

## Les peptides du lait à activité physiologique III. Peptides du lait à effet cardiovasculaire : activités antithrombotique et antihypertensive

JL Maubois<sup>1</sup>, J Léonil<sup>1</sup>, R Trouvé<sup>2</sup>, S Bouhallab<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRA, laboratoire de recherches de technologie laitière,  
65, rue de Saint-Brieuc, 35042 Rennes cedex

<sup>2</sup> CNTS, 3 avenue des tropiques, BP 100, 91943 Les Ulis cedex, France

**Résumé** — Les similarités fonctionnelles entre la coagulation du lait et celle du sang, ainsi que les homologies de séquences existant entre la chaîne  $\gamma$  du fibrinogène et la caséine  $\kappa$  du lait, ont été à la base de la démarche adoptée par le groupe de Jollès pour démontrer l'activité cardiovasculaire d'une famille de peptides issus de cette protéine du lait. Ces peptides localisés dans le segment glycomacropéptidique de la caséine  $\kappa$ , sont capables, non seulement d'inhiber l'agrégation plaquettaire mais aussi de se lier avec les récepteurs spécifiques apparaissant à la surface de ces éléments figurés du sang et donc, de prévenir la formation du thrombus.

L'activité antiagrégative est nettement renforcée par la présence d'un résidu Lys; ainsi, la séquence 112-116 semble 200 fois plus active que le peptide 113-116. Les résultats obtenus par notre groupe à partir de peptides résultant de l'hydrolyse trypsique du GMP ont confirmé et précisé ceux du groupe de Jollès.

L'hydrolyse de l'angiotensine I par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) est l'étape clé de la régulation physiologique de la tension artérielle. Aussi a-t-on recherché des séquences peptidiques à même d'inhiber l'action de l'ACE. De telles molécules ont été localisées dans la séquence de la caséine  $\beta$ .

L'activité biologique des protéines laitières semble de plus en plus plausible au vu des résultats acquis depuis une dizaine d'années qui, outre la démonstration d'activités spécifiques *in vivo* et *in vitro*, indiquent la multifonctionnalité de certaines séquences et la conservation de ces séquences dans la plupart des espèces de mammifères.

lait / caséine / peptide / activité cardiovasculaire / activité biologique

**Summary** — **Milk peptides with cardiovascular activity: antithrombotic and antihypertensive activities.** Functional similarities between milk and blood coagulation as well as sequence homologies existing in fibrinogen  $\gamma$  chain and  $\kappa$  casein were the basis for the approach which the Jollès group adopted to demonstrate the cardiovascular activity of a peptide family issued from this milk protein. These peptides are located in the glycomacropéptide segment of  $\kappa$  casein. They are able not only to inhibit platelet aggregation but also to combine with receptor sites and consequently to prevent fibrinogen binding with blood platelets (antithrombotic activity). *In vitro* antiaggregative activity is reinforced by the presence of a Lys residue in the sequence; therefore, the 112–116 peptide resulting from tryptic hydrolysis of GMP seems to be 200-fold more active than the 113–116 sequence. These recent findings by our team have confirmed those of the Jollès group. Hydrolysis of angiotensin I by angiotensin converting enzyme (ACE) is the key step in the physiological regulation of blood pressure. An investigation was therefore carried out on peptidic sequences able to block ACE action with a view to finding therapeutic natural substances acting against blood hypertension. Such peptides are located in  $\beta$  casein, and some, such as the 43–52 human  $\beta$  casein sequence, seem to be very efficient. The biological activity of milk proteins seems to be an increasingly plau-

*sible possibility, given the results acquired during the last decade, which besides the demonstration of specific activities in vitro and in vivo, indicate the multifunctionality of certain sequences and the conservation of specific sequences in milk proteins produced by many mammalian species.*

***milk / casein / peptide / biological activity / cardiovascular activity***

## INTRODUCTION

Trois stratégies de recherches sont envisageables (Meisel *et al*, 1989) pour l'étude et la caractérisation de séquences peptidiques ayant une activité biologique :

- recherche de protéines dont les séquences d'acides aminés sont similaires à celles de protéines actives connues. Ces séquences sont ensuite synthétisées et évaluées par leurs propriétés bioactives;
- isolation et caractérisation de peptides actifs à partir d'hydrolysats protéiques *in vitro*;
- isolation et caractérisation de peptides actifs issus de la digestion gastro-intestinale chez l'animal.

Ces 3 approches ont été suivies dans le cas des protéines laitières où de multiples activités ont été mises en évidence (Maubois et Léonil, 1989; Fiat et Jollès, 1989).

Dans le cadre de ces journées, notre propos sera limité à la synthèse des derniers travaux réalisés sur les activités cardiovasculaires mises en évidence dans les composants protéiques du lait.

Les maladies cardiovasculaires constituent la plus grande cause de mortalité de la population adulte dans les pays industrialisés. La formation d'un thrombus (caillot) au niveau des vaisseaux sanguins (Zucker, 1980) ou encore la vasoconstriction (Wyvratt et Patchett, 1985) sont parmi les événements les plus fréquents à l'origine des dysfonctionnements du système vasculaire.

Les étapes clés des mécanismes intervenant dans ces dérèglements du système vasculaire ont été récemment identifiées. Il a donc pu être imaginé et expérimenté des stratégies mettant en œuvre des molécules ayant une activité d'antagoniste spécifique et bloquant ainsi le déroulement de ces mécanismes. Le fait de disposer de la connaissance complète des séquences primaires des protéines laitières a représenté un outil précieux dans la recherche de dérivés peptidiques à même de «leurrer» des récepteurs cellulaires ou d'inhiber l'action d'enzymes par blocage de leurs sites actifs.

## ACTIVITÉ ANTITHROMBOTIQUE

La formation des thrombus dans les vaisseaux sanguins découle d'une cascade extrêmement complexe de réactions (Zucker, 1980). Parmi la multitude des événements qui entrent en jeu, celui qui apparaît être le plus critique est la liaison du fibrinogène aux récepteurs plaquettaires (Shebuski *et al*, 1989). Après activation par des agonistes physiologiques (ADP, thrombine, etc.) les plaquettes fixent le fibrinogène ainsi que d'autres protéines, telles que la fibronectine et le facteur de von Willebrand. La liaison de ces protéines, dites adhésives, se fait au niveau de récepteurs glycoprotéiques GPIIb-GPIIIa développés à la surface des plaquettes activées (Plow *et al*, 1985).

Des anomalies héréditaires de ces récepteurs ou la présence d'anticorps contre

GPIIb-GPIIIa conduisent à une tendance sévère au saignement. Les expériences réalisées chez l'animal ont montré que les anticorps anti-GPIIb-GPIIIa sont en effet de puissants agents antithrombotiques et antihémostase. Cette voie immunologique a d'ailleurs été proposée pour des applications cliniques (Coller *et al*, 1988).

Les séquences peptidiques du fibrinogène impliquées dans l'interaction avec les récepteurs des cellules plaquettaires ont été identifiées. Il s'agit du térapeptide RGD/X (fragment 572-575) de la chaîne  $\alpha$  et la séquence 400-411 de la chaîne  $\gamma$  du fibrinogène (Shebuski *et al*, 1989). Les expériences réalisées tant *in vitro* qu'*in vivo* ont montré que des analogues synthétiques de ces séquences étaient capables d'inhiber l'agrégation plaquettaire et donc la formation du thrombus (Kloczewiak *et al*, 1984; Gartner et Bennett, 1985; Cadroy *et al*, 1989; Shebuski *et al*, 1989).

Se basant sur la similarité des phénomènes de coagulation du sang et du lait, Jollès *et al* (1986) puis Drouet *et al* (1990) ont recherché l'existence de séquences inhibitrices au sein des protéines du lait.

Deux séquences analogues à celles contenues dans la molécule du fibrinogène ont été identifiées dans les protéines lai-

tières. Il s'agit d'une part, d'un analogue du térapeptide RGD/X du fibrinogène  $\alpha$ , localisé dans la région 39-42 de la lactotransferrine humaine. Les tests réalisés, après synthèse chimique de ce fragment, ont montré que cette séquence a une activité antiplaquettaire *in vitro* et antithrombotique *in vivo*. De plus, cette séquence co-injectée en présence du fragment synthétique du fibrinogène  $\alpha$  a un effet potentialisateur chez le cobaye et surtout chez le rat. D'autre part, une région analogue au fragment 400-411 (partie C-terminale) du fibrinogène  $\gamma$  a été identifiée dans la partie N-terminale du caséinoglycomacropeptide (CMP) issu de l'hydrolyse par la chymosine de la caséine  $\kappa$  bovine. Divers peptides naturels (hydrolyse trypsique du CMP) ou synthétiques de cette région (106-116; 106-112; 113-116) (tableau I) ont été testés pour leur capacité à inhiber la fixation du fibrinogène et l'agrégation des plaquettes. Le fragment 106-116 naturel s'est révélé être le plus actif dans cette étude (Jollès *et al*, 1986).

Dans la même ligne de recherche, le pentapeptide 112-116 obtenu par hydrolyse trypsique du CMP (Léonil et Mollé, 1990) a été testé pour ses capacités à inhiber l'agrégation des plaquettes *in vitro* (Léonil *et al*, résultats non publiés). Les ré-

**Tableau I.** Structure primaire des peptides des la région N-terminale du CMP dérivé de la caséine  $\kappa$  bovine, et du fragment C-terminal de la chaîne  $\gamma$  du fibrinogène.  
*Primary sequence of peptides from the N-terminal region of bovine glycomacropeptide and from the c-terminal region of the  $\gamma$  chain of fibrinogen.*

Fragment	Séquences
KCN (106-116)	H <sub>2</sub> N-M-A-I-P-P-K-K-N-Q-D-K-COOH
(106-112)	H <sub>2</sub> N-M-A-I-P-P-K-K-COOH
(113-116)	H <sub>2</sub> N-N-Q-D-K-COOH
(112-116)	H <sub>2</sub> N-K-N-Q-D-K-COOH
Fibrinogène $\gamma$ : (400-411)	H <sub>2</sub> N-H-H-L-G-G-A-K-Q-A-G-D-V-COOH

sultats préliminaires obtenus ont montré que ce peptide était respectivement 30 fois et 200 fois plus actif que les peptides 106-116 et 113-116 décrits par Jollès *et al* (1986) (tableau II). Dans la mesure où les résultats issus de ces 2 études sont comparables, la présence ou l'absence du résidu de lysine (position 112) pourrait expliquer ces différences d'activité constatées. En effet, Kloczewiak *et al* (1984) ont montré que le résidu Lys 406 du segment 400-411 du fibrinogène  $\gamma$  était impliqué dans l'interaction de cette molécule avec les récepteurs plaquettaires.

Les segments peptidiques issus de l'hydrolyse enzymatique ménagée de la portion N-terminale du CMP constituent donc une famille de molécules capables d'inhiber l'agrégation plaquettaire.

## ACTIVITÉ ANTIHYPERTENSIVE

L'hydrolyse de l'angiotensine, molécule présente dans le plasma sanguin par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE : E.C.3.4.15.1) est certainement l'étape clé dans la cascade d'événements biochimiques conduisant à la constriction des artérioles et donc, à la remontée rapide de la pression artérielle. Le clivage par l'ACE des 2 résidus C terminaux (His-

Leu) sous forme de dipeptide transforme en effet l'angiotensine I en un puissant vasoconstricteur : l'angiotensine II.

Ce rôle clé de l'ACE, sa localisation dans de nombreux tissus y compris dans les cellules intestinales (Stevens *et al*, 1988; Duggan *et al*, 1989) justifie qu'elle ait été choisie comme cible privilégiée des agents thérapeutiques à même d'intervenir contre l'hypertension. Les premières molécules actives qui aient été identifiées étaient des petits peptides présents dans le venin d'un serpent brésilien. Ces peptides inhibent l'action de l'ACE en bloquant son site actif. Ils contiennent un enchaînement particulier d'acides aminés dont une proline en position C-terminale.

En raison de la richesse élevée des caséines en résidus proline, Maruyama *et al* (1985) ont recherché de tels inhibiteurs dans les hydrolysats enzymatiques des caséines bovines. Des séquences des caséines  $\alpha_s$  et  $\beta$  capables d'inhiber l'ACE *in vitro* ont ainsi été identifiées. Plus récemment, Karaki *et al* (1990) ont rapporté que ces mêmes séquences avaient un effet anti-hypertensif chez les rats rendus artificiellement hypertensifs.

Dans cette même optique, en se basant sur les données structurales des peptides inhibiteurs de l'ACE, Kohmura *et al* (1989, 1990) ont reproduit par synthèse chimique

**Tableau II.** Concentration des peptides inhibant 50% de l'agrégation des plaquettes activées en présence de l'ADP

*Peptide concentration inhibiting 50% of the aggregation of ADP-activated platelets.*

Séquences	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ mol/l)
KCN (112-116)	2
KCN (106-116)*	60
KCN (113-116)*	400

\* Résultats publiés par Jollès *et al* (1986).

\* Results published by Jollès *et al*, 1986.

des séquences des caséines  $\beta$  et  $\kappa$  humaines possédant un résidu proline en C-terminal.

Parmi les 92 séquences synthétisées dont 69 de la caséine  $\beta$  et 23 de la caséine  $\kappa$ , 4 possèdent une forte activité inhibitrice de l'ACE proche de celle décrite dans le venin de serpent (tableau III). La séquence 43-52 de la caséine  $\beta$ , n'est que 4 fois moins active que l'agent de référence SQ 20881.

### PEPTIDES OPIOÏDES ET EFFET CARDIOVASCULAIRE

Les nombreuses actions pharmacologiques des peptides opioïdes ont été récemment revues par Ramabadran et Bansinath (1989). L'administration intracérébrale ou intraveineuse de ces molécules conduit à de puissants effets sur le système cardiovasculaire. Chez des rats normotensifs anesthésiés, l'injection intracérébroventriculaire ou intraveineuse de la  $\beta$ -casomorphine (1-4) amidée produit de l'hypertension et de la bradycardie. Ces phénomènes sont réversés par la naloxone, antagoniste spécifique des opiacés (Wei et

al, 1980). En revanche, lorsque l'injection intraventriculaire de la  $\beta$ -casomorphine (1-4) amidée était effectuée chez des rats hypertensifs, une augmentation de la pression sanguine et une accélération du rythme cardiaque étaient observées. Par ailleurs, Liebmann *et al* (1986) ont rapporté l'effet de faibles concentrations de  $\beta$ -casomorphine (1-5) sur les membranes du muscle cardiaque chez le cobaye. Leurs résultats suggèrent qu'une action sur la pompe à sodium pourrait être à l'origine de l'effet de cette substance sur le potentiel d'action du myocarde. Sur un autre plan, il est connu que les opioïdes endogènes sont des inhibiteurs de l'ACE (Holaday, 1983). Bien que ce phénomène n'ait pas été démontré pour les exorphines, ceci laisse à penser que ces molécules agissent par différents mécanismes sur le système cardiovasculaire.

### CONCLUSIONS

Outre leur qualité nutritionnelle parfaitement adaptée à la satisfaction des besoins de l'être humain, les protéines du lait sont des vecteurs d'activités biologiques. Une

**Tableau III.** Concentration des peptides inhibant 50% de l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). \* Produit de référence.

(1) Maruyama *et al* (1987); (2) Kohmura *et al* (1990); (3) Kohmura *et al* (1989)  
Peptide concentration inhibiting 50% of angiotensin converting enzyme activity.

Séquences	Origine	IC50 ( $\mu\text{mol/l}$ )	Référence
177-183	Caséine $\beta$ bovine	15	1
23-27	Caséine $\alpha_{s1}$ bovine	6	1
18-20	Caséine $\kappa$ humaine	3,5	2
124-129	Caséine $\beta$ humaine	2,9	3
63-65	Caséine $\kappa$ humaine	2,2	2
43-52	Caséine $\beta$ humaine	1,4	3
SQ 20881*	Venin de serpent	0,56	3



telle conclusion s'impose, sans conteste, au vu des résultats accumulés depuis le travail de pionnier réalisé par Brantl *et al* (1979) sur les activités opioïdes de plusieurs segments de la caséine  $\beta$ . Mais pour intéressantes qu'elles soient, les connaissances accumulées depuis une dizaine d'années sont encore par trop fragmentaires, par trop basées sur des tests *in vitro* pour affirmer avec certitude que ces activités sont exercées après chaque ingestion de produits laitiers dans les organismes humains. De nombreuses études doivent encore être menées pour confirmer ce rôle *in vivo* des protéines lactières mais, outre les résultats déjà acquis, 2 autres observations sont en faveur d'un rôle biologique de certaines séquences précises :

- ces enchaînements sont conservés dans les diverses espèces de mammifères;

- ces peptides sont multifonctionnels : une même séquence intervient au niveau de plusieurs activités; par exemple, la  $\beta$ -casomorphine cumulerait des activités morphinomimétique et immunostimulante, la séquence 177-183 de la caséine  $\beta$  associerait des activités immunostimulante et antihypertensive.

Parmi ces activités biologiques, celles agissant au niveau cardiovasculaire ont été particulièrement bien établies *in vitro*. Mais les mécanismes permettant le transfert des séquences à travers la paroi intestinale ne sont pas, ou peu connus. Leur détermination permettrait d'envisager la forme sous laquelle pourrait être apporté(s) le ou les peptides actif(s).

## RÉFÉRENCES

- Brantl V, Teschemacher H, Henschen A, Lottspeich F (1979) Novel opioid peptides derived from casein ( $\beta$ -casomorphins). *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 360, 1211-1216
- Cadroy Y, Houghten RA, Hanson SR (1989) RGDV peptide selectively inhibits platelet-dependent thrombus formation *in vivo*. Studies using a baboon model. *J Clin Invest* 84, 939-944
- Coller BS, Scudder LE, Berger HJ, Iulicci JD (1988) Inhibition of human platelet function *in vivo* with a monoclonal antibody: with observations on the newly dead as experimental subject. *Ann Int Med* 109, 635-638
- Drouet L, Bal dit Sollier C, Cisse M, Pignaud G, Mazoyer E, Fiat AM, Jollès P, Caen JP (1990) The antithrombotic effect of KRDS, a lactotransferrin peptide, compared with RGDS. *Nouv Rev Fr Hematol* 32, 59-62
- Duggan KA, Mendelsohn FAO, Levens NR (1989) Angiotensin receptors and angiotensin I-converting-enzyme in rat intestine. *Am J Physiol* 257, G504-G510
- Fiat AM, Jollès P (1989) Caseins of various origins and biologically active casein peptides and disaccharides: structural and physiological aspects. *Mol Cell Biochem* 87, 5-30
- Gartner TK, Bennett JS (1985) The tetrapeptide analogue of the cell attachment site of fibronectin inhibits platelet aggregation and fibrinogen binding to activated platelets. *J Biol Chem* 260, 11891-11894
- Holaday JW (1983) Cardiovascular effects of endogenous opiate systems. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 23, 541-594
- Jollès P, Levy-Toledano S, Fiat AM, Soria C, Gillissen D, Thomaidis A, Dunn FW, Caen JP (1986) Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from  $\kappa$ -casein on platelet function. *Eur J Biochem* 158, 379-382
- Karaki H, Doi K, Sugano S, Uchiwa H, Sugai R, Murakami U, Takemoto S (1990) Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comp Biochem Physiol* 96C, 367-371
- Kloczewiak M, Timmons S, Lukas TJ, Hawiger J (1984) Platelet receptor recognition site on human fibrinogen. Synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the  $\gamma$ -chain. *Biochemistry* 23, 1767-1774
- Kohmura M, Nio N, Kubo K, Minoshima Y, Munekata E, Ariyoshi Y (1989) Inhibition of angiotensin-converting-enzyme by synthetic peptides of human  $\beta$ -casein. *Agric Biol Chem* 53, 2107-2114

- Kohmura M, Nio N, Ariyoshi Y (1990) Inhibition of angiotensin-converting-enzyme by synthetic peptides of human  $\kappa$ -casein. *Agric Biol Chem* 54, 835-836
- Léonil J, Mollé D (1990) Liberation of tryptic fragments from caseinomacropeptide of bovine  $\kappa$ -casein involved in platelet function. Kinetic study. *Biochem J* 271, 247-252
- Liebmann C, Barth A, Neubert K, Mentz P, Hoffmann S (1986) Effects of  $\beta$ -casomorphin on  $^3\text{H}$ -ouabain binding to guinea-pig heart membranes. *Pharmazie* 41, 670-671
- Maruyama S, Nakagomi K, Tomizuka N, Suzuki H (1985) Angiotensin I-converting-enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II-Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric Biol Chem* 49, 1405-1409
- Maruyama S, Mitachi H, Tanaka H, Tomizuka N, Suzuki H (1987) Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I-converting-enzyme inhibitors derived from casein. *Agric Biol Chem* 51, 1581-1586
- Maubois JL, Léonil J (1989) Peptides du lait à activité biologique. *Lait* 69, 245-269
- Meisel H, Frister H, Schlimme E (1989) Biologically active peptides in milk proteins. *Z Ernährungswiss* 28, 267-278
- Plow EF, McEver RP, Collier BS, Woods VL, Marguerie GA, Ginsberg MH (1985) Related binding mechanisms for fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor, and thrombospondin on thrombin-stimulated human platelets. *Blood* 66, 724-727
- Ramabadran K, Bansinath M (1989) Pharmacology of  $\beta$ -casomorphins, opioid peptides derived from milk protein. *Asia Pacific J Pharmacol* 4, 45-58
- Shebuski RJ, Berry DE, Bennett DB, Romoff T, Storer BL, Ali F, Samanen J (1989) Demonstration of Ac-Arg-Gly-Asp-Ser-NH<sub>2</sub> as an antiaggregatory agent in the dog by intracoronary administration. *Thromb Haemostasis* 61, 183-188
- Stevens BR, Fernandez A, Kneer C, Cerda JJ, Phillips MI, Woodward ER (1988) Human intestinal brush border angiotensin-converting-enzyme activity and its inhibition by antihypertensive ramipril. *Gastroenterology* 94, 942-947
- Wei ET, Lee A, Chang JK (1980) Cardiovascular effects of peptides related to the enkephalins and  $\beta$ -casomorphin. *Life Sci* 26, 1517-1522
- Wyvratt MJ, Patchett AA (1985) Recent developments in the design of angiotensin-converting-enzyme inhibitors. *Med Res Rev* 5, 483-531
- Zucker M (1980) Plaquettes sanguines et coagulation. *Pour Sci* 34, 37-47