. En effet, si les propriétés nutrition/santé constituent le pilier du développement d'un nouveau produit, la matrice alimentaire doit néanmoins être acceptable pour le consommateur sur le plan sensoriel.

Le secteur de l'aliment/santé pour l'alimentation humaine est régi par une réglementation stricte, il est possible toutefois de ne pas tenir compte de celle-ci notamment en alimentation animale (ex. des hydrolysats responsables de l'appétence). Les industriels produisant des peptides bioactifs à destination de l'alimentation animale considèrent qu'ils ne sont pas en retard sur le marché du peptide notamment par la mise en place de bio-marqueurs.

Par ailleurs, l'utilisation d'hydrolysat pour une fonctionnalité physico-chimique (viscosité, gel, etc.) est plus accessible et n'entraîne pas les problèmes d'allégation de l'hydrolysat de peptides bioactifs.

Le coût d'un kg d'hydrolysat peut varier selon sa bioactivité de 10 à 1000 euros le kg

d'hydrolysats selon le marché visé. Ce prix augmente proportionnellement à l'activité du produit et de la propriété intellectuelle. Les hydrolysats sur le marché sont rentables pour l'entreprise qui les commercialise puisque dans le coût de production du produit inclus, il faut une rentabilité industrielle en considérant notamment le procédé mis en jeu.

L'un des freins majeurs au développement de peptides bioactifs est l'obtention d'allégations santé. En effet, un peptide bioactif sans allégation santé ne pourra pas être industrialisé en Europe même si c'est le rêve des marketeurs. Néanmoins, le niveau d'exigence des autorités locales est différent selon les régions à travers le monde ; actuellement ce marché se déplace vers les pays asiatiques qui adoptent désormais une démarche "écologique" en cherchant à valoriser leurs coproduits dans un cadre réglementaires différent voire plus souple.

L'AFSSA est un atout pour le futur même s'il faut considérer le marché à l'échelle mondiale. Le prix est donné à la tonne et varie selon la source (i.e. plume, protéines végétales, poisson, lait) et la valorisation potentielle. Si pour certains industriels, les protéines et autres extraits d'animaux sont difficilement acceptables par le consommateur dans un contexte où la crise de la vache folle reste encore présente à l'esprit, la communication reste importante et il est préférable par exemple de parler de coproduit marin au lieu de coproduit de poisson. D'autres industriels pensent qu'il est nécessaire d'élargir le débat géographique et que maintenant la crise ESB est dépassée. En Asie, de très gros centres valorisent les produits bovins et la gélatine est utilisée aux USA ; ceci confirme l'importance de la zone géographique et le moment en ce qui concerne la valorisation des hydrolysats.

Quoi qu'il en soit, la réglementation doit aider à la valorisation de la matière première comme par exemple les certifications Halal et Kasher pour les produits issus d'animaux. L'entreprise Copalis certifie Halal de nombreux ingrédients pour le marché asiatique. De même, DSM produit des hydrolysats Halal et Kasher. Pour certains industriels, l'importance de la certification Halal et Kasher pourrait même atteindre les enzymes bien que la plupart le soient déjà. D'après le représentant de DSM, 90% des enzymes sont aujourd'hui produites pour ces deux secteurs. Ces certifications ne représentent pas une réelle contrainte étant donné que les animaux sont parfaitement tracés par la filière vétérinaire, puissante et extrêmement sécuritaire.

Afin d'étendre les perspectives de développement, les procédés doivent également être considérés en terme de coût et envisagés en terme industriel, en plus d'être sélectif vis-à-vis de la biomolécule d'intérêt. Pour le marché de l'alimentation humaine ou animale, la purification d'une molécule bioactive ne présente pas d'intérêt économique. L'intérêt de purifier, fractionner un peptide est principalement valable pour le marché pharmaceutique, or pour ce dernier, la synthèse peptidique s'avère plus intéressante que de l'extraction, purification. Par ailleurs, la mise au point de procédés en amont de la phase d'hydrolyse pourrait s'avérer intéressante en considérant la compatibilité avec l'usage alimentaire.

L'un des verrous technologiques est la compartimentation récurrente entre les usages. S'il est nécessaire d'extraire la partie active pour la santé et de considérer le reste pour l'alimentation humaine, il est préférable de raisonner en termes de valorisation différente et complémentaire de deux produits finaux.

En effet, Vincent Fournier (Aquatec) précise qu'il est impératif de maîtriser la fraîcheur pour les hydrolysats issus de coproduits marins. En effet d'ici 2030, la production en aquaculture va doubler, d'où l'importance de trouver de nouvelles sources de protéines pour l'alimentation animale.

Bien que les applications de peptides issus de l'hydrolyse de protéines servent essentiellement en alimentation humaine et animale, l'utilisation de ces peptides dans le domaine cosmétique ne doit pas être négligé, comme souligné par Karl Lintner (Kal'ideas, entreprise cosmétique).

Depuis 1959, Skin nikon produit des enzymes pour l'industrie alimentaire ; cet industriel Japonais (Nagoya), est une filiale commerciale Takabio représentée par Pierre Montarmais (Soft-ingredient, Takabio). Les enzymes Skin nikon sont obtenues par fermentation ; ces enzymes produites à pH naturel, par sélection génétique, mais non modifiées génétiquement sont essentiellement d'origine fongiques. Skin nikon fabrique plus de 300 enzymes ayant différentes activités.

Pour les perspectives de développement, il est nécessaire de tenir compte de deux objectifs essentiels à savoir améliorer la digestibilité des protéines et valoriser les produits laissés par l'alimentation humaine ou animale. Par exemple, les plumes pourraient être envisageables en alimentation animale puisque cette source de protéines nouvelles est digestible. De même, les problèmes liés à hypoallergénicité et anallergénicité doivent être considérés.

En alimentation animale, les industriels s'intéressent particulièrement aux hydrolysats qui donnent plus de valeur à la matière première en valorisant mieux les protéines. En aquaculture, la sédimentation entraîne une perte importante de protéines, or ce phénomène est diminué par hydrolyse. Ainsi, l'utilisation des hydrolysats permet d'augmenter la survie des animaux en aquaculture.

De façon générale, toutes les protéines vont manquer à l'avenir d'où l'importance de valoriser les coproduits. Bien qu'un hydrolysats puisse avoir ou non une fonctionnalité ou une bioactivité, la vision plus globale consiste à considérer l'ensemble des valorisations possibles des coproduits de source animale ou agricole sans tenir compte de ces 2% de peptides bioactifs. Il serait intéressant de prendre en compte la chaîne de valeur des produits et pas uniquement les deux extrêmes (i.e. peptide bioactif ou l'ensemble de l'hydrolysats). Par exemple, dans l'alimentation animale, les protéines massiques sont également recherchées pour la croissance animale.

Quel que soit l'application en alimentation animale ou humaine, pour obtenir une allégation santé, les dossiers doivent être argumentés.

L'augmentation de la digestibilité des protéines est l'un des paramètres important à considérer pour l'alimentation et peut être obtenu par la gestion en profil d'acides aminés de l'hydrolysats. Il existe aussi des échelles plus fondamentales telles que la teneur en hydrolysats sur le gène pep1, responsable de l'assimilation des di-tri peptides.

Dans l'hypothèse de la pénurie de protéines, l'utilisation de protéines plus exotiques, moins conventionnelles, devrait être envisagée. En Afrique, par exemple, mais également aux Pays-Bas (Université de Wageningen), la transformation de mouches est en cours d'étude. Ces protéines, à vision 2020-2030, pourraient être utilisées au sein du groupe industriel Mars avec des valorisations potentielles en alimentation animale.

Le consommateur accepte volontiers les hydrolysats et leur introduction dans les industries agro-alimentaires dans la mesure où ils proviennent d'une matière première connue (lait, œuf ou végétaux). Le fait d'hydrolyser n'entraîne pas de répulsion particulière de la part du consommateur sauf en cas de protéines exotiques. De même, par des actions de vulgarisation scientifique, les technologies enzymatiques ont été acceptées par le consommateur.

En ce qui concerne les produits cosmétiques, certaines protéines exotiques telles que les protéines de mouche, peuvent être difficilement acceptables par le consommateur d'un point de vue psychologique. D'autres peptides issus de source non conventionnelle (i.e. peptides bioactifs issus de la bave d'escargot), ne choque pas le consommateur pour les produits cosmétiques. Les hydrolysats naturels tels que les protéines sériques hydrolysées sont communément admis et sont utilisés fréquemment pour les crèmes de soin. Quel que soit le produit et son application, pour utiliser un argument nutritionnel, il est impératif de donner des explications aux consommateurs par un travail de vulgarisation scientifique et permettre

ainsi son acceptabilité.

Par ailleurs, l'hydrolyse enzymatique ou chimique, en plus de révéler un bon profil nutritionnel, permet d'augmenter les goûts et favorise l'appétence. En effet, les acides aminés et les peptides sont d'excellents substrats en tant qu'arômes.

Les protéines animales présentent un intérêt dans la production d'aliments bien qu'elles soient généralement plus chères que les protéines végétales. En effet, l'aminogramme des protéines animales ou végétales est différent et l'équilibre nutritionnel doit être respecté. 5 à 10 kg de protéines végétales sont produites par kg de protéines animales, ce qui pousse forcément vers un ratio en défaveur des protéines animales. Cependant comme souligné par Philippe Thonart (Université de Liège, Belgique), la filière animale utilise des terres qui ne peuvent pas être utilisées différemment (ex. terres de montagnes).

Si dans l'avenir le développement d'un cocktail peptique miracle reste illusoire, une formulation à partir de peptides séparés peut néanmoins être envisagée pour rééquilibrer un aminogramme, ce qui se fait déjà en alimentation animale. Les di- et tri-peptides sont plus facilement assimilables que les acides-aminés sous forme libre. Dans cette optique, les industriels cherchent à optimiser le procédé pour avoir majoritairement ces biomolécules et ainsi obtenir des FCR proche de 1.

Pour transformer 1 kg en alimentation animale en 1 kg de matière biologique, la seule solution consiste à utiliser des hydrolysats.

4.3. Rôle de la DGCIS pour promouvoir l'innovation et l'économie industrielle

Intervention de Pierre Angot, DGCIS, sous-directeur de l'industrie de la santé, de la chimie et des nouveaux matériaux

Pierre Angot, de la Direction Générale de la Compétitivité des Industries et des Services (DGCIS), sous-directeur de l'industrie de santé, de la chimie et des nouveaux matériaux est intervenu lors de la dernière table ronde. L'objectif de cette instance est d'accompagner les entreprises en les rendant plus compétitives sur le marché, tout en privilégiant les décisions créatrices d'emploi. En effet, comme souligné par Pierre Angot, les procédés de protéolyse enzymatique sont utilisés dans de nombreuses industries et sont présents dans de nombreuses innovations.

En tant que sous-directeur de la filière « Industries de la santé, de la chimie, et des nouveaux matériaux » de la DGCIS, à laquelle sont affiliées les industries agro-alimentaires, M. Angot a souligné les nombreuses voies de valorisation de protéines permises par les procédés d'hydrolyses enzymatiques, en particuliers en isolant certaines fonctionnalités tout en éliminant les parties allergéniques voire toxiques.

Les applications identifiées au cours de ce congrès relèvent de la chimie du végétal (pour laquelle des actions de soutien sont menées, notamment au travers des investissements d'avenir), la biologie de synthèse, ainsi que le développement durable par la valorisation de coproduits. Lors des différentes interventions, de ce colloque il est apparu que les applications identifiées présentent de vrais enjeux, tant sur le plan de l'innovation que sur le plan économique, impliquant des technologies multicritères, et s'appuyant sur diverses réglementations (REACH, allégations santé, etc.) avant d'être autorisées sur le marché.

L'objectif principal de la DGCIS est de développer des investissements d'avenir, dont l'intérêt est de produire sur le territoire national, des avancées scientifiques, tout en veillant à protéger la propriété intellectuelle française par le dépôt de brevets. A ce niveau, il est d'ailleurs primordial que les industriels et les partenaires académiques aient conscience des enjeux de patriotisme économique.

Pour atteindre cet objectif, de nombreux outils ont été créés tels que les IRT (Instituts de Recherche Technologique), les IED (Instituts d'Energie Décarbonnées) comprenant des plateformes dans le domaine de l'énergie (PIVERT/IFMAS), les plateformes mutualisées d'innovation ainsi que les PSP ou pôles de compétitivité. Contrairement à OSEO (organisme de soutien exclusivement dédié aux entreprises), l'une des spécificités de la DGCIS repose sur la mise en place de projets collaboratifs impliquant à la fois des centres de recherche publics, des grands groupes industriels et des PME en réponse à des appels à projets. A ce titre, ce type de collaboration entre le secteur public et le secteur privé génèrent parfois des constructions juridiques complexes.

Par ailleurs, au cours de cette table ronde, il a été souligné que les difficultés de transport et de conservation des matières premières et des coproduits nécessitaient la création d'entreprises de première transformation participant ainsi au maintien de l'emploi et au développement économique territorial., et qu'il ne fallait pas négliger les difficultés pour obtenir les autorisations de mise sur le marché de ces nouveaux produits(3 à 4 ans pour obtenir une AMM pour un nouvel ingrédient alimentaire)

Afin de rester compétitives vis-à-vis d'autres pays, notamment la Chine, les entreprises doivent rester innovantes tout en protégeant leurs propriétés intellectuelles par des dépôts de brevets. De nombreuses entreprises du secteur concerné par ces journées innovent, bien qu'elles ne soient pas toujours visibles des consommateurs de produits alimentaires.». En effet, les ingrédients utilisés, provenant de diverses industries, ne sont pas toujours mentionnés dans les produits finis.

Pour conclure, Mme Lando (Vice-Présidente de l'association Adebitech) a souligné l'importance accordée par le ministre M. Montebourg du Ministère du Redressement Productif à la filière industrielle des hydrolysats En particuliers des protéines issues d'agro-ressources végétales.

Résumés des Posters

Relation entre l’Affinité d’un Acide Aminé pour un Ion métallique Immobilisé et sa Bioactivité : Etude à l’Echelle Moléculaire d’un Procédé de Séparation Sélectif de type IMAC

Latha-Selvi Laetitia CANABADY-ROCHELLE - CNRS

A l’heure actuelle, les peptides présentant un intérêt potentiel sur le plan nutritionnel, pharmaceutique ou cosmétique, sont séparés selon des propriétés physico-chimiques déterminées, telles leur masse molaire, leur taille (nombre de résidus d’acides aminés, géométrie spatiale), leur charge (liée au potentiel isoélectrique), leur caractère hydrophile/hydrophobe ou encore leur affinité (KD) vis-à-vis d’un ion métallique immobilisé. Les peptides issus de l’hydrolyse de protéines du tourteau de colza, coproduit industriel provenant de l’extraction d’huile, semblent prometteurs en tant qu’agents nutraceutiques voire ingrédients fonctionnels du fait de leur fort pouvoir antioxydant lié à la présence élevée en résidus histidine. L’objectif de cette étude est de séparer des peptides d’intérêt en fonction de leur bioactivité.

À l’heure actuelle, cette approche n’est pas appliquée aux procédés de séparation préparatifs. Aussi, l’originalité de ce travail repose sur la séparation sélective de peptides selon leurs bioactivités en établissant une relation spécifique entre l’affinité d’un peptide vis-à-vis d’un ion métallique immobilisé (KD) et son activité anti-oxydante (pouvoir antioxydant) par le biais de ses propriétés physico-chimiques. La modélisation de la relation affinité / propriétés physico-chimiques ainsi que de la relation propriétés physico-chimiques / bioactivité, permettra, in fine, de modéliser l’affinité d’un peptide pour un ion métallique immobilisé en fonction de son pouvoir antioxydant.

Dans un premier temps, cette démarche a été validée sur certains acides-aminés libres ; c’est le cas pour l’histidine, la cystéine et le tryptophane (triade de Porath ayant une affinité connue pour les ions métalliques M^{2+}) ainsi que pour l’alanine et la glycine (acides aminés contrôles). L’affinité pour un ion métallique immobilisé (KD) a été mesurée expérimentalement par des isothermes de sorption réalisées en batch et le pouvoir antioxydant a été déterminé par la méthode de l’ABTS

État de structuration des protéines : un nouveau paramètre de contrôle de la protéolyse enzymatique

Claudia NIOI - CNRS

Le procédé de protéolyse enzymatique est un procédé désormais bien connu pour la valorisation des protéines issues d'agro-ressources, afin d'obtenir des hydrolysats / peptides à haute valeur ajoutée qui peuvent être employés notamment dans les domaines des nutraceutiques et de la cosmétique.

Actuellement, les paramètres de contrôle de procédés sont : les caractéristiques hydrolytiques liées à la spécificité ou non de l'enzyme utilisé, le pH et la température de réaction. Ces paramètres, qui définissent les conditions opératoires essentielles affectent la cinétique réactionnelle et les caractéristiques physico-chimiques des mélanges peptidiques obtenus. Par ailleurs, il est connu que ces paramètres opératoires impactent aussi l'état structural initial de la protéine, substrat de la réaction. Cet aspect structural n'est actuellement pas maîtrisé ni pris en compte pour le contrôle du procédé de protéolyse. Dans ce contexte, l'enjeu de cette étude est de quantifier et de qualifier l'effet de l'état structural de la protéine afin d'évaluer son effet sur la cinétique du procédé d'hydrolyse. Pour cela, les protéines modèles choisies sont les napines, des albumines, extraites du tourteau de colza. Le choix s'est porté sur ce type de protéines en vertu de leur faible taille moléculaire (de l'ordre de 14 kDa) et parce qu'elles disposent d'une activité antimicrobienne.

Pour répondre à cet objectif, une première étape de l'étude a conduit à observer l'impact des conditions opératoires (pH et température) sur les structures secondaire et tertiaire des napines qui ont été évaluées par les techniques de dichroïsme circulaire et de fluorescence. Par la suite, la protéine a été placée dans le réacteur, à pH et température fixés, en absence d'enzyme, pendant une certaine durée dite « phase d'incubation » (période de temps au cours de laquelle s'établit une modification structurale de la protéine correspondant à une « dénaturation »). Les cinétiques de protéolyse issue d'un substrat initial obtenu à différents états de structuration ont été comparées. Les résultats montrent que ce nouveau paramètre de contrôle a une influence sur le procédé d'hydrolyse conduisant à une modification de l'activité enzymatique et de la vitesse de réaction.

L'originalité de cette étude repose sur la qualification et la quantification de l'état structural de la protéine pour le contrôle du procédé de protéolyse enzymatique. Parallèlement, l'impact de ce nouveau paramètre sur la composition des mélanges obtenus et sur les propriétés fonctionnelles des hydrolysats produits a été étudié.

Use of electrodialysis with ultrafiltration membrane for the simultaneous enzymatic hydrolysis production and fractionation of bioactive peptides from beta-lactoglobulin

Laurent BAZINET - *Université Laval*

The hydrolysis of β -lactoglobulin protein and the fractionation of generated peptides were performed in one step in an EDUF cell. After 240 min of treatment, amongst the 30 peptides peaks detected in the β -lactoglobulin hydrolysate which corresponded to 30 peptides, respectively, 16 and 4 peptides were detected in the anionic and cationic peptide recovery compartment.

Amongst these 16 peptides, 2 hypocholesterolemic peptides, 3 antihypertensive peptides and 1 antibacterial peptide were recovered and concentrated with migration rates ranged between 5.5 and 66.0%.

Amongst the 4 cationic peptides, the peptide sequence ALPMHIR, identified as lactokinin and known to exert an important antihypertensive effect, was recovered and concentrated.

At our knowledge, it was the first time that hydrolysis was conducted under an electric field to simultaneously separate anionic and cationic peptides produced

**Préparation à l'échelle pilote d'un hydrolysats pepsique décoloré et actif de l'hémoglobine :
Source de peptides antibactériens**

Naima NEDJAR-ARROUME - *Laboratoire de Procédés Biologiques Génie
Enzymatique et Microbien (ProBioGEM)*

Trente peptides antibactériens ont été obtenus et identifiés à partir de l'hydrolysats pepsique de l'hémoglobine purifiée ou du cruor. La plupart sont des peptides intermédiaires. Ces peptides sont issus des chaînes alpha ou bêta de l'hémoglobine et classés en plusieurs familles. Dans un contexte de sécurité alimentaire et de protection des denrées à l'aide de produits naturels, ces peptides antimicrobiens dérivés de l'hémoglobine bovine ou porcine pourraient être intéressants comme moyen de conservation pour le stockage et la distribution des produits de la filière bovine ou porcine.

Toutefois la couleur rouge et l'amertume des hydrolysats empêchent leurs applications en alimentation humaine et animale. Une étude de la décoloration et de la diminution de l'amertume de ces hydrolysats a été réalisée pour faciliter leurs utilisations. Nous avons suivi la cinétique d'hydrolyse de l'hémoglobine (bovine ou porcine) par la pepsine et nous avons fait varier les paramètres d'hydrolyses tels que le pH et le type d'hémoglobine hydrolysée. L'hémoglobine dénaturée se décolore mieux que l'hémoglobine native. De plus, à pH 3,5 l'hémoglobine est naturellement transformée en hémoglobine dénaturée. C'est également sur cette solution que la meilleure décoloration a été obtenue.

Ensuite, l'amertume a été étudiée. Elle est en relation avec le degré d'hydrolyse. En effet, plus celui-ci est élevé plus la poudre se révèle amère. Ceci s'explique par le fait que de petits peptides amers se forment pour des temps d'hydrolyse assez longs.

Voie de valorisation de l'hémoglobine bovine : modélisation de la cinétique enzymatique des peptides antimicrobiens

Karima HEDHILI - *Laboratoire de Procédés Biologiques Génie Enzymatique et Microbien (ProBioGEM)*

Au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine, l'ensemble des chemins réactionnels aboutissants à la formation des peptides est étudié en fonction du degré d'hydrolyse de la protéine. Les réactions protéasiques sont des réactions composites avec de nombreuses réactions parallèles et séquentielles qui se traduisent par des cinétiques et des mélanges peptidiques complexes évoluant au cours de l'avancement de la réaction. Les peptides actifs se trouvent généralement parmi les populations de peptides transitoires dont la séquence et la concentration sont sous contrôle cinétique. Ces études cinétiques et leurs modélisations permettront d'optimiser l'obtention d'un peptide actif particulier.

Plusieurs peptides bioactifs (analgésique, opioïdes, antimicrobiens,...) sont obtenus par hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine. Récemment, trente peptides antibactériens ont été obtenus. L'hydrolysate est donc un mélange d'un très grand nombre de peptides actifs.

La préparation de peptides à activités biologiques ou des fractions peptidiques enrichies en ces peptides à partir de protéines issues de l'agriculture présente alors un grand intérêt : en industries alimentaires, en pharmacologie, dans le domaine des aliments-santé ou dans le domaine de l'hygiène et de la sécurité alimentaire (comme ingrédients stabilisants des préparations alimentaires).

Un modèle mathématique de l'hydrolyse contrôlée pour l'obtention de ces peptides antimicrobiens est réalisé afin d'optimiser cette voie de valorisation. Un système d'équations différentielles a permis de modéliser l'ensemble des réactions parallèles et consécutives qui ont eu lieu au cours de l'hydrolyse. Une optimisation basée sur le modèle proposé a permis d'identifier les constantes cinétiques des réactions étudiées. Les résultats obtenus et le modèle proposé offrent la possibilité de contrôler le procédé d'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine.

Influence de la micro fluidique sur la modulation de la cinétique enzymatique

Rénato FROIDEVAUX - *Laboratoire ProBioGEM*

Les microréacteurs représentent un nouvel outil pour l'ingénierie des enzymes. Dans ce contexte, nous avons montré que l'écoulement laminaire dans des micros canaux influence la sélectivité cinétique de la réaction enzymatique impliquant l'hémoglobine et la pepsine. Les conditions réactionnelles (pH, température, concentration en réactants, temps de séjour...) étaient les mêmes dans les études en mode « batch » et « micro fluidique », de manière à comparer les cinétiques d'hydrolyse à partir de l'analyse des profils chromatographiques d'hydrolysats peptidiques obtenus par HPLC de phase inverse.

En mode batch, l'hémoglobine est rapidement et complètement hydrolysée pour donner des peptides transitoires. Linderstrøm-Lang a développé un modèle pour expliquer ces phénomènes fréquemment observés lors de l'hydrolyse des protéines globulaires, appelé mécanismes « zipper » et « one by one ». Dans le mode micro fluidique, de l'hémoglobine intacte reste dans le microréacteur et de petits peptides avec de faibles temps de rétention, combiné avec l'absence de peptides intermédiaires, montrent que la réaction enzymatique procède différemment qu'en mode batch, probablement en raison de l'écoulement micro fluidique et des propriétés de diffusion de l'enzyme, du substrat et des peptides générés pendant la réaction.

Des simulations de diffusion et de mélange enzyme/substrat à l'intérieur du microsystème ont été réalisées avec le logiciel COMSOL, afin de prédire les concentrations de substrat et d'enzyme grâce à l'équation d'advection / diffusion. Enfin, un algorithme stochastique a été utilisé pour modéliser la cinétique d'hydrolyse du substrat en modes micro fluidique et batch.

Cette étude démontre une nouvelle approche dans la modulation de la sélectivité de la catalyse enzymatique conduisant à un contrôle de la cinétique de réaction. Actuellement, certains paramètres physico-chimiques et de conception du microréacteur sont étudiés en mode micro fluidique afin de déterminer leur influence sur la sélectivité de la réaction par rapport au mode batch.

Production and resistance of bioactive peptides from bovine hemoglobin during an in vitro simulated digestion.

Jordan DEGUINES, Benoit CUDENNEC, Pascal DHULSTER and **Rozenn RAVALLEC**

ProBioGEM, IUT A, Polytech'Lille, Villeneuve d'Ascq, France.

The upgrading of food by-product in order to generate functional molecules that can play a role in the constitution of healthy ingredients is a major research challenge. One significant issue induced by the assimilation of these functional molecules in the body is their future throughout the whole digestion.

In this context, an in vitro simulation of the human gastrointestinal digestion was performed with native bovine hemoglobin in order to produce, identify and analyze the resistance of the generated bioactive peptides exerting potential anti-hypertensive activity in the gastrointestinal tract. Hydrolysates were obtained by the successive action of gastrointestinal endopeptidases. The samples, obtained at different times of the digestion, were analyzed by reversed-phase HPLC, enabled to follow the evolution of the peptidic population. These analyses allowed to demonstrate the production, during the intestinal phase, of peptides different from those usually obtained by the enzymatic hydrolysis of hemoglobin by the pepsin. These new peptides were generated during the first 15 minutes of hydrolysis after the action of pancreatin. The size and mass of peptides were determined respectively by FPLC and HPLC/MS.

The presence of bioactive peptide in hydrolysates was demonstrated by their ability to inhibit the activity of the Angiotensin I Converting Enzyme (ACE).

The simulated in vitro digestion reproduces hydrolysis conditions similar to physiological processes of an in vivo digestion and is an alternative to the conventional production of biologically active peptides while avoiding the potential harmful side effects.

Fractionnement de peptides issus de l'hydrolyse des caséines par les protéases de surface de Lactobacillus

Salima ROUDJ ; BENOZZA.,S; ZADI-KARAM.,H et KARAM., N.E

Laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie, Université d'Oran-Sénia, Oran, Algérie

salimaroudj06@yahoo.fr

La voie de production des peptides biologiquement actifs est la protéolyse par les enzymes digestives (pepsine, trypsine) ou par voie fermentaire. Certaines bactéries lactiques (Lactococcus et Lactobacillus) génèrent ces peptides à partir de protéines laitières grâce à leurs protéases liées à la paroi ou intracellulaires.

Dans un objectif de produire, de caractériser et d'identifier les peptides à activité biologique, notre étude préliminaire a porté sur l'hydrolyse des caséines par les protéases liées à la surface des cellules de deux souches de lactobacilles BH14 et CHTD27 isolées de lait de chamelle et l'analyse par méthodes électrophorétique et chromatographique des hydrolysats générés. L'activité des protéases liées à la surface des cellules bactériennes et l'activité d'une enzyme digestive la trypsine ont été examinées sur la caséine totale en solution.

L'hydrolysats obtenu par la souche CHTD27 est plus enrichi en peptides (15,32 mU de Tyrosine) comparativement à la souche BH14 (10,42 mU de Tyrosine). Les caséines ont montré une sensibilité plus grande à la trypsine (72,39 mU de Tyrosine).

L'analyse électrophorétique des hydrolysats a montré que les caséines sont totalement hydrolysées par les cellules de la souche CHTD27 comme par la trypsine alors que, pour la souche BH14 l'intensité de la réaction d'hydrolyse reste faible.

L'analyse des hydrolysats par chromatographie sur couche mince a permis de mettre en évidence 9 peptides de Rf différents allant de 0,10 à 0,83 dans le cas de l'hydrolyse par la trypsine. Parmi eux deux peptides, de Rf 0,48 et 0,72 sont aussi retrouvés dans les hydrolysats obtenus avec les cellules des souches BH14 et CHTD27. Par ailleurs, les hydrolysats obtenus avec les cellules de la souche BH14 et de la souche CHTD27 ont révélé 3 peptides communs aux deux souches, de Rf 0,24 ; 0,64 et 0,67.

L'hydrolysats obtenu par la souche BH14 s'est distingué par la présence de 2 peptides de Rf 0,33 et 0,47. La chromatographie liquide à haute performance en phase inverse très utilisée pour la séparation des peptides a permis de définir le contenu des hydrolysats. 6 pics ont été révélés dans l'hydrolysats obtenu par la souche CHTD27 (1,047 ; 1,189 ; 2,176 ; 2,490 ; 2,829 ; 3,149) et 5 pics d'élution pour l'hydrolysats obtenu par la souche BH14 (1,043 ; 1,215 ; 2,197 ; 2,595 ; 2,775) avec des temps de rétention différents.

Par cette étude nous avons montré que les deux souches possèdent des protéases de surface capables d'hydrolyser in vitro la caséine totale à des sites de coupure différents, conduisant à des profils peptidiques distincts.

Mots clés : Protéases de surface ; Lactobacillus ; hydrolysats de caséines ; électrophorèse ; chromatographie sur couche mince ; chromatographie liquide à haute performance en phase inverse.

Caractérisation structurale de peptides composants un hydrolysats protéique complexe

Marie ROBERT - *FRE3484-CNRS INEE-Laboratoire de Biologie des Mollusques Marins et Ecosystèmes Associés*

Les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles des hydrolysats protéiques dépendent essentiellement de leur profil de poids moléculaire, de leur abondance peptidique et des caractéristiques physico-chimiques des peptides qui les composent.

Dans un objectif de caractérisation structurale d'hydrolysats protéiques complexes, le principal challenge est la mise en place d'une méthodologie reproductible permettant la détermination de profils peptidiques d'hydrolysats protéiques en spectrométrie de masse, qui pourront ensuite être exploités pour l'identification des peptides (séquence en acides aminés, protéine d'origine) à partir des données génomiques disponibles. La forte abondance peptidique des hydrolysats impose de réaliser une étape d'extraction suivie d'une première étape de séparation dans le but de caractériser l'ensemble des peptides présents dans l'hydrolysats en spectrométrie de masse (MALDI-TOF/TOF).

Trois méthodes d'extractions peptidiques (acide à froid et à 100°C et acétone à froid) ont été combinées dans le but d'avoir une vue la plus exhaustive possibles des peptides composant l'hydrolysats. A l'issu de cette étape, la performance de plusieurs méthodes de séparation (en fonction de l'hydrophobicité, de la charge ou du point isoélectrique) ont été comparées.

Les analyses réalisées à partir d'un pool des trois extraits ne permettent pas d'obtenir de résultats exploitables après une première séparation en exclusion stérique ou en phase inverse. L'élimination de l'extrait à l'acétone, suspecté d'être riche en lipides, se traduit par un gain significatif du niveau de peptides détectés. Ainsi, les analyses réalisées après une première étape de séparation en phase inverse se traduisent par la détection de 600 m/z dans la gamme de masses 800-4000 Da et par l'identification d'une dizaine de peptides grâce aux données génomiques disponibles.

Le même échantillon soumis à une électrophorèse préparative (séparation en fonction du point isoélectrique) en première étape de séparation permet cette fois de détecter environ 9000 m/z. Corrélativement, près de 300 peptides ont pu être identifiés avec les mêmes données génomiques. L'électrophorèse préparative constitue donc une alternative performante pour l'analyse de matrices peptidiques complexes en spectrométrie de masse.

Immobilisation d'enzymes par la technologie des plasmas froids**Rénato FROIDEVAUX** - *Laboratoire ProBioGEM*

La polymérisation par plasmas froids est adaptée à la conception d'une interface entre les composants biologiques et des transducteurs physiques, qui sont les deux parties principales d'un Bio-MEMS. Les films polymérisés par plasma peuvent jouer un rôle important dans le contrôle et la manipulation de composants biologiques, tout en conservant leur activité. Dans ce contexte, nous avons étudié une méthode novatrice d'immobilisation d'enzymes grâce à un traitement par plasma froid : la β -galactosidase (β -Gal) a été utilisée comme cette étude. L'enzyme devra conserver son activité mais également présenter une stabilité au cours du temps (absence de relargage, activité stable).

La fabrication des revêtements bio-actifs est réalisé en utilisant un traitement en post-décharge d'un flux de Plasma d'azote et le 1,1,3,3-tétraméthylidisiloxane (TMDSO) qui présente de bonnes propriétés de polymérisation ainsi qu'une toxicité très faible. Les caractéristiques du procédé et du produit final visent à inclure en une seule étape et grâce à un traitement rapide, une distribution homogène de l'enzyme dans les revêtements de polymère, une conservation de l'activité après immobilisation et une utilisation limitée de solvant. Différentes méthodes de dépôt ont été testées; l'enzyme déposée soit directement sur le support, soit sur une première couche de polymère recouverte ensuite par un dépôt, soit l'enzyme dans le polymère liquide injecté dans le réacteur et déposé sur le support. Les activités ont été mesurées en fonction du temps de dépôt du polymère, des quantités d'enzyme déposées, de la nature du support, du mode d'alimentation en substrat. La stabilité de l'activité enzymatique est déterminée grâce à l'étude de la conversion de l'ortho-nitrophényl- β -galactoside (o-NPG) en ortho-nitrophénol (o-NP) après plusieurs séquences de lavage de l'échantillon. Enfin, nous avons étudié l'état de surface du revêtement déposé par microscopie à force atomique et microscopie électronique à balayage afin d'examiner sa topographie et son aspect après exposition à des tests d'activité différents. La technologie des plasmas froids a permis en une seule étape d'immobiliser la β -Gal tout en conservant son activité enzymatique. Actuellement, nous étudions la distribution de l'enzyme dans le revêtement de polymère. Ainsi, l'optimisation du processus d'immobilisation et une meilleure compréhension de l'effet des propriétés des revêtements sur l'activité enzymatique permettra le développement de nouveaux revêtements biofonctionnels pour des applications spécifiques. De plus, n'ayant recours qu'à très peu d'éléments chimiques, cette méthodologie de dépôt et d'immobilisation peut très bien s'inscrire dans les « Green Technologies ».

Conception de membranes hydrophobes par fonctionnalisation en C18 : application pour la séparation de biomolécules de nature protéique

Romain KAPEL^{1*}, Hacène LOUNI¹, Lætitia CANABADY-ROCHELLE¹, Andreea PASC², Carole LAINE³, Ivan MARC¹

**Auteur correspondant : romain.kapel@ensic.inpl-nancy.fr*

1 : Laboratoire Réaction et Génie des Procédés - UPR CNRS 3349, 13 rue du bois de la Champelle, 54500 Vandœuvre-Lès-Nancy, France

2 : Laboratoire Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes, Equipe Physico-chimie, Université de Lorraine, UHP, case 79, BP 239F, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy

3 : Amer-Sil S.A., 61 rue d'Olm, L-8281 Kehken, Luxembourg

A l'heure actuelle, les peptides présentant un intérêt potentiel dans les différents domaines d'application, sont séparés par chromatographie liquide selon des propriétés physico-chimiques caractéristiques tels leur taille-poids moléculaire (Da), leur charge, leur affinité et/ou leur indice d'hydrophobie. Or, certains facteurs limitent l'utilisation de colonnes chromatographiques telle leur difficulté de mise en œuvre, leur faible productivité et un coût élevé des phases stationnaires.

Aussi, des procédés de séparation de biomolécules par membranes chromatographiques sont développés. L'objectif de cette étude est (1) de fonctionnaliser une membrane commerciale (Amer-sil, Kehlen, Luxembourg) par des groupements octadecyl afin de la rendre hydrophobe et (2) d'étudier son affinité à l'égard de biomolécules hydrophobes, telles que le tryptophane (acide aminé hydrophobe) et l'albumine bovine sérique (BSA), une protéine de référence. Après fonctionnalisation des particules de silice incluses dans la membrane par des groupements octadecyl (C18) par substitution nucléophile, le lavage de la membrane a été nécessaire afin d'éliminer les groupements C18 physi-sorbés.

Différents solvants (eau, toluène, et éthanol) ainsi qu'un traitement aux ultrasons ont été testés afin de déterminer les conditions optimales de lavage permettant la désorption des C18 adsorbés physiquement sans pour autant dénaturer la membrane. L'efficacité de lavage a été corrélée à des mesures de pertes de masse et les solvants récupérés après lavage ont été analysés par IRTF afin d'identifier les molécules désorbées. La membrane a été caractérisée par des mesures de porosimétrie au Hg afin de déterminer la taille des pores avant et après traitement aux ultrasons.

L'hydrophobie de la membrane a été caractérisée par des mesures d'angle de contact. Le lavage à l'éthanol (15 mn, agitation douce) s'avère être la méthode de lavage optimale. Dans une seconde étape, l'étude d'adsorption a été réalisée en conditions statiques, à l'équilibre thermodynamique. Les membranes hydrophobes obtenues par fonctionnalisation par des C18 adsorbent trois fois plus de BSA qu'une membrane hydrophobe conventionnelle.

Séparation sélective de peptides et d'acides aminés par des membranes cationiques de nanofiltration à base de poly(étherimide)

Sana GASSARA^{1,2}, Raja Ben Amar², André Deratani¹

1 : Institut Européen des Membranes, Université Montpellier 2, cc 47, 2 Place E. Bataillon, 34095 Montpellier cedex 5, France.

2 : Faculté des Sciences de Sfax, Laboratoire des Sciences des Matériaux et Environnement, route de Soukra km 4-3018 Sfax, Tunisia.

Les peptides cationiques présentent un large spectre d'activité antibactérienne et antifongique, voire antivirale. Ils sont caractérisés généralement par une longueur de 12 à 50 acides aminés et une charge nette positive en raison d'un excès de base des résidus lysine et arginine sur leurs chaînes. En plus, les acides aminés positifs sont très utilisés comme matières premières et ingrédients actifs dans l'industrie pharmaceutique, alimentaire, chimique et biotechnologiques. Les hydrolysats protéiques issus des réactions enzymatiques sont très riches en fractions peptidiques et acides aminés cationiques. Vu la petite taille et l'état de charge de ces solutés, la nanofiltration (NF) et l'ultrafiltration (UF) basse sont des procédés bien adaptés pour leur séparation à partir d'un hydrolysate et leur purification.

Le but de ce travail est d'évaluer l'applicabilité de nouvelles membranes de nanofiltration chargées positivement pour l'extraction sélective des peptides et des acides aminés. Ces membranes sont obtenues par une modification chimique de membranes d'ultrafiltration en poly(étherimide) par le poly(éthylèneimine). La rétention de peptides et d'une série d'acides aminés a été déterminée à partir de solutions modèles en fonction de la pression appliquée, du pH et de la concentration de la solution d'alimentation. En bon accord avec l'effet Donnan, la rétention des solutés dépend de la concentration et de la charge ionique. Les solutés chargés positivement comme L-arginine et L-lysine sont retenus sélectivement comme attendus. La rétention minimale a été observée au point isoélectrique de la couche active (pH 9.4).

Stacking of ultrafiltration membranes with different molecular weight cut-offs on the production of glucose captation bioactive flaxseed peptide fractions by electro dialysis with ultrafiltration membranes

Laurent BAZINET - *Université Laval*

A flaxseed protein hydrolysate (FPH) was fractionated by electro dialysis with ultrafiltration membranes (EDUF) for the recovery of specific peptides. The cell configuration was composed of ion-exchange membranes and two ultrafiltration membranes with different molecular weight cut-offs (20 and 50 kDa).

This configuration allowed the recovery of two specific cationic peptide fractions (KCI-F1 and KCI-F2). After 360 min of treatment, EDUF allowed concentration of the 300-400 and 400-500 Da molecular weight range peptides in the KCI-F1 and KCI-F2 fractions compared to the initial FPH. Amino acid analysis showed that His, Lys and Arg were especially concentrated in the KCI-F1 and KCI-F2 compartments.

Finally, glucose-transport assay demonstrated that the KCI-F2 fraction increased glucose uptake in L6 cells. Consequently, the stacking of ultrafiltration membranes with two different molecular weight cut-offs in an electro dialysis cell allowed the recovery and the concentration of more specific peptide fractions and, amongst peptide fractions recovered, specific peptide sequence(s) increased glucose uptake in L6 cell.

Anti-diabetic soy peptides fractions recovered by membrane processes: comparison of UF and EDUF.

Cyril ROBLET^{1,2}, Jean AMIOT^{1,2}, Geneviève PILON^{2,3}, Charles LAVIGNE^{2,3},
André MARETTE^{2,3}, **Laurent BAZINET**^{1,2*}

1 : Department of Food Sciences and Nutrition, Université Laval, Quebec, (QC), Canada

2 : Institute of Nutraceuticals and Functional Foods (INAF) Université Laval, Quebec, (QC), Canada

3 : Centre de recherche sur les maladies lipidiques, Centre Hospitalier de l'Université Laval, Quebec, (QC), Canada

**Corresponding author: laurent.bazinet@fsaa.ulaval.ca*

Many soybean compounds have been identified for their health benefits and since a few decades, research interests were focused on soy peptides. However, few fractions have already been identified for their metabolic activities. In this context, two kinds of separation technologies (pressure-driven, ultrafiltration (UF); electrically-driven, electro dialysis with ultrafiltration membranes (EDUF)) were compared for their potential to separate bioactive soy peptides. Moreover, two conditions were studied for each technology: for UF technology, two membrane configurations were studied (a 10 kDa spiral wound membrane (SW) and a 10 kDa hollow fiber membrane (HF)), while two electric strength/UF membrane cut-off ratios were investigated in EDUF (5 V/10 kDa vs 50 V/100 kDa). After separations, fractions were tested in vitro for their glucose up-take activities, using L6 muscular cells.

In spite of composition differences revealed by LCMS analysis, no effect was reported neither for HF configuration nor for EDUF at 5 V/10 kDa. However, significantly increased glucose uptakes were measured in cells treated with SW fractions (at 1 mg/ml) and EDUF 50 V/100 kDa fractions (at 1 µg/ml), with a dose/effect correlation, indicating a potential anti-diabetic effect. Moreover, it was demonstrated by western blot experiments that the AMPk pathway, one of the major non-insulino dependent glucose uptake pathway, was activated by the 50 V/100 kDa EDUF fractions. Hence, it appeared that EDUF treatment used at 50 V/100 kDa would be a convenient mean for isolating and concentrating in vitro anti-diabetic peptides from soy hydrolysate, more efficiently than UF technology.

Cryptides marins et syndrome métabolique : quels modes d'action ?

Yesmine BEN HENDA et S. Bordenave-Juchereau

*Laboratoire LIENSs, UMR CNRS 7266, Approches Moléculaires Environnement Santé
Site Marie Curie, UFR Sciences Technologies Santé
Université de La Rochelle F-17042.*

L'intérêt des consommateurs pour la relation entre alimentation et santé s'est accru ces dernières années. Ils sont désormais conscients qu'un mode de vie sain combiné à la consommation d'aliments fonctionnels contribuait à une bonne santé et au bien être.

Les ressources marines bénéficient d'une bonne image auprès du public. Leur exploitation raisonnée intégrant la valorisation des coproduits, devient indispensable. D'autant plus que ceux-ci constituent un réservoir considérable de substances actives, en particulier, de peptides bioactifs. Ces cryptides (peptides initialement dissimulés au cœur des protéines) sont libérés à partir de protéines marines lors de la digestion ou lors de procédés protéolytiques industriels. Ils modulent le métabolisme de l'être humain, peuvent prévenir et pourraient traiter certaines maladies comme l'hypertension, l'obésité, le diabète, le cancer, les maladies cardiovasculaires, inflammatoires et immunitaires.

La valorisation des fractions protéiques marines est donc d'un intérêt industriel considérable. Intégrés dans la formulation de produits, ils confèrent image et fonctionnalité.

Dans ce contexte, nous nous intéressons aux cryptides marins capables de cibler des pathologies du syndrome métabolique : hypertension, diabète et obésité. Nous caractérisons les modes d'action de di et tri peptides synthétiques précédemment identifiés comme inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine sur d'autres enzymes impliquées dans la génération d'angiotensine II : Cathepsines D et G... Leur potentiel antidiabétique est mesuré via l'inhibition des alpha-amylases et alpha-glucosidases intervenant dans l'augmentation de la glycémie post prandiale.

Une étude des voies de modulation de la différenciation adipocytaire, première étape menant à l'obésité, exercée par ces cryptides est menée en parallèle. Leur potentiel cytotoxique et antiprolifératif a été évalué in vitro sur adipocytes humains immortalisés, tout comme leur influence sur la teneur des adipocytes en lipides totaux. La modulation de l'expression de marqueurs enzymatiques et génétiques de différenciation adipocytaire par les cryptides marins est étudiée. Les marqueurs protéiques sont la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPDH), la phosphatase alcaline et la lipoprotéine lipase (LPL). Les expressions des gènes spécifiques sont visualisées après extraction de l'ARNm total des cellules, suivit d'une RT-Q-PCR. Les résultats obtenus seront détaillés et commentés dans le poster.

Activites d'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 1 d'hydrolysats de peaux de poisson.

Anis Labidi, Yesmine Ben Henda, Ingrid Fruitier et **Stéphanie BORDENAVE-JUCHEREAU**

*Laboratoire LIENSs, UMR CNRS 7266, Approches Moléculaires Environnement Santé
Site Marie Curie, UFR Sciences Technologies Santé
Université de La Rochelle F-17042.*

L'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 1 (ECA) constitue une voie de réduction de l'hypertension artérielle. Des peptides ont été identifiés comme inhibiteurs de cette enzyme et représentent une alternative intéressante aux inhibiteurs chimiques tels que le Captopril et l'Enalapril aux effets secondaires parfois marqués. Les coproduits de diverses industries (laitières, viande, produits de la mer...) sont une source non négligeable de protéines peu valorisées. L'hydrolyse enzymatique de ces protéines génère des produits aux propriétés fonctionnelles pouvant concerner le secteur de la santé et notamment des peptides inhibant l'ECA.

Dans le cadre du projet BIOTECMAR, nous avons hydrolysé de la peau de poissons plats par du Protamex® après solubilisation dans de l'acide acétique 0,1M en contrôlant ou non le pH de la réaction. Les peptides générés ont été caractérisés en termes d'inhibition de l'ECA au moyen de deux substrats différents.

Nos résultats montrent qu'une simple solubilisation des peaux dans l'acide acétique 0,1M suffit à libérer des molécules inhibant l'ECA mais qu'une hydrolyse est nécessaire pour augmenter cette activité. Les concentrations inhibant 50% de l'activité de l'enzyme varient de 1,32µg/ml à 350µg/ml en fonction du substrat utilisé et en fonction du temps d'hydrolyse.

Une comparaison commentée de ces valeurs sera présentée dans le poster et discutée à la lumière des derniers résultats en cours d'obtention.

Ces travaux ont été réalisés et financés dans le cadre du programme BIOTECMAR, contrat n° 2008-1/032 avec le soutien de l'Union Européenne et du programme « ERDF - Atlantic Area ».

Effect of in vitro simulated digestion on peptidic profiles and CGRP-like activity of fish protein hydrolysates (FPH)

Benoit CU DENNEC¹, Oscar MARTINEZ², Thibault CARADEC¹, Pascal DHULSTER¹ and Rozenn RAVALLEC¹

1 : ProBioGEM, IUT A, Polytech'Lille, Villeneuve d'Ascq, France.

2 : Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN, CSIC), Madrid, Spain.

The new European rules which prohibit all the rejections at sea will oblige the fishermen to store on the boat by-products and non-commercial species of fish. The enzymatic hydrolysis is for a long time a well-known upgrading way for the production of biologically active peptides. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) is a neuropeptide possessing a wide variety of physiological effects. One of the most important functions of CGRP is to regulate blood flow to various organs by its potent local vasodilatory actions. Last years, several studies have showed that fish by-products hydrolysates (FPH) could be a suitable source of CGRP-like molecules and have important applications in functional foods. However, their biological effects would be limited by the action of gastro-intestinal proteases. The aim of this study was to determine the effect of an in vitro simulated digestion on molecular weight profiles and CGRP-like peptides content of FPH.

FPH was produced by French SME from cooked heads of siki (*Centroscymnus coelolepis*). A two stage digestion simulating human gastric and intestinal phases was carried out. The chromatographic profiles (SEC-FPLC), the peptide concentration, and the immunoreactive CGRP-like molecules content of FPH, determined by radio-immunoassay (RIA), were followed during the gastro-intestinal digestive process.

Results showed that the digestive process did not highly affect the peptidic population and the biological activity of the FPH. According to this conclusion, the production and the commercial use of biological active peptides generated by the hydrolysis of by-products protein could be considered of great interest in the development of functional foods.

Supported by a grant from the PS DR Grand Ouest and by the European Community: Atlantic Area Programme BIOTECMAR n° 2008-1/032.

Activités antioxydante et inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I d'un lait de chamelle fermenté par une souche protéolytique de *Streptococcus thermophilus*

Jean-Michel GIRARDET - *UR AFPA, équipe Protéolyse et Biofonctionnalités des Protéines et des Peptides*

Le dromadaire (*Camelus dromedarius*) revêt une importance socio-économique essentielle dans de nombreuses régions arides et semi-arides du monde et le lait camelin est un composant important pour l'alimentation humaine dans ces régions. Il est, par exemple, plus riche que le lait bovin en vitamine C et en acides gras insaturés et, comme le lait humain, il ne contient pas de beta-lactoglobuline, protéine majeure du lait bovin connue pour son pouvoir allergisant important. Ce lait peut être consommé cru ou plus généralement fermenté (le kéfir). Lors de la fermentation, les protéines sont hydrolysées et libèrent des séquences peptidiques qui pourraient présenter des activités biologiques bénéfiques en terme de prévention pour la santé. La souche LMD-9 de *Streptococcus thermophilus*, la bactérie lactique la plus employée en industrie agro-alimentaire après *Lactococcus lactis*, possède une protéase de surface PrtS capable d'hydrolyser les caséines alphas1, alphas2 et beta du lait bovin et de libérer des peptides dont certains ont été identifiés comme possédant des activités antioxydante, antihypertensive, immunomodulante, antibactérienne et mitogénique. Nous avons utilisé cette souche afin de fermenter du lait de chamelle et d'isoler un hydrolysate peptidique généré par PrtS. Cet hydrolysate a été fractionné par ultrafiltration à un seuil de coupure de 10 kDa puis de 3 kDa et les fractions peptidiques obtenues ont été caractérisées par spectrométrie de masse. Deux activités biologiques ont été recherchées au sein de ces fractions : (i) l'activité antioxydante, qui a été testée en déterminant le pouvoir séquestrant du cation radicalaire de l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) ou ABTS et (ii) l'activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) qui a été testée en déterminant l'hydrolyse du substrat synthétique hippuryl-histidyl-leucine par chromatographie liquide à haute performance. Ce travail rapporte l'effet antiradicalaire ou inhibiteur de l'ECA des peptides générés dans le lait de chamelle fermenté par la souche LMD-9 et discute de l'efficacité de ces peptides en fonction de la distribution de leur taille moléculaire. La production d'un lait camelin fermenté présentant un bénéfice pour la santé est un enjeu important pour les populations des régions désertiques.

Inhibition de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine I par des peptides issus de protéines du lait bovin : Etude des interactions moléculaires par la technologie Biacore

Céline CAKIR-KIEFER - *Unité de Recherche « Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux », Equipe « Protéolyse et Biofon*

L'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine I (ECA ; EC 3.4.15.1) appartient au système rénine-angiotensine qui joue un rôle clé dans le maintien de la pression artérielle. En effet, l'ECA, une métalloprotéase à zinc à activité peptidyl dipeptidase qui possède deux sites actifs fonctionnels, catalyse la conversion de l'angiotensine I, un décapeptide inactif, en angiotensine II, un puissant vasoconstricteur. De plus, l'ECA catalyse la dégradation de la bradykinine, un vasodilatateur, en un peptide inactif. L'inhibition de cette enzyme est une des voies utilisées pour le traitement médical de l'hypertension artérielle malgré les nombreux effets secondaires décrits.

Les peptides antihypertenseurs issus de protéines alimentaires constituent un bon moyen de prévention puisqu'ils peuvent permettre de retarder l'apparition de l'hypertension artérielle, voire de réduire une hypertension artérielle modérée sans présenter aucun effet secondaire. Les nombreux peptides inhibiteurs de l'ECA issus de protéines alimentaires décrits dans la littérature présentent une très grande hétérogénéité de taille et de séquence, ce qui rend leur mode d'action difficile à comprendre.

Aucune relation structure-activité n'étant clairement établie, l'objectif de ce travail est de déterminer le type d'interaction de peptides inhibiteurs issus de protéines de lait bovin avec l'ECA et de mieux comprendre leur affinité pour l'enzyme en fonction de leur séquence. Ces peptides peuvent se fixer soit au niveau d'au moins un des sites actifs de l'ECA soit en dehors du site actif.

Pour cette étude, une approche expérimentale par résonance plasmonique de surface a été entreprise en utilisant la technologie Biacore. Un travail précédent effectué au laboratoire a permis d'isoler, à partir d'un hydrolysat trypsinique de caséine alphas₂ bovine, les peptides FALPQYLK et FALPQY dont les IC₅₀ sont de 4,3 μM (Tauzin et al., 2002). L'ECA recombinante humaine purifiée à homogénéité a été fixée sur une puce carboxyméthyl dextran (CM5).

L'accessibilité des sites actifs de l'enzyme a été vérifiée en utilisant le tripeptide VPP, le peptide inhibiteur sélectif pEGLPPRPKIPP (pE : pyroglutamyl) d'un des deux sites ainsi que le captopril. Les peptides sélectionnés ont ensuite été injectés et les constantes de vitesses d'association et de dissociation, ainsi que la stœchiométrie des interactions ont été mesurées.

L'étude a donc porté sur l'interaction de l'ECA avec les peptides FALPQYLK, FALPQY ainsi que leurs dérivés FALP, LPQY, LP et FALA qui nous ont permis d'étudier l'importance des extrémités C- et N-terminales, l'importance de la taille du peptide et de la présence d'un résidu prolyl au niveau de la séquence peptidique.

Hydrolyse pepsique de la caséine bovine : Obtention de peptides à activité antimicrobienne

Faiza ADOUI^b, Chataigne G.^a, Chihib N.^a, Dhulster P.^a, Zidoune M.N.^b, Nedjar-Arroume N.^a

a : Laboratoire ProBioGEM, Université Lille Nord de France, Polytech'Lille, Av. Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

b : Laboratoire de Nutrition et de Technologie Alimentaire (LNTA). Equipe : Transformation et Elaboration des Produits alimentaires (TEPA). Institut de la Nutrition de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (I.N.A.TA.A.), 25000 Constantine. Algérie

Mots-clés : caséine bovine, hydrolyse pepsique, peptides antimicrobiens.

Après plusieurs décennies d'emploi de molécules de synthèse divers problèmes de santé publiques se sont posés et ont incité les chercheurs à s'orienter vers l'étude des molécules d'origine naturelle. C'est ainsi que l'intérêt s'est porté sur les protéines alimentaires comme source de molécules bioactives. Parmi ces dernières figurent les peptides antimicrobiens qui vu leur action peuvent être utilisés dans différents domaines tels que l'industrie alimentaire, pharmaceutique, cosmétiques et autres. Pour l'obtention de ces molécules actives plusieurs protéines ont fait l'objet d'étude. Cependant se sont principalement l'hémoglobine, les protéines de l'œuf [3] et les protéines du lait qui ont suscités plus d'intérêt. Toutefois, ces études consistaient, principalement, à l'obtention, la purification et l'identification des peptides actifs. En effet, très peu d'études ont traités leur application.

Ainsi et dans le but de préparer des peptides antimicrobiens pour leur étude dans la conservation des aliments, nous avons étudié l'obtention de peptides actifs par hydrolyse pepsique de la caséine bovine. Plusieurs peptides actifs ont ainsi été séparés de l'hydrolysate pepsique très hétérogène par RP-HPLC et analysés en LC-MS et en MALDI-TOF. Les peptides obtenus sont issus principalement de la région C-terminale de la caséine α_2 . Toutefois des peptides issus de l'hydrolyse de la caséine α_1 ont également été identifiés. Les fractions collectées, renfermant ces peptides, ont montré une activité antimicrobienne contre quatre souches bactériennes comprenant les bactéries à Gram positif et à Gram négatif : E. coli, L. innocua, B. Subtilis et S. aureus.

Effet du serocolostrum, du lait et du lactosérum camelins et de leurs hydrolysats pepsiques sur la croissance de *Listeria innocua*

Zeineb JRAD¹, **Isabelle ADT**², Halima EL-HATMI¹, Samira ARROUM¹, Pascal DEGRAEVE², Coralie DUPAS-FARRUGIA², Touhami KHORCHANI¹, Nadia OULAHAL²

1 : Laboratoire d'Élevage et de Faune Sauvage, Institut des Régions Arides, Médenine, Tunisie

2 : Laboratoire de Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires (BioDyMIA), Equipe Mixte d'Accueil Université Lyon 1-ISARA Lyon n°3733, Bourg en Bresse, France

Le lait et le colostrum camelins diffèrent de leurs équivalents bovins notamment par leurs compositions en protéines sériques. Par exemple, la teneur en lactoferrine, protéine connue pour ses propriétés antimicrobiennes, est 30 à 100 fois plus importante chez les camélidés que chez les bovidés.

L'étude de l'effet antimicrobien de colostrum, lait et lactosérum camelins lyophilisés puis dissous dans du bouillon cœur cervelle à des concentrations entre 10 et 40 g/L vis-à-vis de différentes bactéries pathogènes ou apparentées – *Listeria innocua* –, a montré que le colostrum possède le potentiel antimicrobien le plus important. Ainsi, le suivi de culture semi-automatique par spectrophotométrie à 600 nm (sur 24 h) a permis d'observer une inhibition dose-dépendante de la croissance de *L. innocua* LRGIA 01 par le lait, le sérocolostrum et le lactosérum camelins. A 40 g/L, le sérocolostrum a provoqué une inhibition plus importante (50%) de la croissance de *L. innocua* LRGIA01 que le lactosérum (20 %) et surtout le lait (12%). Du fait de sa richesse en lactoferrine et du fort potentiel antimicrobien de cette protéine, une purification de cette dernière à partir du colostrum camelin a été entreprise afin de déterminer son potentiel anti *L. innocua* LRGIA01. Les premiers essais ont permis de montrer que la lactoferrine cameline purifiée est capable d'inhiber la croissance de cette bactérie à la concentration de 5 g/L. Des résultats similaires ont été obtenus avec de la lactoferrine bovine.

Des hydrolyses des lactoferrines cameline et bovine par de la pepsine (hydrolyses réalisées *in vitro* à 37°C et pH 2, rapport E/S : 3/100 (m/m), pendant 4h), ont ensuite été effectuées et l'activité anti-*Listeria innocua* des hydrolysats testée. Les deux hydrolysats obtenus présentent une activité anti-*Listeria innocua* à une concentration de 1 g/L soit à une concentration 5 fois plus faible que celle de leurs protéines natives respectives. Il a été montré que l'hydrolyse pepsique de la lactoferrine bovine génère notamment de la lactoferricine, un peptide cationique antimicrobien issu de l'extrémité N-terminale de la lactoferrine dont l'activité est supérieure à celle de la protéine dont il est issu. Une comparaison des extrémités N-terminales des lactoferrines bovine et cameline montre une certaine variabilité. A ce jour, les fragments peptidiques de la lactoferrine cameline responsables de l'activité anti-*Listeria innocua* des hydrolysats pepsiques restent à identifier afin de déterminer si leur activité peut être attribuée à une lactoferricine ou un autre peptide. Cela constitue le premier objectif des travaux en cours.

Le peptidome exocellulaire de *Lactococcus lactis* révèle une protéolyse de surface importante et suggère l'existence de phénomènes de communication cellulaire.

Alain Guillot¹, Mylène Boulay², Christophe Gitton², Véronique Monnet^{1,2} & **Vincent Juillard²**

(1) PAPPSO et (2) Peptides et Communication Bactérienne, UMR 1319 MICALIS, INRA, 78352 Jouy-en-Josas cedex.

La communication entre bactéries au sein d'une population est un phénomène général, mais encore largement méconnu. Chez les bactéries à Gram-positif, elle est le fait de peptides de communication produits par la bactérie. Ces séquences peptidiques ont deux origines : soit elles sont présentes au sein d'une séquence protéique bactérienne, soit elles sont le fruit de la transcription de courtes séquences codantes. Les peptides de communication doivent s'accumuler dans le milieu exocellulaire, sous forme mature et au-delà d'une concentration seuil, pour pouvoir être perçus par les bactéries environnantes et déclencher une réponse adaptative. Les peptides de communication connus aujourd'hui ont pour la plupart été identifiés par une approche spécifique, développée dans le cadre de l'étude de la réponse qu'ils conditionnent.

L'objectif de ce travail est d'identifier de façon la plus exhaustive possible le peptidome de *Lactococcus lactis*, c'est-à-dire l'ensemble des peptides s'accumulant dans le milieu de culture. Une attention particulière est portée aux peptides issus de l'hydrolyse de séquences spécifiant l'exportation d'une protéine comme aux peptides issus de la traduction de petits gènes, sources potentielle de peptides de communication.

Une première étape a consisté à ré-analyser la séquence du génome de la souche *L. lactis* IL1403 à l'aide du logiciel SHOW (<http://migale.jouy.inra.fr>), afin de prédire les séquences codantes de petite taille (180 bp ou moins), dont le nombre est largement sous-estimé dans les banques publiques. 385 séquences codant des peptides putatifs comprenant de 10 à 60 acides aminés (inclus) ont ainsi été prédites, soit 5 fois plus que ce qui l'était jusqu'à présent.

Pour caractériser le peptidome exocellulaire de *L. lactis* IL1403, une méthodologie spécifique a été développée : culture dans un milieu chimiquement défini initialement dépourvu de peptides jusqu'en fin de phase exponentielle de croissance ; isolement des peptides, enrichissement et double séparation chromatographique avec identification par spectrométrie de masse. De l'ordre de 2000 séquences peptidiques distinctes ont été identifiées, correspondant à environ 350 protéines différentes. Ces peptides proviennent pour l'essentiel (60%) de protéines de surface, ce qui révèle une activité protéolytique de surface intense. La construction de mutants d'enzyme protéolytiques est en cours pour en identifier les acteurs.

Parmi ces peptides figurent des fragments de séquences spécifiant l'exportation de 4 lipoprotéines (OptA, YvdF, YjgC et PmpA) et de 5 protéines secrétées (Usp45, YrbB, pi301, PspB et PotD). De l'ordre d'une dizaine de peptides issus de la traduction de petites séquences codantes ont également été identifiés, dont plus de la moitié ne figurent pas dans les banques de données. Certaines de ces séquences codantes sont localisées à proximité immédiate d'un régulateur transcriptionnel. Cela pourrait suggérer une implication de ces petits peptides dans des mécanismes de communication cellulaire, hypothèse qui est actuellement à l'étude.

L'hydrolyse enzymatique du lactosérum bovin sous micro-ondes diminue l'allergénicité de la BLG chez le modèle animal d'allergie.

Kamel-Eddine EL MECHERFI - UNIVERSITE D'ORAN ALGERIE

Les allergies représentent un véritable problème de santé publique. Le traitement de cette affection repose sur un régime d'éviction des protéines du lait de vache et l'administration de préparations adaptées et représentées par des hydrolysats de protéines lactées ou autres (riz, collagène). Cependant, aucun de ces hydrolysats n'évite la présence de protéines intactes et une activité antigénique résiduelle persiste toujours.

Le but de ce travail est d'évaluer l'impact d'un traitement technologique par les micro-ondes combiné à une hydrolyse enzymatique par les enzymes digestives (trypsine/chymotrypsine et la pepsine) de la b-lactoglobuline (BLG) et a-lactalbumine (ALA) bovines, sur leur allergénicité chez la souris BALB/c par exploration de leur immunoréactivité contre les IgE humaines d'enfants allergiques aux PLV.

Les différents effets des micro-ondes sur l'hydrolyse enzymatique trypsique et chymotrypsique des deux allergènes majeurs du lait, et sur leur immunoréactivité contre les IgE anti-BLG et anti-ALA, ainsi que l'existence d'une éventuelle anaphylaxie locale après stimulation des fragments intestinaux de la souris BALB/c montés en chambre de Ussing avec les différents hydrolysats produits sous micro ondes ont été étudiés.

Les résultats obtenus montrent que les micro-ondes accélèrent les réactions enzymatiques des deux protéines de lactosérums bovins en obtenant des taux d'hydrolyse des protéines plus élevés par rapport à ceux obtenus sous chauffage conventionnel. La b-lactoglobuline généralement résistante à l'hydrolyse pepsique a été hydrolysée au bout de 3 minutes sous micro-ondes à 200W Watts à hauteur de 42%, alors qu'elle est restée très résistante à cette même hydrolyse dans les conditions de chauffage conventionnel.

Les résultats de l'immunoréactivité des hydrolysats du lactosérum contre les IgE humaines évaluée par test-ELISA compétitif ont montrés que les hydrolysats de lactosérum obtenus sous micro-ondes à 200 Watts avec de la pepsine présentaient une très faible reconnaissance par les IgE anti-BLG et anti-ALA comparés à ceux de l'hydrolyse conventionnelle. En chambre de Ussing, la stimulation avec les hydrolysats de BLG obtenus sous micro-ondes ne produisait pas d'augmentation du courant de court circuit (Isc) comparés aux hydrolysats obtenus dans les conditions conventionnelles. Par contre, les hydrolysats de l'a-la produits sous micro ondes ou dans les conditions conventionnelles stimulent significativement ($p < 0,001$) l'Isc qui traduit une présence d'anaphylaxie locale.

Les résultats obtenus sur l'hydrolyse enzymatiques menée sous micro-ondes sont très encourageants et intéressants rendant compte sur la possibilité d'utilisation des micro-ondes comme traitement physique pour déstabiliser les protéines alimentaires les plus résistantes à la digestion enzymatique et sa capacité à diminuer leur allergénicité

Intervenants

Laurent BAZINET

Le Dr Laurent BAZINET a étudié en agro-alimentaire à l'École Supérieure d'Agriculture D'Angers (France) où il a obtenu en 1993 son diplôme d'ingénieur en agriculture. Il a continué ses études universitaires à l'Université Laval (Québec, Québec) où il a obtenu un Master's (1994) et un Ph. D. (2000) en sciences et technologies des aliments. Depuis juillet 2002, il est professeur au département des sciences des aliments et de nutrition de l'Université Laval où il enseigne le génie des procédés et la transformation alimentaire. Il est un membre actif de l'Institut des Nutraceutiques et des Aliments Fonctionnels (INAF) et du Centre de Recherche en Sciences et Technologies du Lait (STELA). Ses intérêts de recherche portent sur l'étude des phénomènes électrodialytiques et leurs impacts sur les composés bio-alimentaires. En 15 ans de carrière, il a déjà publié plus de 100 articles scientifiques dans des revues internationales et donné plus de 170 communications scientifiques.

Grégoire BERTHE

Directeur général du Pôle de Compétitivité Céréales Vallée, dont la mission est de développer des projets partenariaux innovants dans les céréales en production agricole durable, nutrition humaine, alimentation animale et agromatériaux. Ingénieur agronome "Institut National Agronomique Paris" et diplômé de l'executive MBA"CPA" d'HECAvant d'être à la direction de Céréales Vallée, j'ai occupé différents postes dans le Groupe Limagrain : directeur de la recherche monde (espèces de grandes cultures) puis directeur general d'un réseau de sociétés commercialisant des semences en Europe puis en Amérique du Nord. J'ai ensuite été directeur scientifique et directeur des relations institutionnelles du Groupe Limagrain. J'ai eu différentes missions électives interprofessionnelles dans le domaine des semences en France, en Europe et à l'international.

Jean-Pascal BERGÉ

Responsable de la thématique Valorisation des co-produits Jean-Pascal Bergé est titulaire d'une maîtrise d'océanographie biologique (1990), d'un DEA en biologie et agronomie (1991), d'un doctorat en biochimie marine (1996) et d'une habilitation à diriger les recherches en biochimie (2002). Jean-Pascal Bergé a travaillé pour le compte de l'IRD (Nouméa), de l'École Normale Supérieure (Paris), pour les Laboratoires Sciences et Mer (Brest) et pour l'IFREMER (Nantes). Il a commencé sa carrière dans le domaine de la biotechnologie des microorganismes (microalgues et bactéries marines) en recherchant notamment des composés bioactifs pour les domaines de la santé et de la nutrition. Il s'est ensuite spécialisé dans l'analyse des lipides d'origine marine en contribuant à la mise et au point et au développement de techniques analytiques. Par la suite il s'est orienté vers la bioconversion de la biomasse marine en produits d'intérêt. Depuis 2002, il anime au sein de l'institut la thématique « co-produits » qui vise à rechercher les voies de valorisation biotechnologiques de ces biomasses marines peu ou pas exploitées. Il a participé à plusieurs programmes Européens dans le domaine (5ème, 6ème PCRD, Interreg, Life) et a noué de nombreuses relations avec plusieurs centres de recherche européens dans le domaine. Sur le thème de la valorisation biotechnologique il a fédéré plusieurs partenaires Français de la façade Atlantique au sein du groupement de recherche SEAprO (Sustainable Exploitation of Aquatic PRoducts, www.seapro.fr); groupement qu'il anime depuis le début de l'année 2007. Il est également le représentant national pour le WEFTA (West European Fish Technologist Association) En tant qu'enseignant, il donne des cours en biotechnologie marine en Licence Pro (UBS), Master 1 (UBO, Rennes) et Master 2 (UN). A ce jour il a publié plus de 25 publications internationales, 2 chapitres de livre. Il est rédacteur en chef d'un livre sur la thématique de valorisation des déchets des pêcheries et est co-inventeur de 2 brevets. Il a également donné plus de 23 conférences dans des congrès internationaux.

Stéphanie BORDENAVE-JUCHEREAU

Stéphanie Bordenave-Juchereau est Maître de Conférences à l'Université de La Rochelle, Département de Biotechnologies depuis 2001. Ses enseignements couvrent les niveaux L1 à M2 et portent principalement sur la biochimie structurale des protéines et leurs propriétés fonctionnelles. Après son doctorat, soutenu en 2000 sur l'hydrolyse différentielle des protéines de lactosérum en réacteur à ultrafiltration et la génération de peptides biologiquement actifs, elle a dirigé deux thèses sur les voies de génération de cryptides, peptides bioactifs dont la séquence est cachée au cœur des protéines, capables de réguler des dysfonctionnements comme l'hypertension artérielle, le diabète ou la surcharge pondérale. Le substrat étudié était le lactosérum et le moyen d'obtenir ces molécules était l'utilisation de protéases d'écosystèmes microbiens laitiers à travers la fermentation. Les cibles physiologiques multiples de ces cryptides ont été étudiées depuis l'in vitro, le tissu adipeux, jusqu'à un organisme entier, le rat. Les faisceaux d'indices obtenus par ces travaux ont conforté la

thématique « cryptides-dysfonctionnements métaboliques » de l'équipe AMES (Approches Moléculaire, Environnement, Santé) du laboratoire LIENSs (Littoral, ENvironnement et Sociétés, UMR CNRS 7266). Habilitée à diriger des recherches en 2009, S. Bordenave-Juchereau poursuit ses travaux sur la valorisation des coproduits protéiques et s'intéresse aux protéines issues de la filière pêche. Elle dirige notamment la thèse de Yesmine Ben Henda portant sur le rôle physiologique de peptides et la différenciation adipocytaire. Puisqu'un lien entre hypertension et obésité existe, les peptides étudiés sont des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 1, identifiés et purifiés à partir de coproduits marins. Les techniques de biologie moléculaire et de protéomique sont mises en œuvre pour évaluer l'impact de ces peptides sur l'homéostasie de la cellule maitresse de l'obésité et de son corolaire de pathologies associées : l'adipocyte.

Leslie BOUDESOCQUE

Pharmacien diplômée de l'Université de Reims Champagne Ardenne, Leslie Boudesocque a soutenu une thèse de doctorat en 2010, portant sur la purification de peptides bioactifs et le développement de méthodologies par Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC). Après un stage post-doctoral au sein de la société Lonza (Viège, Suisse), elle est actuellement Maître de Conférences à l'Université François Rabelais de Tours. Elle est rattachée à l'équipe Recherche et Innovations en Chimie Médicinale, de l'UMR INRA 1282 Infectiologie et Santé Publique. Ses thématiques de recherche sont axées sur le développement de nouvelles méthodologies en chromatographie, notamment la CPC, pour la recherche d'agents anti-infectieux.

Joseph BOUDRANT

Dr J. Boudrant, Directeur de recherche émérite au CNRS, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (UPR 3349 CNRS), INPL-ENSAIA, Nancy. Joseph Boudrant est Ingénieur diplômé d'Agro-Paris-Tech-ENSIA (1969) et Docteur es Sciences Physiques (Université de Montpellier, 1976). De 1976 à 1978 il a été associé de recherche en génie biochimique au Massachusetts Institute of Technology (Cambridge, Etats-Unis). Il a ensuite été ingénieur de recherche et développement chez Rhône-Poulenc (Vitry-sur-Seine, procédés de fermentation). Puis il a rejoint la Compagnie Ajinomoto (joint venture avec Lafarge) en tant que responsable d'un procédé industriel de fermentation de production d'un acide aminé. Nommé Directeur de recherche au CNRS en 1986, il a travaillé sur des bioprocédés mettant en oeuvre des cellules recombinées. Il est l'auteur d'environ 120 publications et de 140 communications. Il a déposé plusieurs brevets et a co-édité 20 livres. Parallèlement il a été animateur du groupe de travail « Génie Biochimique et Alimentaire » de la Société Française de Génie des Procédés (de 1987 à 2009), et en est Délégué général adjoint (depuis 2010). Il a été membre du conseil d'administration de l'Association Française des Ingénieurs et techniciens de l'environnement (AFITE). Il a coordonné le réseau de chercheurs en Génie des Procédés Appliqué à l'Agro-Alimentaire de l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF, 2001-2007). Il a été délégué pour la France à l'International Association for Engineering and Food (IAEF) et expert dans des instances européennes (INTAS, CRAFT). Il a participé à plusieurs programmes européens. Il est Editeur en chef de la revue internationale «Process Biochemistry» (Elsevier, facteur d'impact 2, 648) et membre du comité de rédaction de la revue «Industries Alimentaires et Agricoles». De plus il est conseiller éditorial de volume « Bioprocédés » édité par la maison d'édition « Les Techniques de l'Ingénieur ». Il a été président du Comité d'Organisation d'un Congrès de Génie des Procédés (2001, 550 personnes) et a co-organisé un nombre significatif de colloques dont des internationaux.

Jean-François BOUSSARD

Depuis avril 2010, Jean-François Boussard est Président de Biocitech, parc technologique dédié aux sciences de la vie situé à Romainville. En 1998, après 6 années au poste de Directeur des Brevets, Licence et Juridique d'une holding financière, il fonde Substrat, société de conseil en création d'entreprises et accompagnement de projets spécialisée dans les biotechnologies. Antérieurement, il a été Chargé d'affaires pour la pharmacie et les biotechnologies à l'ANVAR entre 1982 et 1988. De 1979 à 1982, il a été biologiste au L. E. R. S Synthelabo après avoir été chargé de recherche à l'Université de Metz où il a soutenu sa thèse en Ecotoxicologie.

Pascal DHULSTER

Professeur des Universités IUT A

Cursus universitaire : 1976 Diplôme Universitaire de Technologie (DUT) Option Industrie Alimentaire IUT Créteil •1980 Diplôme d'Ingénieur Génie Biologique Université de Technologie de Compiègne (U. T. C.) 1981 DEA (UTC), microbiologie, technologie enzymatique, bioconversion. 1984 Diplôme de Docteur Ingénieur (U. T. C.) 1994 Habilitation à Diriger des Recherches en Sciences Naturelles (USTL) Parcours professionnel : 1984-1986: Ingénieur de recherche, UTC- GRADIENT 1986-1989: Assistant associé en GIA, IUT A Lille1 1989-1995 : Maître de conférences en GIA, IUT A Lille1 1995-2011 : Professeur en GIA, IUT A Lille1 2008-2011 : Directeur Laboratoire ProBioGEM (EA 1026) Activités de recherche, programme et encadrement :L'objectif de ces

recherches est de développer dans le laboratoire une recherche en bioprocédé basée sur des approches micro-cinétique et macro-cinétique. La micro-cinétique permettra d'étudier le comportement des catalyseurs biologiques (enzymes, bactéries ou cellules) lors de leurs mises en œuvre en bioréacteurs. Cette approche permettra de concevoir de nouveaux bioprocédés et de modéliser les termes de réactions. Dans le cadre de la macro-cinétique on pourra s'intéresser à l'optimisation et à la maîtrise des bioprocédés qui sont toujours fort complexes, même si par moment ils semblent bien simples. Ainsi les concepts d'intensification de procédé amènent-ils à imaginer des couplages d'opérations originaux ou des modes opératoires nouveaux, où les transferts de quantité de mouvement sont associés aux transferts de matière, les bioréactions associées à des techniques séparatives pour améliorer la productivité et la sélectivité. Notre action porte plus spécifiquement sur le couplage de procédés bio catalytiques et à des techniques séparatives à membrane, avec l'objectif de développer une recherche amont sur le concept de couplage de procédés en étudiant spécifiquement : L'amélioration de la productivité et de la sélectivité d'obtention de peptides à activités ou propriétés physico-chimiques définies par couplage de procédés séparatifs à des bioréacteurs (réacteurs enzymatiques et fermenteurs à membranes). En ce qui concerne le couplage de réacteurs enzymatiques à des techniques séparatives nous cherchons à développer le concept de membrane contacteur en extraction liquide- liquide et d'électro-ultrafiltration à la séparation sélective des peptides. Nous cherchons d'autre part à développer un bioréacteur à membrane pour la production de lipopeptides (surfactine) par *Bacillus subtilis* : Modification qualitative et quantitative de la production de bio molécules par couplage d'une extraction continue à une fermentation à haute densité cellulaire. Ces recherches s'inscrivent dans le champ plus large de la valorisation de sources de protéines alimentaires (cruor porcine, concentré protéique de luzerne) par hydrolyse enzymatique contrôlée en réacteur à membrane : Conception, mise en œuvre, optimisation de procédés d'obtention d'hydrolysats peptidiques parfaitement définis à l'échelle pilote de 100 litres. Mise en évidence de propriétés d'usage des hydrolysats. Production scientifique et encadrement 50 articles dans des journaux internationaux à comité de lecture, 62 communications orales et par affiches, nationales et internationales. Directions et codirections de thèse : 16

Charles DELANNOY

La société Procidys est une société de conseil et d'études en agro-alimentaire et plus particulièrement dans le domaine des produits marins. Charles DELANNOY en est le dirigeant. Il est ingénieur chimiste est a une expérience de 32 ans dans le domaine des procédés agro-alimentaires. - Expérience de quelques années dans la production d'acides aminés par fermentation dans le groupe Ajinomoto (responsable de recherche et responsable de production). - Expérience de 23 ans dans la valorisation des co produits de poisson comme directeur technique et directeur de recherche. Mise au point et transfert industriel de la plupart des produits fabriqués par une société spécialisée dans la valorisation des co produits de poisson et qui produit et commercialise des ingrédients marins pour l'alimentation animale, l'alimentation humaine, la nutraceutique et la cosmétique. - Gestion de projets d'investissements importants et en particulier participation à la création d'une unité de production de protéines hydrolysées de poisson au Canada. - Développement de procédés de production d'extraits végétaux à partir de différentes matières premières (soja, pomme de terre, blé, pois, lupin, mélasse de betterave etc?)- Participation à de nombreux programmes internationaux de recherche dans le domaine des produits marins. Dépôt de 2 brevets et participation à de nombreuses publications scientifiques.

Vincent DELATOUR

Vincent DELATOUR est un chercheur en métrologie biomédicale spécialisé dans le domaine des biomarqueurs. Ingénieur biochimiste de formation, il a effectué sa thèse au CNRS de Gif sur Yvette dans un laboratoire labellisé par la ligue contre le cancer. Depuis 2008, il a orienté sa carrière vers le diagnostic in vitro en rejoignant le LNE (Laboratoire National de métrologie et d'Essais) où il est en charge des activités de R&D dans le domaine biomédical. A l'interface de la chimie analytique, du contrôle qualité en biologie clinique et de la métrologie, ses travaux ont pour vocation d'évaluer et améliorer la comparabilité des analyses de biologie médicale. En lien avec les autorités de santé publique (DGS, AFSSAPS, HAS, ...), les industriels du diagnostic in vitro et les cliniciens des domaines concernés, sa mission consiste à identifier les biomarqueurs pour lesquels un apport métrologique constitue une réelle valeur ajoutée puis développer des méthodes de référence et produire des matériaux de référence certifiés. Vincent DELATOUR est expert pour l'HAS et représente la France au Bioanalysis Working Group du CCQM, qui a pour but de coordonner les activités des différents laboratoire nationaux de métrologie dans le monde et développer des synergies pour maximiser l'impact des études réalisés dans le domaine de la santé.

Vincent FOURNIER

Dr. Vincent Fournier is a fish nutrition researcher with 15 years of experience and a strong expertise in protein hydrolysis processes. Graduated in biochemistry, oceanology and aquaculture, he worked as a researcher at the French fish nutrition laboratory of IFREMER, where he obtained his PhD in fish nutrition, focusing on dietary fish meal substitution, under the mentoring of the French INRA research institute. In 2003, he joined the French food ingredients group SPF-Diana to head the R&D Department of its aquaculture division Aquativ. In this position, he has been responsible for the development of functional hydrolysates targeting the aquaculture market. He is also heading studies on product performance evaluation in fish and shrimp and product characterization in collaboration with several universities. He has authored or co-authored several scientific publications and is regularly conducting lectures in international conferences.

Renato FROIDEVEAUX

Rénato Froidevaux est titulaire d'un DEA en Génie Enzymatique Bioconversion et Microbiologie (1998), d'un doctorat en Biochimie (2001) et d'une habilitation à diriger les recherches en biochimie (2008). Rénato Froidevaux a travaillé dans le Laboratoire de Technologie des Substances Naturelles (LTSN) qui est aujourd'hui appelé Laboratoire de Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien (ProBioGEM). Il a commencé ses travaux de recherche sur l'hydrolyse enzymatique de protéines agro-alimentaires par des enzymes digestives dans des environnements plus ou moins destructurants vis-à-vis de la protéine substrat (milieux dénaturants, hydro-alcooliques ou biphasiques liquide-liquide) dans le but de déterminer les cinétiques d'obtention de peptides possédant des activités biologiques. Il a également travaillé sur la mise en œuvre de technologies extractives innovantes de peptides bioactifs, telles que l'extraction liquide-liquide assistée par paires d'ions ou l'extraction liquide-gaz (technologie de moussage-drainage). Enfin, des procédés intégrés, combinant la protéolyse enzymatique de protéines avec des enzymes immobilisées en réacteur ouvert et l'extraction de peptides bioactifs, ont été mis en œuvre avec succès pour la préparation de peptides opioïdes et antimicrobiens. Depuis 3 ans, il travaille sur la mise en œuvre d'enzymes libres et immobilisées dans des réacteurs microfluidiques couplés à des systèmes de séparation pour l'obtention de peptides bioactifs. En tant qu'enseignant, il donne des cours en biochimie, biochimie alimentaire et génie enzymatique en Licence QEPI, Master HSQE et Master TVIA de l'université Lill1. Il est responsable du Parcours QEPI, comprenant la L3 QEPI et le Master HSQE. Il est également responsable d'un Master Recherche Franco-Roumain double diplôme avec l'université Al. I. Cuza de Iasi. A ce jour, il a publié 16 publications internationales et plus de 30 communications (conférences, posters) dans des congrès nationaux et internationaux.

Jean-Luc GARRIGUE

Jean-Luc Garrigue is both a Medical Doctor (allergist) and holds a PhD in Human Biology (Immunology). Registered as EUROTOX Toxicologist, he belongs to the Pool of Experts appointed by the European Commission as Scientific Advisors on Risk Assessment. He has 20 years of experience in regulatory toxicology, notably in the cosmetic industry working as a Senior Toxicologist at L'OREAL. After 4 years as Head of Regulatory Affairs in a French Biotech, he is currently appointed Director Scientific Affairs Europe at BIOAGRI, the biggest Brazilian private CRO, part of the Mérieux NutriSciences Company, where he is in charge of conducting regulatory toxicological studies for the big industrial actors of chemical, agrochemical, food and pharma industries all over the world.

Claire GAUDICHON

Claire Gaudichon est professeure de Nutrition Humaine à AgroParisTech où elle exerce en tant qu'enseignant chercheur. Elle y enseigne différentes thématiques, allant de la physiologie et biologie de la nutrition aux débouchés agro-industriels des aliments à bénéfique sur la santé. Elle est responsable de la spécialité de master « Nutrition et Santé » du master STVE d'AgroParisTech. Ses thèmes de recherche sont la digestion des protéines, le métabolisme protéino-énergétique, les régimes hyperprotéiques, la qualité de l'apport protéique. Elle a conduit de nombreuses études chez l'Homme et travaille aussi sur modèle rongeur, avec pour voie d'approche privilégiée la détermination des flux digestifs métaboliques.

Bruno GEHIN

Ingénieur INA Paris-Grignon spécialisé en Agroalimentaire (ISAA à Massy) + MBA (IAE Paris), il a acquis 25 ans d'expérience dans l'agro industrie, d'abord dans l'industrie de la nutrition animale au sein du groupe SANDERS puis en intégrant le groupe international amidonnier ROQUETTE en 1992. Il a conduit les développements en Nutrition animale puis en ingrédients alimentaires dans les applications Viande, boulangerie, snacks, céréales et Nutrition dans le monde entier. Il a ensuite lancé et développé les ventes des nouvelles protéines de pois de

l'entreprise, extraites en Picardie entre 2006 et 2010. Il a rejoint la direction du développement stratégique pour me focaliser sur les protéines végétales, il pilote également le nouveau programme d'innovation du groupe Roquette dans ce domaine.

Fabienne GUERARD

Fabienne GUERARD est professeur de Génie enzymatique et de Biochimie alimentaire et industrielle en master « Innovation en industries alimentaires » à l'Université de Bretagne Occidentale. Titulaire d'un doctorat en océanographie biologique de l'UBO, ses thématiques de recherche en biotechnologies marines se situent à l'interface de la biochimie appliquée et du génie des procédés, et portent notamment sur (i) le contrôle de protéolyses ménagées ciblées vers l'obtention de peptides actifs et (ii) l'étude des effets de la glycation non enzymatique (ou réaction de Maillard) sur la capacité anti-oxydante d'hydrolysats protéiques. Sa démarche scientifique repose sur une double approche : une approche fondamentale dont l'objectif est l'identification des mécanismes ou des paramètres contrôlant les performances des procédés, associée à une approche expérimentale, avec la mise au point de méthodes et le développement de procédés biotechnologiques. Affectée en septembre 2008 au Laboratoire des sciences de l'environnement marin (LEMAR) au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer à Plouzané, elle est directrice adjointe de l'unité de recherche LEMAR UMR6539 CNRS/UBO/IRD/IFREMER depuis le 1er janvier 2012. Le laboratoire est composé de 178 personnes (65 Enseignants-chercheurs et chercheurs, 47 Ingénieurs et techniciens, 46 doctorants & post-doctorants et 20 contractuels). Depuis 1997, elle a participé à l'encadrement de plus de 20 programmes de recherche dont 6 programmes européens (6ème PCRD, INTERREG IIIB et IVB) et a coordonné le projet européen BIOTECMAR (INTERREG IV B EA www.biotechmar.eu, 2009-2012) qui vise à conforter un Réseau Européen de Compétences pour exploiter, par voie biotechnologique, les ressources marines pour des applications en nutrition humaine et animale, en agro-alimentaire et en cosmétique. Elle est actuellement partenaire du projet MARMED INTERREG IVB : "Development of innovating biomedical products from marine resources valorisation". Par ailleurs, Fabienne Guérard a exercé de nombreuses fonctions administratives (direction adjointe puis direction de l'IUP Innovation en industries alimentaires de Quimper, de 1995 à 2004), et a été membre élu de divers conseils centraux de l'UBO. Elle a organisé de nombreux séminaires dédiés aux biotechnologies marines en France, et participé à des événements similaires en Norvège, en Irlande, en Espagne et au Portugal. Elle est membre de plusieurs réseaux en France et à l'étranger, issus des projets européens auxquels elle a participé (SEAFOODplus, SEApr, BIOCHIMAR, ...). En partenariat avec des industriels, elle a monté et dirigé des projets dédiés au transfert d'innovation, qui ont reçu le soutien de la Région Bretagne et d'OSEO. Elle a publié une soixantaine d'articles/chapitres d'ouvrages/contributions à des actes de colloques et contribué à plus de 100 communications orales et affichées dans des congrès nationaux et internationaux. Fabienne GUERARD a créé et dirigera une nouvelle spécialité de M2 intitulée "VALorisations BIOTEchnologiques des RESSources Marines - VALBIOREM" au sein de la mention "Sciences Biologiques Marines SBM", du master Sciences de la Mer et du Littoral, à Brest. La mention VALBIOREM ouvrira en septembre 2012.

David GUERRAND

David Guerrand a obtenu son doctorat de biochimie à l'Université de Caen en 1997, ses recherches portant sur la caractérisation et la purification d'enzymes des voies de synthèse de polysaccharides des graminées. Parallèlement à ses travaux de recherche fondamentale, David a collaboré à des projets de recherche appliquée avec un producteur d'enzymes basé près de Caen (Lyven). Pendant les dix années qui ont suivi l'obtention de son doctorat, David Guerrand a occupé différentes fonctions techniques dans le secteur de l'œnologie où il a contribué au développement de formulations enzymatiques, notamment pour renforcer l'extraction de la couleur des vins rouges. Depuis 1998, David a rejoint le groupe néerlandais DSM où il est aujourd'hui responsable du développement technique de l'application des enzymes pour les secteurs « food & beverage », couvrant la brasserie, la transformation des fruits, et bien sûr la valorisation des protéines animales et végétales. Son équipe comprend sept experts basés en Europe et aux Etats-Unis.

Thomas HAERTLÉ

Prof Dr Thomas HAERTLÉ, Directeur de Recherches à l'Institut National de la Recherche Agronomique, Nantes. MSc (Biochemistry) cum laude, mai 1972, Université A. Mickiewicz, Poznan, Pologne. Ph. D. (Biochimie) - janvier 1976, Université A. Mickiewicz, Poznan, Pologne. « Habilitation à Diriger la Recherche » octobre 2001, Université Bordeaux II. Professeur de Sciences Biologiques, octobre 2001, Varsovie, Pologne. Honorary Research Fellow de Hannah Research Institute, 1993, Ayr, Grande Bretagne. Doctorat honoris causa d'Académie de Sciences de Russie, avril 2007, Kazan, Russie. Doctorat honoris causa d'Université de Sofia octobre 2007, Sofia, Bulgarie. A INRA depuis 1988, Responsable Scientifique du Groupe Protéines et des projets: «Outils protéolytiques d'origine hyperthermophile», «Protéines impliquées dans la perception des goûts sucré et amer

», « Etude des interactions des ligands aromatiques et hydrophobes avec la β -lactoglobuline et des peptides modèles. » Biologie moléculaire. Ingénierie des protéines. Chimie des protéines et des peptides. Allergies aux protéines laitières et possibilités de leurs réductions par les traitements physico-chimiques et technologiques. 1986 - 1987: The Scripps Research Institute, Department of Basic and Clinical Research, San Diego, CA. USA. 1984-1986: The Salk Institute for Biological Studies, San Diego, CA, USA 1982-1984: Département de Biophysique, Ecole Polytechnique, Palaiseau 1976-1978: Département de Biochimie, Centre d'Energie Atomique, Saclay. 1972 - 1987: Université A. Mickiewicz, Poznan, Pologne. Biochimie, physico-chimie des protéines et acides nucléiques. Auteur de plus de 250 publications, 150 communications, 90 conférences. 5 brevets, plusieurs expertises. Expert à l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire à European Food Safety Agency.

Romain KAPEL

Romain KAPEL est titulaire d'un doctorat en génie des bio-procédés (obtenu en 2005) à l'université de Lille 1 au laboratoire ProBioGEM. Ses activités de recherches sont actuellement réalisées au Laboratoire Réaction et Génie des Procédés (LRGP, UMR CNRS 7274), dans l'équipe Bioprocédés-Biomolécules. Celles-ci sont centrées sur le développement de méthodologies génériques d'étude visant à améliorer la maîtrise des opérations unitaires impliquées dans la valorisation de protéines issues d'agro-ressources d'origine végétale (extraction solide/liquide, protéolyse enzymatique et procédés de séparations appliquées à l'enrichissement d'hydrolysats en peptides bioactifs cibles). Il est directeur des études 2A à l'IUT de Nancy-Brabois au département de Génie Chimique-Génie des Procédés et responsable des enseignements de biochimie et réacteurs biologiques.

Pedro LAMEIRAS

Après l'obtention en 2000 de mon titre d'Ingénieur Maître à l'IUP de Chimie-Biologie de la Faculté des Sciences de Nantes, j'ai eu l'opportunité en 2001 de suivre le DESS d'Instrumentation et Méthodes Physico-Chimiques d'Analyse de la Faculté des Sciences d'Orsay. Dans le cadre de cette formation, j'ai réalisé un stage de six mois au sein du laboratoire de recherche RMN Haute Résolution de la société Sanofi-Synthelabo à Montpellier. Par la suite, j'ai intégré la société Bruker en tant qu'Ingénieur d'Application Minispec (RMN Basse Résolution) de 2001 à 2002. Je suis ensuite devenu Ingénieur d'Etudes au CNRS de 2003 à 2009 au sein de l'UMR 6014 CNRS de l'Université de Rouen. Au cours de cette période, je suis devenu Docteur en Chimie de l'Université de Rouen en 2008, mon sujet de thèse était « L'Étude de la Relation Structure-Activité de Peptides μ -Opioides par RMN, Modélisation Moléculaire et Docking : Endomorphine-2/Morphiceptine et leurs analogues » Puis, j'ai obtenu un poste de Maître de Conférences au sein de l'Université de Reims de 2009 à 2011. A ce jour depuis 2011, j'ai réintégré la société Bruker en tant qu'Ingénieur Commercial RMN.

Danielle LANDO

Danielle Lando est titulaire d'un doctorat d'état obtenu à l'Institut Pasteur pour la recherche en virologie. Elle a effectué sa carrière dans l'industrie pharmaceutique où elle a exercé des fonctions de chercheur en pharmacologie cellulaire et moléculaire avant de prendre la responsabilité des biotechnologies au sein de Roussel Uclaf devenu Aventis. Elle a œuvré pour des rapprochements entre son entreprise et le secteur académique en soutenant des projets collaboratifs. Elle a été membre nommé au Comité National du CNRS de 1995 à 2000. Depuis 2001, elle exerce des activités scientifiques bénévoles au sein d'Adebiotech et est actuellement vice Présidente d'Adebiotech.

Yves LE ROUX

Ingénieur de l'ENSAIA (1992) - Doctorat à l'Institut National Polytechnique de Lorraine (1994) - Professeur à l'Université de Lorraine Mes recherches réalisées au laboratoire l'URAFPA (Unité de Recherche sur l'Animal et la Fonctionnalité des Produits Animaux de l'Université de Lorraine) s'inscrivent dans la thématique de la fonctionnalité de l'aliment. Elles ont comme objectif de contribuer à la meilleure connaissance des mécanismes par lesquels un aliment fonctionnel agit sur les fonctions physiologiques de l'Homme. Dans ce contexte, mon projet se focalise sur la biodisponibilité des peptides à activité biologique. A partir de peptides modèles à activité anxiolytique démontrée chez l'homme, nous tentons de comprendre les différentes étapes permettant à ces peptides de franchir, en conservant une activité biologique, les différentes barrières physiques (intestin, barrière hémato-encéphalique notamment) et enzymatique. La compréhension de ces mécanismes devrait nous permettre de proposer des stratégies pour améliorer la biodisponibilité de ces peptides. J'enseigne à l'ENSAIA (Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires) Production scientifique : 27 publications internationales, 3 brevets, 8 co-encadrements de thèse.

Karl LINTNER

1967-1973 : Diplôme d'Ingénieur Chimiste : 1973 : Université Polytechnique de Vienne (Autriche)1974-1975 : Doctorat en Biochimie sur Travaux de Recherche sur les peptides bioactifs au Centre de Recherche Nucléaire, Saclay, FranceExpérience Professionnelle :1976 - 1983 : Chercheur au « Commissariat à l'Énergie Atomique »(CEN Saclay) (>30 publications en biochimie et biophysique)1983-1989 : Recherché appliqué et Marketing chez HENKEL, Düsseldorf, Allemagne, 1990- 1996 : Directeur Technique SEDERMA1997- 2007 : Directeur Général SEDERMA2007- 2010 : Conseiller Technique de la Division Entreprise Technology (CRODA)2010-présent : Président de KAL'IDEES, Consultant indépendant ; Professeur Associé à l'Université de VersaillesActivités associatives :Membre du Conseil Scientifique de Cosmetic ValleyMembre de la SFC (France) et DGK (All) et de la SCC (US)Ancien membre de la Commission de Cosmétologie

André MARETTE

André Marette, PhD, est titulaire de la Chaire de Recherche Pfizer/IRSC sur la pathogénèse de la résistance à l'insuline et des maladies cardiovasculairesIl est Directeur, Equipe de Recherche sur les complications cardiovasculaires du diabète des IRSCProfesseur Titulaire, Faculté de Médecine Axe cardiologie, Centre de recherche de l'Institut universitaire de cardiologie et pneumologie de QuébecHôpital Laval, Pavillon Marguerite d'Youville, Bureau Y4340Ste-Foy, Québec, Canada, G1V 4G5

Laurent MICLO

Docteur de l'Université Henri Poincaré – Nancy 1 (1994)Maître de Conférences à l'Université de Lorraine (IUT Nancy-Brabois)Je réalise mes recherches dans l'équipe PB2P (Protéolyse et Biofonctionnalités des Proteines et des Peptides) de l'UR AFPA (Unité de Recherche « Animal & Fonctionnalités des Produits Animaux ») dont l'axe de recherche à trait aux aliments fonctionnels et à leur impact chez le consommateur. L'équipe s'intéresse aux peptides comme ingrédients fonctionnels et au lait fermenté (par la bactérie lactique *Streptococcus thermophilus*) comme vecteur alimentaire. Nous utilisons les peptides anxiolytiques issus de la caséine alpha-s1 bovine comme peptides modèles (lors de ma thèse, j'ai découvert l'alpha-casozépine et contribué au développement du Lactium®) pour comprendre comment ces molécules peuvent avoir une action physiologique chez le consommateur. Nous nous intéressons à la biodisponibilité de ces molécules et tentons de comprendre leur mécanisme d'action moléculaire puisqu'elles ont démontré une action in vivo très significative. Les résultats obtenus permettront de dégager des connaissances sur les peptides bioactifs issus de l'alimentation en tant que signaux biologiques pouvant moduler les fonctions de l'organisme. Je réalise mon enseignement à l'IUT Nancy-Brabois dans la formation des futurs diététiciensProduction scientifique : 29 publications, 4 brevets internationaux

Pierre MORTAMAI

Soft-ingredients a été crée par Pierre Mortamais en 2010 et intervient comme agent technique et commercial pour la société Takabio, filiale commerciale du fabricant Japonais Shin Nihon. Shin Nihon produit depuis plus de 50 ans par fermentation solide, des enzymes non-ogm, principalement d'origine fongiques offrant des activités multiples, diverses et caractérisées très précisément, aussi pour les activités secondaires. Pierre Mortamais est ingénieur et titulaire d'un DEA en biotechnologies, et a travaillé 20 ans chez Brenntag, jusqu'en 2012 au développement commercial de la gamme ingrédients de spécialités avec un grand nombre de partenaires sur des projets très divers. Dans le domaine des enzymes Soft-ingredients intervient sans des projets portant sur la valorisation de matière premières glucidiques et protéiques (plutôt que sur des produits finis).

Camille NOURY

Camille NOURY est titulaire d'un Master 2 Alimentation-Droit-Nutrition-Santé (Université de Brest). Depuis 2009, elle est chargée de projets scientifiques et réglementaires chez Pharmanager development, cabinet conseil situé à Angers. Pharmanager development propose ses services et son expertise dans la réglementation Alimentaire (complément alimentaire, Novel Food, DADAP, allégations de santé), Pharmaceutique et Cosmétique. Au sein de Pharmanager, elle est en charge des déclarations de compléments alimentaires en France et à l'international ainsi que de la rédaction des rapports scientifiques (Biomarqueurs, Allégations, Novel Food etc.).

Christophe RIPOLL

PhD, MSc, Executive Vice-President R&D, CSODoctor in Life Biodiversity from the University Pierre et Marie CURIE (Paris VI) and MSc in Bio-Industrial Technologies, Christophe Ripoll is a specialist of functional food & Ingredients. His main research work at Phytomedics Inc, spin-off of The Rutgers University, USA was focused on screening and characterization of vegetable crops for their Nutrition & Health valorization, project which had led to the development of PMI 005, an anti-arthritis chicory patented extract. He has also participated to the Central Asia International Biodiversity group program (ICBG) funded by the NIH, where he set up a screening platform to identify new botanical candidates from central asian plant sources. Moreover, he worked for several years at Vilmorin, Clause & Cie on crop protection R&D projects. He is the author or co-author of several peer-reviewed publications, patents, regulatory and scientific communications. At Naturalpha since 2005, Dr. Ripoll is currently the Executive Vice-President R&D and CSO. He manages the activities of Consulting and Labs departments, brings a scientific support in the design and follow-up of clinical trial conducted in the Naturalpha investigation center (CNCN) and coordinates internal and external R&D projects in Nutrition & Health.

Alix ROGER

Ingénieur agroalimentaire d'AgroParisTech spécialisée en « microbiologie des procédés alimentaires et biologiques », Alix Roger est actuellement chef de projet au sein du département Fractionnement du végétal du centre de recherche et développement ARD (Agro-industrie Recherches et Développement). Elle est chargée de développer, à partir de biomasses d'origine végétale, des méthodes d'extraction, de prétraitement, de séparation, de purification et de concentration afin de valoriser des molécules dans les domaines cosmétique, agroalimentaire, pharmaceutique, des biomatériaux et de l'éthanol seconde génération. Elle développe ces projets du stade laboratoire jusqu'au stade industriel en passant par les stades micropilote et pilote.

Luce SERGENT

Ingénieur INSA Lyon - département BIOCHIMIE, Luce Sergent a intégré la société COPALIS en 2007. Leader mondial des hydrolysats de protéines de poisson à destination de la nutrition animale depuis 40 ans, Copalis a développé une gamme d'actifs pour la nutraceutique et la cosmétique il y a une dizaine d'années. A la tête du Département Développement Durable créé en 2010, Luce Sergent manage notamment les travaux de R&D pour la caractérisation et l'objectivation des ingrédients et en fait la promotion scientifique. Ces travaux de recherche font souvent l'objet de travaux collaboratifs au niveau national ou international et Luce Sergent en est la coordinatrice. Enfin, elle est le garant de la mise en place des réglementations allégations et nutrition-santé émanant des différents pays où la société intervient.

Adrien SCHEFFER

Adrien SCHEFFER est Docteur en Pharmacie issu de la faculté de Pharmacie de Nantes. Il est titulaire d'un Master 2 Sciences de l'Alimentation et Nutrition Humaine, avec une spécialisation dans le développement des aliments santé. Diplômé en 2010, il est chargé de la veille réglementaire et de marché chez Biofortis à Nantes. Depuis son intégration à Mérieux NutriSciences, Biofortis a développé une expertise mondiale (Chine, États-Unis, Europe, Brésil) et comprends 3 Business Units complémentaires (Clinical, Sensory & Consumer, Research).

Jean-luc SIMON

Ingénieur ENSAIA, Docteur en Biotechnologies et Sciences de l'aliment, Habilitation à diriger des recherches en Sciences alimentaires et Biotechnologies. Professeur contractuel en Biotechnologies dans différentes universités françaises et organismes de formation professionnelle. Chairman de colloques sur les Biotechnologies. Rapporteur de thèses. Expert à l'Agence nationale de la recherche. Ex membre du Comité stratégique de l'ADEME. Ex rédacteur en chef de la rubrique Biotechnologies de la revue « Techniques de l'Ingénieur ». Président du Groupe Génie des Procédés Biotechnologiques et alimentaires de la Société française du Génie des procédés. Vice président du pôle de compétitivité Nutrition Santé Longévité du Nord Pas de Calais. Membre du pôle de compétitivité Goût Nutrition Vitagora de Dijon. Membre du Comité scientifique du CNIEL (industries laitières), de l'Institut Carnot Qualiment, de la Commission recherches de l'ANIA, de la plateforme Food for Life France et d'Adebiotech. Directeur de la Recherche et du Développement du groupe Ingredia, spécialiste des ingrédients fonctionnels et nutritionnels issus du lait, depuis 2009. Directeur de la Recherche du Groupe Lesaffre, leader mondial des levures pour les applications alimentaires, nutraceutiques et les biocarburants, de 2001 à 2009. Directeur des recherches en procédés de production d'ingrédients biologiques pour toutes applications hors Pharma chez Rhodia de 1993 à 2001. Chef de projet de recherches en procédés biochimiques chez Rhône-Poulenc Santé de 1985 à 1991. animateur des recherches en procédés biochimiques de Rhône-Poulenc Rorer de 1991 à 1993.

Corinne SOLEAU

Titulaire d'une Maîtrise des Sciences et Technique et d'un DESS chimie cosmétique obtenue à l'UVSQ – ISIPCA en 1997, Corinne Soléau a débuté sa carrière professionnelle au sein de laboratoires de formulation cosmétique pour s'orienter après plusieurs années vers l'industrie de matières premières. Elle est actuellement Responsable du service Technique et Marketing chez Croda France, filiale française du groupe anglais Croda Ltd, spécialiste, entre autre, de la chimie des protéines. En plus de son activité chez Croda Corinne Soleau intervient en tant que formateur auprès des étudiants en master et mastère de l'ISIPCA.

Daniel THOMAS

Pionnier du Génie Enzymatique et des biotechnologies industrielles en France, Daniel THOMAS jouit d'une renommée mondiale dans ces domaines depuis de nombreuses années. Docteur d'Etat en Sciences Physiques (1971), Daniel THOMAS est professeur à l'université de Technologie de Compiègne, Directeur d'Etude à l'Ecole Pratique des Hautes Etudes de Paris, Membre de l'Académie des Technologies, Président de l'Agence Régionale d'Innovation Picardie et a été depuis 2005 1er Vice-Président puis Président du pôle de compétitivité « IAR » (l'un des Fondateurs du Pôle IAR). Dans ses activités scientifiques, Daniel THOMAS a été Chargé de Recherche au CNRS (1969), "Research associate" à l'Université d'Harvard 1972-1973, Professeur UTC depuis 1974, Fondateur de l'UMR CNRS Génie Enzymatique et Cellulaire (80 personnes), auteur de 350 publications scientifiques dans des revues internationales et est Vice-Président du Conseil Scientifique de l'UTC. Concernant ses activités de transfert et industrielles, Daniel THOMAS a été Responsable d'une cinquantaine de contrats industriels depuis 1974 : Agroalimentaire, Agroindustrie, Santé, Cosmétique, Energie, Environnement. (Cette activité a fait l'objet de la thèse de M. Cassier dans le cadre du "Centre de Sociologie de l'Innovation" C. S. I. de l'Ecole des Mines de Paris), Président du Conseil de Surveillance de « Metabolic Explorer », la plus importante « I. P. O. » depuis 2007 au niveau mondial en Biotechnologie Industrielle. Au niveau régional, Daniel THOMAS a été Président des Assises de la Recherche et de la Technologie en Picardie (1981-1982), Président du Comité du Programme « Alternatives Végétales », Président de l'Agence Régionale d'Innovation en Picardie. Au niveau national, Daniel THOMAS a été Directeur du Programme National des Biotechnologies de 1985 à 1993 (cf. Rapport d'évaluation du Comité National d'Evaluation de la Recherche - CNER), Président de la section "Biochimie et Biologie Moléculaire" du CNU (Conseil National des Universités) et Membre du Comité National du CNRS de 1996 à 2000. Il est entré dans le « Who's who in France » en 1979. Au niveau européen, Daniel THOMAS a été Fondateur (1978-1981), Président du Comité de Gestion (1983) et rapporteur devant le CREST (1990) du Programme des Biotechnologies de la C. E. E. . Il a été Président du Comité d'Evaluation du Programme "Qualité de la Vie" de l'U. E. et Président du Panel d'Evaluation de l'Espace européen de la recherche (ERA) en 2005. Au niveau international, Daniel THOMAS est Président de Comités d'Expert de l'O. C. D. E. , et a déjà donné de nombreuses conférences à travers le monde notamment aux Etats-Unis où il a organisé deux Congrès à la demande de l'"Engineering Foundation" (New-York). Expert de la NSF et de la NASA, Daniel Thomas a par ailleurs fait une présentation sur les Biotechnologies au Congrès des Etats-Unis (1989). Il est aussi Lauréat de la "Chaire Solvay" à l'Université Libre de Bruxelles (1982 - 1983).

Julie UNZEITIG

Depuis début 2009, chargée de mission nutrition à la Direction générale de la Concurrence Consommation et Répression des Fraudes (DGCCRF). Elle est spécialisée sur la problématique des allégations nutritionnelles et de santé. En tant que porte parole de la délégation française dans les institutions européennes sur ce sujet, elle est amenée à élaborer et défendre les positions de la France faites en concertation avec les différents ministères concernés. Elle est également en charge de veiller à la bonne mise en œuvre de ces dispositions sur le territoire national en participant à l'élaboration et à la coordination des enquêtes faites sur les allégations nutritionnelles et de santé. De formation ingénieur agroalimentaire spécialisée en nutrition humaine, Elle a par ailleurs travaillé en recherche et développement dans le domaine des ingrédients alimentaires.

Rémi URBAIN

Rémi Urbain est Directeur des Partenariats Scientifiques du LFB, l'un des 5 grands laboratoires pharmaceutiques français, qui développe, produit et commercialise des médicaments issus des biotechnologies, et notamment des anticorps monoclonaux (1900 personnes, 430 M€ de CA en 2011). (www.lfb.fr) Ancien élève de l'Ecole Normale Supérieure de Cachan, titulaire d'un DEA de Pharmacologie, Rémi Urbain a effectué toute sa carrière professionnelle en R&D dans l'industrie pharmaceutique depuis 1991. Il a occupé en 20 ans des postes variés de responsabilités croissantes, d'abord chez Rhône-Poulenc Rorer puis à l'Institut de Recherche Pierre Fabre, aussi bien en développement clinique qu'en gestion de projets. Rémi Urbain a rejoint en 2005 le groupe LFB (Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies), où il est responsable de la politique de partenariats public/privé pour l'ensemble du groupe et pilote les activités d'innovation thérapeutique. Rémi Urbain est Président de Adebitech, administrateur du pôle de compétitivité Médicen Paris Région, et membre de la commission « Valorisation » de l'ARIIS.

John VAN CAMP

Prof. John Van Camp is bio-engineer and nutritionist at the department of Food safety and Food Quality of the Faculty of Bio-Science Engineering, Ghent University, where he is associated to the research group "Food Chemistry and Human Nutrition (nutriFOODchem)". He is responsible for education, research and services concerning nutritional value of foods and food products, and the relationship between nutrition and health of humans. His research activities are related to bio-active proteins and peptides, micronutrients (vitamins, phenolics, trace elements) and nutrition epidemiology. He is a member of the High Health Council in Belgium, member of the advisory commission "Food Science and Nutrition" of IFS (International Foundation for Science), member of the board of the Belgian Nutrition Society (BNS), and one of the editors for the journal "food chemistry".

Jean-Michel WAL

Jean-Michel Wal est Directeur de Recherche à l'INRA et Directeur de l'Unité d'Immuno Allergie Alimentaire. Etablie au CEA de Saclay, cette Unité étudie les relations existant entre la structure des protéines et des peptides alimentaires et leur allergénicité. Elle développe des méthodes in vitro, cellulaires et in vivo pour l'analyse des facteurs et la compréhension des mécanismes qui participent à la dérégulation de la réponse immunitaire et permettre l'évaluation et la prévention du risque allergique des (Nouveaux) Aliments. Parallèlement Jean-Michel Wal est Expert sur ces sujets auprès de nombreux comités scientifiques, en particulier l'EFSA (Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire) dont il est Membre du Groupe de Travail « Food Allergy » du Panel Nutrition et dont il a présidé le Groupe de Travail « Allergenicity » du Panel OGM.