

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :

2 876 389

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national :

04 10818

⑤1 Int Cl⁸ : C 12 P 21/06 (2006.01), A 61 P 9/12, A 23 J 1/14, 3/
14, A 23 L 1/305, A 61 K 36/48

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 13.10.04.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 14.04.06 Bulletin 06/15.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : VIRIDIS Société anonyme — FR.

⑦2 Inventeur(s) : KAPEL ROMAIN, DHULSTER
PASCAL, GUILLOCHON DIDIER, LINARES ELODIE et
RAMBOURG JEAN CLAUDE.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : CABINET LAVOIX.

⑤4 HYDROLYSATS DE PROTEINES BLANCHES DE LUZERNE.

⑤7 L'invention concerne un procédé de fabrication d'hydrolysat de protéines blanches de luzerne. Ces hydrolysats, dotés d'une activité d'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et anti-opioïde, sont utiles pour la fabrication d'aliments fonctionnels et/ou de produits nutraceutiques à effet antihypertenseur. L'invention concerne également l'utilisation de ces hydrolysats pour le traitement de l'hypertension artérielle.

FR 2 876 389 - A1



L'invention concerne un procédé de fabrication d'hydrolysats de protéines blanches de luzerne. Ces hydrolysats, dotés d'une activité d'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et anti-opioïde, sont utiles pour la fabrication d'aliments fonctionnels à effet antihypertenseur. L'invention concerne également l'utilisation de ces hydrolysats pour le traitement de l'hypertension artérielle.

L'hypertension artérielle est aujourd'hui un problème de santé publique majeur. Cette affection touche en effet 15 à 20% des personnes adultes et conduit à des troubles rénaux et cardio-vasculaires qui peuvent être létaux.

L'hypertension artérielle est régulée physiologiquement par le système rénine-angiotensine (RAS) et système kinine-kallikréine. L'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ACE) est l'enzyme clé de la régulation de la pression artérielle. Des inhibiteurs de cette enzyme, développés par l'industrie pharmaceutique, permettent de soigner efficacement l'hypertension artérielle. Cependant, ces molécules, issues de chimie combinatoire, peuvent entraîner chez le patient un certain nombre de désagréments. Récemment des activités d'inhibition de l'ACE ont été caractérisées dans des hydrolysats peptidiques issus de protéines d'origine animale ou végétale, telles que les caséines, l'hémoglobine, les protéines du lactosérum, les gluten du blé, les zéines du maïs. Un certain nombre de ces peptides, présentent chez le rat et l'homme une activité antihypertensive *in vivo*.

La luzerne (*Medicago sativa*) est un végétal qui présente l'un des meilleurs rendements protéiques à l'hectare (environ $3000 \text{ kg}^{-1} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{an}^{-1}$). Les protéines foliaires de luzerne, qui constituent un ensemble hétérogène par leur localisation et leurs fonctions biochimiques, se composent à 50 % de protéines dites « vertes » et à 50 % de protéines dites « blanches » qui regroupent les protéines hydrosolubles de la luzerne. Les protéines blanches sont en majorité des enzymes stromales du cycle de Calvin.

Les protéines blanches de la luzerne sont particulièrement intéressantes puisque ces protéines présentent un aminogramme équilibré, composé de tous les acides aminés essentiels, et que leurs propriétés nutritionnelles apparaissent similaires, voir supérieures, à celles des autres protéines agricoles conventionnelles d'origine végétales (gluten du blé et protéines de soja) ou animales (protéines de lait ou de farine de poisson).

Les inventeurs ont développé deux procédés de production d'hydrolysats de protéines blanches de luzerne, le premier par hydrolyse enzymatique en lot « batch »

d'un concentré de protéines blanches couplée à une clarification puis à une atomisation, le deuxième par hydrolyse enzymatique continue dans un réacteur enzymatique à membrane couplée à une décoloration et à une déminéralisation, puis à une atomisation.

5 Les inventeurs ont mis en évidence que les hydrolysats de protéines blanches de luzerne ainsi obtenus présentent des activités opioïde et antihypertensive.

L'activité antihypertensive a été démontrée par un test *in vitro* d'inhibition de l'ACE. Les hydrolysats totaux obtenus présentent une activité d'inhibition de l'ACE
10 particulièrement élevée : en fonction du procédé de fabrication, la CI_{50} (concentration inhibant 50% de l'enzyme) est comprise entre 8,1 et 131,1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Cette activité inhibitrice est très largement supérieure à celle des hydrolysats végétaux les plus actifs décrits dans la littérature. Il a ainsi été rapporté que l'hydrolyse alcaline du germe de blé dégraissé après traitement pendant trois heures
15 par l' α -amylase (Matsui et al., 1999), permet d'obtenir un hydrolysats dont la CI_{50} est égale à 0,37 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Six peptides composés de 2-7 résidus d'acide aminé, ont été identifiés à partir de cet hydrolysats. Les CI_{50} des peptides qui composent cet hydrolysats ont été déterminés autour de 20 mM. Le peptide le plus actif présentait une CI_{50} de 0,48 mM. Il a par ailleurs été décrit qu'un hydrolysats total de zéïne de
20 maïs, obtenu par hydrolyse par la thermolysine 1/100 (p/p) à 37°C pendant 3h, présente une CI_{50} de 24,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Miyoshi et al. , 1991). La plupart des peptides actifs présents dans l'hydrolysats sont des tripéptides ayant des CI_{50} de 0,27, 1,7 et 1,9 mM, respectivement. L'activité d'un de ces peptides (LRP) a été testée sur des rats spontanément hypertendus par injection intraveineuse d'une dose de 30 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.
25 Une diminution de 5 mmHg de pression artérielle a été obtenue par le traitement.

Parallèlement, les inventeurs ont mis en évidence une activité morphinomimétique en démontrant que les hydrolysats réduisent *in vitro* le péristaltisme intestinal.

30 Finalement, l'effet antihypertenseur de l'hydrolysats total a été démontré *in vivo* sur des rats spontanément hypertendus.

L'invention propose donc des hydrolysats protéiques d'origine végétale qui présentent une activité antihypertensive accrue par rapport aux hydrolysats végétaux de l'art antérieur, et qui présentent également une activité opioïde.

Plus spécifiquement, l'invention concerne des procédés de préparation d'un hydrolysats de protéines blanches de luzerne, ainsi que les hydrolysats susceptibles d'être obtenus par ces procédés.

5 Du fait de leur activité antihypertensive et opioïde, les hydrolysats selon l'invention sont utiles pour le traitement de l'hypertension artérielle. En outre, compte tenu des propriétés nutritionnelles et fonctionnelles des protéines de luzerne, les hydrolysats selon l'invention peuvent avantageusement être formulés sous forme d'un complément alimentaire. Un tel complément alimentaire permet avantageusement d'assurer un apport important en protéines végétales et de réduire
10 l'hypertension ou les risques d'hypertension.

Définitions

Par "protéines blanches de la luzerne" on entend la fraction hydrosoluble des protéines de la luzerne. Les protéines blanches de la luzerne sont constituées à 65%
15 des deux sous unités de la Ribulose 1-5 biphosphate Carboxylase/Oxygénase (RubisCO) (Douillard, 1985) et à 35% d'un ensemble très hétérogène de protéines.

Le procédé de fractionnement et de purification des protéines blanches de luzerne est décrit dans la demande de brevet WO 02/058482. Brièvement les feuilles de Luzerne sont récoltées, broyées et pressées à froid pour conduire à un tourteau
20 de pressage et à un jus vert. Le jus vert se compose de protéines vertes insolubles issues des lamelles chloroplastiques et de protéines blanches solubles (dont la RubisCO) sous forme d'un jus brun. Le jus brun est récupéré après décantation et clarifié sur un filtre rotatif. Les protéines blanches sont alors précipitées par acidification jusqu'à un pH compris entre 4 et 5, puis lavées par microfiltration
25 tangentielle. Du fait de la présence et de l'oxydation de polyphénols, la solution de protéines blanches (enrichie en RubisCO) est colorée (brune).

Un "hydrolysats de protéines blanches de la luzerne" désigne un mélange de polypeptides et/ou oligopeptides, obtenu par hydrolyse de protéines blanches de la luzerne par une ou plusieurs enzymes protéolytiques. On entend par "hydrolysats
30 total" un mélange de polypeptides et/ou oligopeptides tel qu'obtenu après hydrolyse enzymatique, sans étape de purification ou de séparation ultérieure. Dans le cadre de la présente invention, on désigne par "Hydrolysats 1" un hydrolysats total de protéines blanches de la luzerne obtenu par un procédé d'hydrolyse enzymatique en batch tel que décrit plus loin. On désigne par "Hydrolysats 2" un hydrolysats total de

protéines blanches de la luzerne obtenu par un procédé d'hydrolyse enzymatique en continu couplé à une décoloration et à une déminéralisation tel que décrit plus loin. Par extension le terme hydrolysats englobe également des fractions d'hydrolysats susceptibles d'être obtenues par fractionnement d'un hydrolysats total.

5 On entend par "alicament" ou "aliment fonctionnel" un aliment conventionnel, et qui a pour caractéristique de procurer des effets physiologiques bénéfiques dépassant ses fonctions nutritionnelles habituelles ou de réduire le risque de maladies chroniques.

10 L'expression "nutraceutique" est utilisée pour désigner un produit fabriqué à partir de substances alimentaires, présenté sous forme de comprimé, de poudre, de potion ou d'autre formes médicinales habituellement non associées à des aliments, et qui procure un bénéfice physiologique ou protecteur contre les maladies chroniques.

15 L'"enzyme de conversion de l'angiotensine I" ou "ACE" (peptidyl dipeptidase A, EC 3.4-15.1) est une métallopeptidase à zinc qui joue un rôle important dans le maintien de la pression sanguine. Cette enzyme, découverte en 1956 par Skeggs et al. est l'enzyme clé du système rénine angiotensine. Elle clive l'angiotensine I (décapeptides inactif) en angiotensine II (hypertenseur puissant) et en dipeptide C terminal histidy-leucine (Yang et al., 1970 ; Erdos, et al., 1987). L'ACE, joue
20 également sur le système kinine-kallikréine en clivant la bradykinine qui est un peptide vasodilatateur, antagoniste de l'angiotensine II (Skidgel et al.,1993 ; Corvol, et al.,1995). L'activité de l'ACE concourt donc nettement à l'augmentation de la pression artérielle dans l'organisme.

25 Par "activité opioïde" ou "activité morphinomimétique" on désigne une activité biologique similaire à celle exercée par la morphine, ou ses dérivés. En particulier des peptides opioïdes sont définis comme des peptides ayant une affinité pour les récepteurs opiacés et présentant un effet morphinomimétique inhibé par la naloxone. Les récepteurs opioïdes, principalement μ , δ , σ et κ , sont localisés dans les systèmes nerveux, endocrinien, immunitaire et dans le tractus intestinal des
30 mammifères. Par administration intracérébrale, ces peptides opioïdes modulent les comportements sociaux et produisent un effet analgésique (Chang et al., 1982). Par ingestion, ces peptides exercent une action sur la motricité et sur les échanges intestinaux en prolongeant le temps du transit gastro-intestinal, en exerçant une

action anti-diarrhéique et en modulant le transport intestinal d'acides aminés (Meisel, 1997).

Procédé de préparation d'hydrolysat de protéines blanches de luzerne

5 Les résultats des inventeurs ont montré qu'une hydrolyse simple en batch des protéines blanches de la luzerne produisait un hydrolysat présentant une activité inhibitrice de l'ACE *in vitro* largement supérieure aux valeurs de l'art antérieur (CI₅₀ de 131,1 µg.ml⁻¹ pour l'hydrolysat appelé "Hydrolysat 1" contre une CI₅₀ d'environ 300 µg.ml⁻¹ pour les hydrolysats les plus actifs décrit dans l'art antérieur, issus de
10 protéines d'origines végétale et animale confondues végétaux.

L'invention concerne donc un procédé de préparation d'un hydrolysat de protéines blanches de luzerne comprenant les étapes consistant à effectuer une hydrolyse enzymatique en batch d'une solution de protéines blanches de luzerne.

L'hydrolyse est avantageusement effectuée à pH basique afin de générer
15 des peptides présentant une taille compatible avec l'activité antihypertensive désirée et de manière à obtenir un rendement d'hydrolyse des protéines blanches correct. L'hydrolyse est donc effectuée par une ou plusieurs protéases basiques, de préférence par l'Alcalase® et/ou la Neutrase® (Novozymes). L'activité d'inhibition de l'ACE et l'activité opioïde, contribuant à l'effet antihypertenseur, sont dépendantes de
20 la séquence des peptides générés au cours de l'hydrolyse et donc de la spécificité de coupure de la ou des protéases utilisées. Ainsi, dans la littérature, les valeurs de CI₅₀ vis-à-vis de l'ACE sont clairement dépendantes de la protéase utilisée et peuvent varier d'un facteur 5 pour une même protéine. Le choix de l'enzyme est également déterminant pour l'activité opioïde.

25 La réaction est arrêtée par traitement thermique, afin de dénaturer l'enzyme, après un temps de réaction suffisant de manière à obtenir le degré d'hydrolyse maximum qui peut être atteint avec l'enzyme utilisée tout en générant les plus petits peptides au meilleur rendement. Le temps optimal de réaction peut être aisément déterminé par l'homme du métier par des essais de routine. Par exemple, on peut
30 effectuer l'hydrolyse d'une solution de protéines blanches de luzerne à l'aide d'un mélange d'Alcalase® (activité subtilisine Carlsberg) et de Neutrase® (protéase neutre, activité métalloprotéase à zinc) (Novozymes A/S), avec un rapport Enzyme/Substrat de 1/100, à un pH compris entre 7 et 8, à une température comprise entre 40 et 60°C, de préférence à une température égale à 50°C, pendant

15 à 20 heures. La réaction d'hydrolyse peut être stoppée par traitement thermique à 85°C, pendant 20 à 30 minutes. La solution réactionnelle peut ensuite être clarifiée puis séchée, par exemple par atomisation.

Les inventeurs ont, contre toute attente, mis en évidence que l'utilisation d'un
5 procédé d'hydrolyse enzymatique en continu des protéines blanches de la luzerne conduisait à un hydrolysât produisant une inhibition de l'ACE bien plus puissante que l'hydrolysât obtenu par hydrolyse simple en batch (CI_{50} de $8,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour l'hydrolysât appelé "Hydrolysât 2"). L'utilisation de ce procédé pour produire un hydrolysât de protéines blanches de la luzerne est donc particulièrement avantageux
10 compte tenu de l'activité antihypertensive de l'hydrolysât obtenu.

L'invention concerne donc un procédé de production d'un hydrolysât de protéines blanches de la luzerne qui repose sur une hydrolyse enzymatique en continu couplée à une décoloration et à une déminéralisation. Plus spécifiquement ledit procédé de production d'un hydrolysât de protéines blanches de la luzerne
15 comprend les étapes consistant à :

a) hydrolyser une solution de protéines blanches de luzerne par de la Subtilisine carlsberg (E.C. 3.4.21.62), de préférence par la Delvolase®, pendant 8 heures, à une température comprise entre 20°C et 60°C et à un pH compris entre 8 et 10, dans un réacteur enzymatique à membrane, l'hydrolyse étant couplée à une
20 ultrafiltration en continu de la solution réactionnelle sur membrane ayant un seuil de coupure compris entre 5 et 20 kDa ;

b) décolorer le perméat obtenu à l'issue de l'ultrafiltration en éliminant les polyphénols végétaux contenus dans le perméat ;
le perméat décoloré ainsi obtenu constituant une solution d'hydrolysât de protéines
25 blanches de luzerne.

Avantageusement, ledit procédé peut comprendre les étapes supplémentaires consistant à :

c) éventuellement, dessaler le perméat décoloré obtenu à l'étape b) ; et
d) sécher le perméat décoloré et éventuellement dessalé obtenu de
30 manière à obtenir une poudre d'hydrolysât des protéines blanches de luzerne.

Le réacteur à membrane utilisé pour l'étape d'hydrolyse peut comporter indistinctement une membrane minérale ou organique. L'étape d'hydrolyse est de préférence menée en continu, c'est-à-dire qu'une solution de protéines blanches de luzerne est régulièrement injectée dans le volume réactionnel. Celui-ci est maintenu

constant grâce au couplage avec l'ultrafiltration au cours de laquelle le perméat est soutiré en continu, tandis que le rétentat est réintroduit dans le volume réactionnel.

De préférence, l'étape d'hydrolyse est effectuée à une température de 40°C. De préférence également, l'étape d'hydrolyse est effectuée à un pH de 9,5. De préférence encore, l'ultrafiltration est effectuée sur membrane ayant un seuil de coupure de 10 kDa. Selon un mode de réalisation préféré, l'étape d'hydrolyse peut être effectuée à 40°C, dans une solution réactionnelle de pH 9,5

Les concentrations relatives des protéines blanches de luzerne et de l'enzyme dans le milieu réactionnel peuvent être aisément ajustées par l'homme du métier. La Delvolase® est une sérine-protéase alcaline de *Bacillus licheniformis* produite par DSM food specialities (Seclin, France) dont l'activité enzymatique majoritaire est de type Subtilisine carlsberg (E.C. 3.4.21.62). Il s'agit d'une protéine de 274 acides aminés, d'un poids moléculaire d'environ 27 kDa et de point isolélectrique de 9,4. La Delvolase® est capable d'hydrolyser la chaîne B de l'insuline, ainsi que la tributyrine et la triacétine ; l'enzyme est inhibée par le fluor méthane sulfonyl-phénylique (PMSF), par le phosphofluoridate diisopropylique (DFP) et par l'inhibiteur de trypsine de la pomme de terre, mais pas par l'inhibiteur de trypsine du soja. Dans le procédé selon l'invention, les conditions d'hydrolyse par la Delvolase® sont telles qu'elles permettent d'effectuer une hydrolyse suffisamment poussée pour générer un hydrolysats satisfaisant en termes de taille peptidique et de solubilité. Par exemple, l'étape d'hydrolyse peut être effectuée pendant 8 heures dans un milieu réactionnel de 32 litres, avec une concentration en protéines blanches de luzerne de 30 g.l⁻¹ et une concentration d'enzyme Subtilisine carlsberg (Delvolase® standardisée à 5600 DU/g) de 2,4 g.l⁻¹. L'ultrafiltration peut alors être effectuée sur membrane, en particulier membrane tubulaire en oxyde de zirconium, ayant une surface filtrante totale de 0,32 m², avec un débit de filtration de 4 l.h⁻¹ avec un temps de séjour de 8 heures.

A l'issue de l'étape d'hydrolyse/ultrafiltration le perméat obtenu est encore riche en polyphénols qui donnent une coloration brune au perméat. On réalise donc une décoloration du perméat en séparant les polyphénols des protéines de la solution, par exemple par chromatographie telle qu'une chromatographie d'échange d'anions. Le perméat est préalablement acidifié à un pH compris entre 5 et 6, de préférence à pH 5,3. L'acidification permet de charger les peptides et les phénols de façon à ce que les peptides soient élués et les phénols restent accrochés à la résine.

Le perméat décoloré peut ensuite être déssalé, par exemple par électrodialyse. Cette méthode de dessalage permet en effet d'atteindre un rendement de récupération de peptides proche de 100 % et une bonne productivité. Le dessalage n'est pas obligatoire. Il est mis en oeuvre de façon à standardiser le produit en terme de composition minérale.

Le perméat décoloré et éventuellement déssalé est ensuite séché par toute méthode appropriée bien connue de l'homme de l'art. De manière préférentielle, le perméat est séché par atomisation avec une température d'entrée d'air comprise entre 150°C à 180°C, de préférence environ 170°C, et une température de sortie d'air comprise entre 80°C à 100°C, de préférence environ 90°C. Le séchage permet d'assurer une bonne conservation et une standardisation de l'hydrolysate de protéines blanches de luzerne.

L'hydrolysate ainsi obtenu est dit "total", en ce sens qu'il n'a subi aucune étape ultérieure de fractionnement.

Hydrolysats de protéines blanches de luzerne

L'invention concerne également un hydrolysate de protéines blanches de luzerne, en particulier un hydrolysate susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'invention.

De préférence ledit hydrolysate est susceptible d'être obtenu par un procédé d'hydrolyse enzymatique en continu couplée à une décoloration et à une déminéralisation tel que défini ci-dessus. Un hydrolysate total obtenu selon ce procédé présente une CI_{50} vis-à-vis de l'ACE de CI_{50} de $8,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (voir l'exemple 4). Une analyse par chromatographie d'exclusion sur une colonne Superdex peptide HR 10/30 (Pharmacia, Uppsala, Suède) couplée à une mesure de l'activité inhibitrice de l'ACE des éluats a montré que cet hydrolysate comprend quatre fractions peptidiques correspondant à un pic d'activité inhibitrice vis-à-vis de l'ACE (Figure 1) ; ces fractions peptidiques, appelées fraction I (FI), fraction II (FII), fraction III (FIII) et fraction IV (FIV), ont un poids moléculaire d'environ 2200 Da, 1450 Da, 650 et 300 Da, et une IC_{50} vis-à-vis de l'ACE de $7,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $7,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $15,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ et $3,6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ respectivement.

Alternativement ledit hydrolysate est susceptible d'être obtenu par un procédé d'hydrolyse enzymatique en batch tel que décrit ci-dessus. Un hydrolysate total

obtenu selon ce procédé présente une CI_{50} vis-à-vis de l'ACE de 131,1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (voir l'exemple 3).

L'hydrolysate au sens de l'invention peut être un hydrolysate total, tel qu'obtenu directement après hydrolyse des protéines blanches de luzerne, ou peut être une fraction d'hydrolysate total. En effet, le fractionnement d'un hydrolysate selon l'invention, par exemple en fonction de la masse moléculaire, peut conduire à l'obtention de fractions présentant des activités d'inhibition de l'ACE variables. Les fractions présentant le pouvoir inhibiteur le plus élevé sont donc particulièrement préférées.

Ces fractions peuvent être produites par fractionnement de l'hydrolysate total selon toute méthode de séparation connue de l'homme de l'art. A titre d'exemples non limitatifs, on peut citer des méthodes de séparation en fonction du poids moléculaire, notamment par chromatographie d'exclusion, en fonction du caractère hydrophobe ou hydrophile, par exemple par chromatographie en phase inverse, en fonction de la charge, par exemple par chromatographie échangeuse d'ions. Une activité inhibitrice vis-à-vis de l'ACE peut être observée avec une fraction d'hydrolysate total regroupant des polypeptides ou oligopeptides d'un poids moléculaire inférieur à 5000 Da. Les inventeurs ont plus particulièrement montré que lorsque l'hydrolysate total était soumis à une chromatographie d'exclusion de taille, la fraction la plus active vis-à-vis de l'ACE était celle regroupant les molécules de plus bas poids moléculaire (fraction IV décrite ci-dessus comme ayant un poids moléculaire d'environ 300 Da).

Un hydrolysate de protéines blanches de luzerne selon l'invention, est donc constitué de préférence par des polypeptides ou oligopeptides de poids moléculaire inférieur à 5000 Da, de préférence encore inférieur à 2500 Da, à 2200 Da, à 1450 Da, à 1000 Da, à 650 DA ou encore à 500 Da. Avantageusement un hydrolysate de protéines blanches de luzerne selon l'invention contient des polypeptides ou oligopeptides de poids moléculaire compris entre 5000 et 200 Da, de préférence entre 2200 et 200 Da, ou de préférence encore entre 1450 et 200 Da.

L'invention concerne plus particulièrement un hydrolysate de protéines blanches de luzerne constitué par une fraction de bas poids moléculaire, c'est-à-dire une fraction constituée par des oligopeptides ou polypeptides ayant un poids moléculaire compris entre 400 Da et 200 Da, de préférence encore ayant un poids moléculaire compris entre 300 et 310 Da.

Un hydrolysat de protéines blanches de luzerne selon l'invention, c'est-à-dire un hydrolysat total ou une fraction d'hydrolysat total, présente de préférence une CI_{50} vis-à-vis de l'ACE inférieure à $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, de préférence encore inférieure à $150 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, à $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, à $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, à $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ou encore à $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

5 L'hydrolysat selon l'invention peut être sous forme de poudre ou de solution.

Utilisation d'hydrolysat de protéines blanches de luzerne pour le traitement de l'hypertension artérielle

10 Les inventeurs ont mis en évidence que des hydrolysats de protéines blanches de luzerne, ou des fractions de ceux-ci, présentent une activité inhibitrice de l'ACE *in vitro*, sont capables d'inhiber le péristaltisme intestinal, une inhibition indicatrice d'une activité morphinomimétique, et produisent une réduction de la pression artérielle dans un modèle animal d'hypertension. L'ensemble de ces résultats démontre donc que les hydrolysats de protéines blanches de luzerne
15 présentent une activité antihypertensive.

L'invention est donc relative à une composition pharmaceutique comprenant un hydrolysat de protéines blanches de luzerne dans un excipient pharmaceutiquement acceptable. Ledit hydrolysat peut être un hydrolysat total ou une fraction d'hydrolysat total.

20 La composition pharmaceutique selon l'invention peut en particulier comprendre un hydrolysat total de protéines blanches de luzerne constitué par des oligopeptides ou polypeptides de poids moléculaire inférieur à 5000 Da, de préférence encore inférieur à 2500 Da, à 2200 Da, à 1450 Da, à 1000 Da, à 650 Da ou encore à 500 Da. Avantageusement ledit hydrolysat de protéines blanches de
25 luzerne contient des polypeptides ou oligopeptides de poids moléculaire compris entre 5000 et 200 Da, de préférence entre 2200 et 200 Da, entre 1450 et 200 Da, entre 400 Da et 200 Da, ou de préférence encore ayant un poids moléculaire compris entre 300 et 310 Da.

30 De préférence la composition pharmaceutique selon l'invention comprend un hydrolysat total de protéines blanches de luzerne qui présente une CI_{50} vis-à-vis de l'ACE inférieure à $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, de préférence encore inférieure à $150 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, à $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, à $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, à $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ou encore à $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Par "excipient" ou "véhicule pharmaceutiquement acceptable", on entend tout solvant, milieu de dispersion, agents retardant l'absorption etc, qui ne produisent pas de réaction secondaire, par exemple allergique, chez l'humain ou l'animal.

L'invention concerne aussi l'utilisation d'un hydrolysat de protéines blanches de luzerne pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement de l'hypertension artérielle.

L'invention propose aussi une méthode de traitement de l'hypertension artérielle comprenant l'administration d'un hydrolysat de protéines blanches de luzerne à un sujet le nécessitant.

Dans le contexte de la présente invention, le terme "sujet" désigne un mammifère, tel qu'un humain, ou un animal non-humain, tel qu'un rat, une souris, un chien, un chat, un cheval, un porc.

L'hydrolysat peut être administrée selon toute voie appropriée. Préférentiellement, l'hydrolysat est administré par voie orale. Dans ce cas, les compositions de l'invention se trouvent sous la forme de gélules, comprimés effervescents, comprimés nus ou enrobés, sachets, dragées, ampoules ou solutés buvables, microgranules. Les formes pour l'administration orale sont préparées par mélange de l'hydrolysat avec différents types d'excipients ou de véhicules tels que des charges, des agents de désagrégation (ou de délitement), des liants, des colorants, des agents correcteurs de goût et analogues, et puis, mise en forme du mélange.

La posologie dépend naturellement du mode d'administration, de l'âge du patient et de son état.

Produits nutraceutiques, aliments fonctionnels

Les protéines blanches de la luzerne sont d'une haute qualité nutritionnelle du fait de leur aminogramme équilibré et de leur richesse en acides aminés essentiels. Les hydrolysats de protéines blanches de luzerne selon l'invention ont donc l'avantage de présenter ces qualités nutritionnelles associées en plus à un effet hypotenseur.

L'invention propose donc un aliment fonctionnel à activité antihypertensive comprenant un hydrolysat de protéines blanches de luzerne. Ledit hydrolysat peut être un hydrolysat total ou une fraction d'hydrolysat total.

Un aliment fonctionnel selon l'invention peut prendre la forme d'un aliment, quel qu'il soit, complétement par de l'hydrolysate de protéines blanches de luzerne. L'hydrolysate étant soluble à tout pH il peut en effet être aisément ajouté à un produit alimentaire fini ou au cours de son procédé de fabrication.

5 Ledit aliment peut être un produit laitier (lait, produit laitier fermenté tel qu'un yaourt, un yaourt à boire, margarine, crème glacée), une boisson (eau, jus de fruit), un produit céréalier (céréales, barre céréalière), ou toute autre forme appropriée.

L'invention propose également un produit nutraceutique à activité antihypertensive comprenant un hydrolysate de protéines blanches de luzerne. Ledit
10 produit nutraceutique peut prendre la forme de poudres, liquides, gels, comprimés, pilules, gélules (par exemple gastroprotectrices), ou de tout autre forme solide qui peut être choisie par l'homme du métier en fonction du mode de délivrance souhaité (instantané ou contrôlé dans le temps, par exemple). Les poudres peuvent être
15 scellées dans des sachets ou tout autre contenant facilitant la consommation par un individu. Des produits nutraceutiques sous forme liquide ou gel peuvent être conditionnés sous forme de dose unique, par exemple dans des emballages plastique déchirables.

La teneur en hydrolysate dans ledit aliment fonctionnel ou ledit produit nutraceutique selon l'invention n'est pas particulièrement limitée. Usuellement la
20 teneur en poids de l'hydrolysate par rapport au poids du produit nutraceutique est comprise entre 0,1 et 100 %, de préférence entre 50 et 90 %, de préférence encore entre 70 et 80 %. La teneur en poids de l'hydrolysate par rapport au poids de l'aliment fonctionnel est compris entre 0,1 et 30 %, de préférence entre 2 et 20 %, la teneur en hydrolysate étant choisie en fonction de la matrice alimentaire. Préférentiellement,
25 l'hydrolysate est présent en une quantité efficace pour l'obtention d'un effet antihypertenseur chez l'individu consommant l'aliment ou le produit nutraceutique selon l'invention, compte tenu de la quantité d'aliment ou de produit nutraceutique ingérée par ledit individu.

Avantageusement l'aliment ou produit nutraceutique selon l'invention peut
30 comprendre un hydrolysate total de protéines blanches de luzerne constitué par des oligopeptides ou polypeptides de poids moléculaire inférieur à 5000 Da, de préférence encore inférieur à 2500 Da, à 2200 Da, à 1450 Da, à 1000 Da, à 650 DA ou encore à 500 Da. Avantageusement ledit hydrolysate de protéines blanches de luzerne contient des polypeptides ou oligopeptides de poids moléculaire compris

entre 5000 et 200 Da, de préférence entre 2200 et 200 Da, entre 1450 et 200 Da, entre 400 Da et 200 Da, ou de préférence encore ayant un poids moléculaire compris entre 300 et 310 Da.

De préférence l'alicament ou produit nutraceutique selon l'invention
5 comprend un hydrolysats total de protéines blanches de luzerne qui présente une CI_{50} vis-à-vis de l'ACE inférieure à $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, de préférence encore inférieure à $150 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, à $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, à $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, à $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ou encore à $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Les figures et exemples ci-dessous illustrent l'invention sans en limiter le
10 contenu.

FIGURES

La Figure 1 représente le chromatogramme FPLC sur superdex peptide de l'Hydrolysats 2 total (10 g/l) à 226 nm et le suivi de l'activité inhibitrice de l'ACE.

15 La Figure 2 représente le chromatogramme CLHP en phase inverse sur colonne C_{18} de l'Hydrolysats 2 total à $10 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

La Figure 3 montre les chromatogrammes CLHP des quatre fractions actives FI, FII, FIII, et FIV, issues de la chromatographie FPLC de l'Hydrolysats 2. Les histogrammes des dosages d'activité de chaque pic sont également représentés.

20 La Figure 4 illustre l'effet morphinomimétique de l'Hydrolysats 2 à différentes doses sur les contractions spontanées de l'intestin isolé de lapin. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm déviation standard. * $P < 0,05$. *** $P < 0,001$.

La Figure 5 montre l'effet temporel de l'Hydrolysats 2 (0,5 g/kg) sur la pression artérielle systolique de rats spontanément hypertendus (RSH) après administration
25 orale. Les mesures sont présentées sous forme de moyenne \pm déviation standard (n=4). *** $P < 0,001$.

La Figure 6 représente l'effet de la dose d'Hydrolysats 2 administrée sur la pression artérielle systolique de rats RSH. Les mesures sont exprimées en moyenne
30 \pm déviation standard (n=4) par rapport à la pression systolique des rats Témoins. *** $P < 0,001$.

EXEMPLES

EXEMPLE 1 : Préparation des hydrolysats de protéines blanches de luzerne

Procédé industriel d'extraction des protéines blanches de luzerne

La luzerne éventuellement préalablement grossièrement broyée, subit dans un premier temps une étape de pressage dans une presse à vis (type presse à oléagineux pour l'obtention de l'huile), qui génère un tourteau (luzerne pressée) et un jus vert. Ce jus vert, hautement hétérogène, contient les protéines vertes et blanches.

Le jus de pressage de la luzerne, dont le pH est compris entre 5,8 et 6,2, est légèrement alcalinisé à pH 7,3-7,5 par exemple par ajout d'une solution de soude 5N avant d'être réchauffé à 40°C dans un échangeur platulaire. L'adjonction d'agent alcalin permet également la déstabilisation de la structure colloïdale des protéines vertes après précipitation de celles-ci à 50°C-60°C par injection de vapeur.

Le précipité ainsi densifié de lipoprotéines vertes est séparé par centrifugation et filtration qui génèrent une boue verte et une fraction soluble contenant les protéines blanches de luzerne. Ces protéines sont précipitées à pH 4-5 par exemple par une solution d'acide chlorhydrique 2,5N avant d'être séparées par centrifugation puis purifiées par diafiltration sur des membranes minérales de porosité 0,2 microns.

La crème de protéine titrant 80-90% de protéines blanches de luzerne dans la matière sèche est la matière première utilisée dans les hydrolyses enzymatiques en batch ou en continu.

Le produit peut toutefois être séché par atomisation avant d'être traité par des protéases sans que cela ne conduise à des modifications qualitatives des hydrolysats.

Hydrolyse enzymatique en batch du concentré protéique couplée à une clarification puis à une atomisation (PROCEDE 1)

Les protéines blanches de luzerne purifiées selon le procédé ci-dessus sont ensuite soumises à une hydrolyse enzymatique par d'un mélange d'Alcalase® et de Neutrase® (Novozymes), réalisée en batch, à une matière sèche de 7,5% ; un rapport Enzyme/Substrat de 1/100, à une température comprise entre 40 et 60°C, de

préférence 50°C, à un pH compris entre 7 et 8, pendant 15 à 20 heures. La réaction enzymatique est arrêtée par traitement thermique à 85°C pendant 20 à 30 minutes. Le produit est par la suite clarifié dans une centrifugeuse à assiettes, concentré par évaporation, pasteurisé puis séché par atomisation.

5 L'hydrolysate ainsi obtenu est désigné "Hydrolysate 1" dans la suite de la description.

Hydrolyse enzymatique continue du concentré protéique dans un réacteur enzymatique à membrane couplée à une décoloration et à une
10 ***déminéralisation, puis à une atomisation (PROCEDE 2)***

Le procédé mis en œuvre pour produire l'hydrolysate s'inspire d'un procédé précédemment développé par les inventeurs (Prevot-D'Alvise et al., 2003). Le procédé précédemment décrit, en particulier l'étape d'hydrolyse, a été modifié de manière à effectuer une hydrolyse plus poussée des protéines blanches de luzerne
15 afin de produire un mélange de peptides de taille compatible avec l'activité antihypertensive recherchée.

L'hydrolyse de la solution de protéines blanches de luzerne (30 g.l⁻¹) par la subtilisine (2,4 g.l⁻¹) est menée en continu à 40 °C et à pH 9,5 dans un réacteur enzymatique à membrane dont le volume réactionnel est fixé à 32 litres. Ces
20 conditions opératoires (volume, pH et températures) sont maintenues constantes au cours du procédé par un automate (Setric Génie Industriel). Le pH est régulé par une solution de NaOH (3 M), le volume réactionnel est maintenu par une pompe péristaltique qui injecte régulièrement une solution de concentré protéique à 30 g.l⁻¹.

L'ultrafiltration, couplée à l'hydrolyse, est réalisée par deux modules
25 thermostatés à 40°C de 7 membranes tubulaires en oxyde de zirconium (hauteur 1,2 m, diamètre 6 mm, soit une surface filtrante de 0,32 m²). Les membranes utilisées présentent un seuil de coupure de 10 kDa (M5 Carbosep). Une pompe centrifuge assure le soutirage et l'envoi de l'hydrolysate dans le système d'ultrafiltration (UF). Le filtrat est maintenu constant avec un débit de filtration de
30 4 l.h⁻¹ en augmentant la pression transmembranaire au cours du procédé, de 1,5 à 3,75 bars, grâce à deux vannes placées en entrée et en sortie du module d'UF. Le perméat est soutiré en continu, tandis que le rétentat est réintroduit dans le volume réactionnel. Le temps de séjour dans le réacteur (temps réactionnel d'hydrolyse) est de 8 heures.

Malgré la décoloration par la membrane, le filtrat produit est encore riche en polyphénols végétaux. Le filtrat est donc ajusté à pH 5 par HCl 5N avant d'être déposé sur une colonne Bioprocess Glass Column BPG 100/950 Pharmacia (58cm x 10 cm) remplie d'une résine Amberlite IRA 900 Cl (Rhöm et Hass) équilibrée dans un tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1 M pH 5. La colonne est éluée avec un débit linéaire de 4,23 cm.min⁻¹. A l'issue de l'élution, le filtrat est presque parfaitement décoloré.

Le filtrat décoloré est ensuite dessalé par un électrodialyseur EUR2D-5P11 (Eurodia industrie S.A.-Wissous-France) de 75 cellules (46 x 10 cm) d'une surface de membrane de 3,45 m² (1,725 m² de membrane anionique et 1,725 m² de membrane cationique). Une tension de 70 V et un courant variable sont appliqués tout au long de l'étape de dessalage.

Le filtrat décoloré et dessalé est ensuite atomisé (Niro atomizer de type minor production) avec une température d'entrée d'air de 170 °C et une température de sortie d'air de 90 °C au débit de 10 l.h⁻¹.

L'hydrolysate ainsi obtenu est désigné "Hydrolysate 2" dans la suite de la description. L'analyse à 110 °C par une balance dessiccateur permet d'établir que le taux de matière sèche de la poudre d'hydrolysate atomisé est de 92% (p/p). Le taux de peptide est déterminé par la méthode de Kjeldahl (Association of official Analytical Chemistry, 1975) à 86,6 % ± 1,3 (n = 4) de la matière sèche (p/p), le système étant calibré avec un étalon externe d'urée.

EXEMPLE 2 : Test d'inhibition de l'ACE *in vitro*

L'ACE est capable d'hydrolyser des substrats synthétiques tels que l'hippuryl-L-histidyl-L-Leucine (HHL) en acide hippurique (AH) et en histidyl-leucine (HL) (Cushman et Cheung, 1971). Classiquement, l'acide hippurique libéré est dosé par spectrophotométrie UV à 228 nm après extraction par l'acétate d'éthyle. Récemment, des méthodes de dosage de l'acide hippurique directement dans le milieu réactionnel par CLHP en phase inverse ont été développées (Tauzin et al., 2002).

Le substrat synthétique HHL a été choisi pour mettre en œuvre le test au laboratoire. Les méthodes de dosage de l'acide hippurique par spectrophotométrie et CLHP en phase inverse ont été évaluées avec le captopril, un inhibiteur de l'ACE.

.Les CI_{50} déterminées à partir du dosage spectrophotométrique et CLHP de l'acide hippurique sont proches ou égales à la valeur référencée pour le captopril (1,5 nM, Vermeissen et al., 2002). La méthode de dosage direct du produit par CLHP, qui présentait toutefois les incertitudes les plus faibles, a été choisie pour réaliser les tests d'inhibition de l'ACE.

L'activité d'inhibition de l'ACE est donc testée par la méthode de Cushman et Cheung (1971) légèrement modifiée. 200 μ l d'une solution de substrat Hippuryl Histidyl Leucine (HHL) 5mM, dans du tampon borate de sodium 0,1M, NaCl 0,3M, pH 8,3, sont mélangés à 80 μ l d'une solution de peptides repris dans le même tampon et préincubés dans des tubes à hémolyse à 37°C pendant 3 minutes. La réaction enzymatique est initiée en ajoutant 20 μ l d'une solution d'ACE de poumon de lapin (Sigma) à 0,1 U/ml dans le tampon borate de sodium 0,1M, NaCl 0,3M, pH 8,3. La réaction est arrêtée après 30 minutes d'incubation à 37 °C par 250 μ l d'HCl 0,1M. Un témoin d'activité enzymatique est réalisé dans les mêmes conditions avec 80 μ l de tampon sans peptide. La libération d'acide hippurique par autolyse d'HHL est évaluée dans les mêmes conditions en remplaçant les 20 μ l de solution enzymatique par 20 μ l de tampon borate de sodium 0,1M, NaCl 0,3M, pH 8,3. Chaque essai est réalisé en trois fois.

L'acide hippurique (AH) libéré est quantifié par CLHP en phase inverse sur une colonne Vydac C18 (4,6 x 25 cm). La colonne de phase inverse est connectée à une pompe waters 600 E. 50 μ l d'échantillon sont déposés sur la colonne après filtration sur filtre en acétate de cellulose 0,22 μ m et élué par un gradient linéaire de 13 à 42,5 % d'acétonitrile, 0,1 % TFA, à un débit de 1 ml/min. L'élution est suivie par un détecteur UV à barrette de diode Waters 2996 à 228 nm.

L'inhibition de l'activité ACE en pourcentage est calculée de la façon suivante :

$$I(\%) = \frac{AH(P) - AH(C)}{AH(T) - AH(C)} \times 100$$

où P: test avec les peptides,

T: test sans les peptides (témoin d'activité enzymatique),

C: test sans enzyme (contrôle d'autolyse d'HHL).

Une courbe d'inhibition linéarisée de l'ACE est réalisée en reportant le pourcentage d'inhibition mesuré ($I(\%)$) en fonction du Log de la concentration en

peptides ($\log[\text{peptides}]$). L'équation de la droite de régression linéaire permet de calculer la concentration en peptide nécessaire à inhiber 50% de l'activité de l'ACE (CI_{50}).

5

EXEMPLE 3 : Inhibition *in vitro* de l'ACE par l'Hydrolysats 1 :

L'activité inhibitrice de l'ACE de l'Hydrolysats 1 total est déterminée par le calcul de sa CI_{50} . Le milieu réactionnel du test enzymatique est ajusté à des concentrations croissantes en peptides. La droite de régression linéaire (% inhibition ACE = $39,981 \log[\text{peptide}] + 133,51$, $R^2 = 0,9997$) permet de calculer une valeur de CI_{50} de $131,1 \mu\text{g.ml}^{-1}$.

10

EXEMPLE 4 : Inhibition *in vitro* de l'ACE par l'Hydrolysats 2

L'activité globale de l'Hydrolysats 2 est déterminée par le calcul de sa CI_{50} . Le milieu réactionnel du test enzymatique est ajusté à des concentrations croissantes en peptide de $0 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $5,3 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $13,3 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $26,6 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $80 \mu\text{g.ml}^{-1}$ et $266,67 \mu\text{g.ml}^{-1}$, avant l'initiation de la réaction. Le milieu réactionnel pour chaque concentration est réalisé en triple exemplaire. Le milieu réactionnel est injecté sur la colonne de CLHP afin de doser l'acide hippurique, après arrêt de la réaction.

15

20

Le Tableau I présente les valeurs d'inhibition de l'ACE obtenues. Les résultats montrent que la gamme de concentration en peptide choisie permet de déterminer la CI_{50} . Les valeurs de concentration aux bornes ($5,3 \mu\text{g.ml}^{-1}$ et $266,67 \mu\text{g.ml}^{-1}$) entraînent, en effet, des inhibitions respectivement inférieure (42,3%) et supérieures (98,5%) à 50%.

25

Tableau I : Valeurs d'inhibition de l'ACE en fonction de la concentration en hydrolysats 2 déterminés à partir du dosage direct de l'acide hippurique par CLHP.

[Peptide] ($\mu\text{g/ml}$)	Log [Peptide] ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibition ACE (%) \pm (σ)
5,3	- 2,27	42,3 \pm (1,5)
13,3	- 1,87	58,8 \pm (2)
26,7	- 1,57	71 \pm (1,1)
80	- 1,09	89,4 \pm (0,7)
266,7	- 0,57	98,5 \pm (0,5)

La valeur d'inhibition obtenue avec 266,7 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de peptide n'est pas prise en compte dans la linéarisation logarithmique de la courbe d'inhibition de l'ACE par les peptides de l'hydrolysats 2 total car elle est trop élevée (supérieure à 95%). La droite de régression linéaire des points de la courbe permet de calculer une valeur de CI_{50} de 8,1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ pour l'Hydrolysats 2 total, ce qui est particulièrement actif. Les hydrolysats les plus actifs reportés dans la littérature présentent en effet une CI_{50} d'environ 300 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

EXEMPLE 5 : Inhibition *in vitro* de l'ACE par de fractions de l'Hydrolysats 2 produites par chromatographie d'exclusion stérique

L'Hydrolysats 2 total a été fractionné par une étape de chromatographie d'exclusion stérique en FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatographie*) sur colonne Superdex peptide.

Fractionnement par chromatographie d'exclusion stérique de l'Hydrolysats 2

100 μl d'une solution d'Hydrolysats 2 total à 10 g.l^{-1} en peptide dans le tampon d'éluion (Acétonitrile 30% v/v dans l'eau 0,1% v/v TFA) est déposé sur la colonne Superdex peptide HR 10/30 (Pharmacia, Uppsala, Suède), qui permet une séparation de peptide de taille comprise entre 100 Da et 7000 Da et sa limite d'exclusion est de 20000 Da.

Avant les dépôts d'hydrolysats, la courbe d'étalonnage de la colonne représentant le coefficient de partage (K_{av}) en fonction du log de la masse

moléculaire a été déterminée. Les étalons utilisés, β lactoglobuline (36000 Da), Ribonucléase A (13700 Da), chaîne B de l'insuline (3495,9 Da), Glutathion oxydé (612,6 Da), Glycine-Tyrosine (238 Da), ont été élués dans les mêmes conditions que l'hydrolysat.

5 La colonne est connectée à une pompe de FPLC (Fast Protein Chromatographie Liquid Pharmacia LKB Pump P-500) qui permet l'élu- tion de l'hydrolysat à $0,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ par une phase mobile d'acétonitrile 30% (v/v dans de l'eau), 0,1% TFA (v/v). L'élu- tion est suivie par un détecteur UV en ligne (Pharmacia LKB Uvicord SII), muni d'un filtre à 226 nm et lié à un enregistreur (Pharmacia
10 LKB.REC-102). L'éluat est fractionné par 500 μl grâce à un collecteur (Pharmacia LKB.FRAC-100). A l'issue de l'élu- tion (environ 100 minutes), chaque fraction est évaporée à sec sous vide, reprise dans le tampon borate de sodium 100 mM, NaCl 300 mM pH 8,3, et testée pour son activité vis-à-vis de l'ACE *in vitro*.

La figure 1 présente l'élu- tion de l'échantillon suivi à 226 nm et le suivi de
15 l'activité des fractions en parallèle. La figure montre que 4 fractions particulièrement actives sont individualisées au cours de l'élu- tion. L'étalonnage de la colonne permet d'établir les tailles moléculaires des peptides qui compose les fractions 1 (FI), 2 (FII), 3 (FIII) et 4 (FIV) autour de 2200 Da, 1450 Da, 650 Da et 300 Da, respectivement.

La quantité de peptide recueilli dans les quatre fractions est dosée par la
20 méthode "OPA", à partir d'une gamme étalon de l'Hydrolysat 2 total. Selon cette méthode, l'o-phthaldialdéhyde (OPA) et le β -mercaptoéthanol réagissent sur une amine primaire pour former un composé absorbant à 340nm. L' $\epsilon_{340 \text{ nm}}$ est d'environ $6000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ quel que soit l'acide aminé (Church et al., 1983). Une solution de réactif OPA est préparée extemporanément au dosage, selon la méthode décrite par
25 Goodno et al. (1981):

Le Tableau II rapporte les concentrations et la quantité de peptide dans chaque fraction. Ces résultats semblent corrélés l'observation du chromatogramme à 226 nm.

30 **Activité inhibitrice de l'ACE *in vitro***

Le milieu réactionnel du test enzymatique a été ajusté à des concentrations peptidique en FI, FII, FIII, et FIV de 0 à $13,33 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, de 0 à $266,67 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, de 0 à $26,67 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ et de 0 à $13,33 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivement. La figure 5 présente la linéarisation des courbes d'inhibition obtenue avec les quatre fractions. Les CI_{50} des

fractions 1, 2, 3 et 4, calculées à partir des équations des droites de régression linéaires sont $7,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $7,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $15,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ et $3,6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivement.

Le Tableau II présente le volume, la concentration en peptide, la quantité de peptide, la CI_{50} , et le nombre d'unité d'activité inhibitrice de l'ACE présent dans l'échantillon déposé sur la colonne (une unité d'activité d'inhibition de l'ACE représentant la quantité de peptide nécessaire pour inhiber 50% de l'activité enzymatique dans les conditions du test). Ces valeurs sont également reportées pour chacune des quatre fractions ainsi que le pourcentage de quantité de peptide et d'activité par rapport à ce qui a été déposé au départ.

Le Tableau II montre que 85,4% de la quantité de peptide déposée au total est recueillie dans les quatre fractions. En comparant avec le chromatogramme d'exclusion stérique, il semble que ce chiffre soit légèrement surévalué. Ceci semble être dû à la valeur du dosage peptidique de la fraction III. En effet, le chiffre de 41,9 % paraît nettement surévalué en observant le chromatogramme à 226 nm. Les CI_{50} des fractions I, II et IV sont inférieures à celle de l'hydrolysât total, ce qui indique une purification effective de peptide actif dans ces fractions. De façon surprenante, la CI_{50} de la fraction III est inférieure à celle de l'hydrolysât, ce qui peut être dû à la surévaluation du dosage peptidique.

Tableau II : Bilan des quantités de peptide et d'activité inhibitrice de l'ACE dans les quatre fractions actives issues de la chromatographie FPLC.

	Vol.(ml)	[pept.] ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	peptides (μg)	CI_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Activité (U)
Dépôt	0,1	10000	1000 (100%)	8,1	123,6 (100%)
FI	1,6	100	160 (16%)	7,1	22,6 (18%)
FII	1	210	210 (21%)	7,3	29 (23%)
FIII	1,55	270	419 (41,9%)	15,5	27 (22%)
FIV	1	65	65 (6,5%)	3,6	18 (15%)

Caractérisation des fractions actives de l'Hydrolysât 2 par CLHP sur phase inverse

Chacune des quatre fractions actives FI à FIV, issues de la FPLC sur superdex peptide, est évaporée à sec sous vide et reprise dans par 100 μl d'acétonitrile 30% v/v dans l'eau, TFA 0,1% v/v. Les peptides qui composent les

fractions sont ainsi aux mêmes concentrations que dans l'Hydrolysate 2 (puisque 100 µl d'Hydrolysate 2 ont été déposés sur la colonne superdex peptide).

100 µl des fractions et de l'hydrolysate 2 (à 10 g/l en peptide) sont déposés sur une colonne de phase inverse C₁₈ (4,6 mmx250 mm, Vydac Symmetry). La phase mobile est composée d'un mélange de solvant A (eau, TFA 0,1% v/v) et B (acétonitrile, TFA 0,1% v/v). L'élution de l'échantillon est réalisée à un débit de 1 ml.min⁻¹ par le gradient suivant : 0% B (100% A) à 28% B (72% A) en 50 minutes puis 28% B (72%A) à 47% B (53%A) en 20 minutes. Ce gradient est dispensé par une pompe de CLHP (WatersTM 600E). L'absorbance est enregistrée, entre 200 et 390 nm, au cours de l'élution, par un détecteur UV muni d'une barrette de diode (WatersTM 996). Les chromatogrammes sont interprétés à 226 nm (qui permet de détecter la liaison peptidique). Chaque fraction issue de la CLHP est évaporée à sec sous vide, reprise dans 1 ml de tampon borate de sodium 100 mM, NaCl 300 mM à pH 8,3 et testée pour son activité inhibitrice d'ACE.

La pureté des fractions CLHP les plus actives et les masses des structures qui la composent sont déterminées par spectrométrie de masse.

La figure 2, qui présente le chromatogramme CLHP en phase inverse de l'Hydrolysate 2 total, indique que l'Hydrolysate 2 est composé de très nombreux peptides, ce qui est attendu à l'issue de l'hydrolyse terminale d'un mélange protéique.

La Figure 3 présente les chromatogrammes CLHP en phase inverse des fractions I, II, III et IV de l'Hydrolysate 2, avec, en regard, les histogrammes représentant l'activité d'inhibition de chacun des pics. De la fraction I à la fraction IV, on observe un glissement des peptides actifs vers les faibles temps de rétention. Les peptides présentent en effet des tailles décroissantes de la fraction I à la fraction IV. La Figure 3 indique que la quasi-totalité des peptides présente une activité. Par ailleurs, les peptides qui présentent les temps de rétention les plus élevés sont peu ou pas actifs (peptides 22 à 27 de la fraction II et 25 à 30 de la fraction I). Ceci indique que tous les peptides de petite taille moléculaire présentent une activité d'inhibiteur de l'ACE. Toutefois, un certain nombre de pics se distinguent par leur activité.

La Figure 3 montre également que la fraction IV n'est constituée que d'un pic majoritaire et de trois pics minoritaires à 30 (pic 4), 27 (pic 3), 11 (pic 1) et 15 (pic 2) minutes de temps de rétention, respectivement. Cette fraction présentant l'activité inhibitrice de l'ACE la plus puissante (CI₅₀ à 3,6 µg/ml), les peptides qui la composent ont donc été caractérisés d'avantage.

EXEMPLE 6 : Caractérisation de la fraction IV de l'Hydrolysate 2

La quantité de peptide recueillie dans chaque pic CLHP après injection de
 5 100 µl et la quantité de peptides totale dans 100 µl de fraction IV est déterminée par
 un dosage OPA à partir de la gamme étalon d'hydrolysate. Les résultats sont reportés
 dans le Tableau III.

10 Tableau III : Bilan de la quantité de peptide dans les pics CLHP de la fraction
 IV et activité des pics à 65 ng/ml

Pics	F IV	1	2	3	4
Quantité de peptides (µg)	61,3	19,2	34,7	0,042	0,065
Activité à 65 ng/ml (%)	-	0	0	35	82

De façon surprenante, le pic 4, contient une très faible quantité de peptides
 par rapport aux autres pics, alors qu'il présente une absorbance majeure sur le
 chromatogramme CLHP. Dans une moindre mesure, la quantité de peptide dans le
 15 pic 3, comparée à celle des pics 1 et 2 apparaît aussi surprenant par rapport aux
 intensités des pics. La somme des quantités de peptide dans les quatre fractions
 représente 90 % de la quantité injectée au départ. Les 10 % manquant peuvent être
 dans les petits pics non dosés (autour de 5, 20 et 35 minutes de temps de rétention).
 Le bilan matière de l'étape de chromatographie semble donc être équilibré.

20 Un test d'activité a été réalisé pour ces quatre pics peptidiques à une même
 concentration de 65 ng.ml⁻¹. Les valeurs d'inhibition de l'ACE à cette concentration
 sont présentées dans le Tableau III. De façon surprenante, l'activité du pic 4 est très
 importante compte tenu de sa concentration si faible (82 % d'inhibition). L'activité du
 pic 3, bien que moindre (35 %) reste tout de même très élevée. En effet, l'étalonnage
 25 de la colonne indique que les peptides qui composent la fraction 4 présentent une
 taille moléculaire autour de 300 Da. La concentration pondérale de 65 ng/ml
 correspond donc à une concentration molaire d'environ 200 nM. Or les peptides
 inhibiteurs de l'ACE les plus actifs, produits par hydrolyse enzymatique de protéines
 agricoles, présentent une CI₅₀ autour de 2 µM.

La pureté des pics CLHP 3 et 4 et la masse de ces composants ont été déterminées par spectrométrie de masse en électrospray. Le pic 4 issu de la CLHP est composé d'un peptide pur de 304 Da. Ce chiffre est en accord avec la valeur déterminé, pour les peptides de la fraction 4, autour de 300 Da par étalonnage de la
5 colonne superdex (autour de 300 Da). Le pic 3 n'est pas pur et composé d'un peptide majoritaire de 363 Da.

La CI_{50} du pic 4 a été calculée afin de caractériser son activité. Le test enzymatique d'inhibition de l'ACE a été réalisé avec des concentrations en peptide de 0, 0,8, 2, 4, 6,65 et 10,6 ng/ml. L'équation de la droite de régression linéaire de la
10 courbe d'inhibition de l'ACE en fonction de la concentration en peptide permet de déterminer la CI_{50} à 10,5 ng/ml, soit 35 nM. Cette valeur révèle une activité très puissante, plus en rapport avec les valeurs des inhibiteurs de l'ACE issus de la chimie combinatoire (de 1,5 à 30 nM) que d'une activité portée par un peptide.

15

EXEMPLE 7 : Détection d'une activité morphinomimétique

Un morceau d'iléon de lapin d'une longueur de 2 cm maximum est immergé dans une cuve à organe isolée remplie de tampon physiologique tyrode thermostaté à 37°C et oxygéné. Le morceau d'intestin est attaché par son extrémité inférieure à
20 la canule d'oxygénation et à son extrémité supérieure à un capteur de force relié à une chaîne de mesure informatique Biopac. Les contractions spontanées de l'intestin du au péristaltisme des cellules musculaires lisse de la paroi sont enregistrées. Lorsque les contractions sont régulières, 500 μ l d'une solution d'hydrolysat totale dans le tampon tyrode sont versés dans la cuve. Plusieurs concentrations sont
25 testées. A chaque concentration en hydrolysat testée, la cuve est vidée et rincée avec du tampon tyrode à 37°C après que l'intestin récupère son péristaltisme de départ. Une quantité d'hydrolysat inhibant significativement les contractions de l'intestin de lapin est ajoutée à la cuve après incubation dans du tampon tyrode à
30 10 μ M en naloxone (analogue des récepteurs opioïdes μ et δ). L'inhibition des contractions par l'hydrolysat est comparée avec et sans incubation avec la naloxone. Une suppression de l'effet indique que l'inhibition des contractions observée est due à une fixation sur un récepteur opioïde. L'analyse statistique des résultats est réalisée par un test t de Student's à l'aide du logiciel SigmaStat®. Les résultats sont

exprimés sous forme de moyenne \pm déviation standard. Le degré de significativité est fixé à $P < 0,05$.

L'ajout de 100 mg d'Hydrolysats 2 total dans le milieu réactionnel induit une inhibition d'environ 25% des contractions de l'iléon de lapin. L'hydrolysats présente un effet relaxant similaire à la morphine. L'inhibition des contractions de l'intestin de lapin induite par 100 mg d'Hydrolysats 2 total est supprimée en présence de naloxone. Les peptides constituant l'hydrolysats interagissent donc avec les mêmes récepteurs que la naloxone. L'hydrolysats présente ainsi un effet opioïde provoqué par interaction directe avec les récepteurs opioïdes présents dans l'intestin.

Afin de quantifier cette activité opioïde, différentes concentrations en Hydrolysats 2 (100 ; 150 ; 200 ; 300 ; et 400 mg/ml) ont été testées sur les contractions spontanées de l'intestin de lapin. Les valeurs d'inhibitions des contractions obtenues ($10,65 \% \pm 2,88$; $47,59 \% \pm 11,17$; $77,82 \% \pm 4$; $86,32 \% \pm 0,49$ et $90,55 \% \pm 1,13$ ($n = 3$) respectivement) sont présentées dans la Figure 4. L'analyse statistique des résultats, réalisée par un test t de Student's à l'aide du logiciel SigmaStat®, montre que l'hydrolysats inhibe significativement les contractions du morceau d'iléon de lapin lorsque la dose est supérieure à 150 mg/ml ($P < 0,05$). En exprimant le pourcentage d'inhibition en fonction du log de la concentration en l'hydrolysats (en mg/ml), il a été possible de déterminer la CI_{50} . Une valeur de CI_{50} de 750 μ g/ml est calculée à l'aide de l'équation de la droite de régression linéaire.

EXEMPLE 8 : Mise en évidence d'une activité antihypertensive *in vivo* sur les rats spontanément hypertendus (RSH)

12 rats RSH âgés de 20 semaines, pesant environ 300g, sont divisés en deux groupes de 6 individus : Témoin et Essai. Les rats Témoin reçoivent 500 μ l d'eau par gavage. Les rats Essais reçoivent, par gavage également, 500 μ l d'Hydrolysats 2 total à une dose de 0,5 g/kg dans de l'eau distillée, afin de déterminer la durée d'incubation nécessaire à l'observation d'une diminution significative de la pression artérielle systolique.

La tension artérielle systolique est mesurée au niveau de la queue à l'aide d'un électro-sphygmomanomètre. Une mesure est effectuée avant gavage, deux heures, quatre heures et six heures après gavage. Avant chaque mesure, les rats sont placés 10 minutes dans une étuve à 40°C. Les rats Témoins ont une pression

artérielle systolique moyenne d'environ 168 mmHg qui est constante au courant du temps. Cette valeur est conforme aux caractéristiques des RSH dont la pression systolique est généralement comprise entre 160 et 200mmHg. (Singer et al., 1984). Les résultats de cette analyse sont représentés sur la Figure 5.

5 L'analyse statistique de ces résultats est réalisée par analyse de variance (ANOVA) répétée à deux voies suivie du test de Dunnet à l'aide du logiciel SigmaStat®. Cette analyse montre qu'il existe une interaction significative entre le traitement des rats et le temps d'incubation (Groupe x Temps : $F_{3,527} = 21,37$; $P < 0,001$) et un effet propre lié au temps de mesure ($F_{3,527} = 26,24$; $P < 0,001$). De plus, la diminution de la pression artérielle systolique moyenne de $29,1 \text{ mmHg} \pm 2,06$ observée chez les rats Essais 4h après le gavage est très significative ($P < 0,001$).

10 Ce résultat est meilleur que ceux évoqué dans la littérature. En effet, Marczak et al. (2003) ont mis en évidence une diminution de seulement 15,5 mmHg de la pression systolique des RSH 4h après administration orale de 0,5 g/kg d'un hydrolysate de graine de colza. Matsui et al. (2002) ont, quant à eux, fait état d'une diminution de 22,7 mmHg mais 2h après administration orale de 1 g/kg d'un hydrolysate de gelée royale.

15 L'évaluation de la diminution de pression systolique des rats Essais selon la dose d'Hydrolysate 2 utilisée est réalisée 4 h après gavage dans les mêmes conditions que précédemment. Les quatre doses testées sont 0,1 ; 0,3 ; 0,5 et 0,7 g/kg ce qui représente en quantité réelle de peptides 80 ; 240 ; 400 et 560 mg/kg. Les variations de pression obtenues (en mmHg) sont $12,2 \pm 1,13$; $16,8 \pm 1,33$; $29,1 \pm 2,87$; $28,2 \pm 1,03$, respectivement (Figure 6).

20 Ces résultats montrent que la pression artérielle systolique diminue de façon croissante en fonction de la dose administrée jusqu'à atteindre un optimum (-29,1 mmHg) à une dose de 0,5 g/kg, soit 400 mg de peptides/kg. La pression systolique atteinte chez les rats SHR ayant ingéré l'Hydrolysate 2 (environ 140 mmHg) tend donc vers la pression systolique d'environ 115 mmHg des rats WKY normalement tendus (Chen, 1988).

30 Ces résultats signifient que les hydrolysats de protéines blanches de luzerne peuvent être valorisé dans le secteur nutraceutique.

La diminution de la pression observée pourrait être liée à l'action conjuguée de deux mécanismes antihypertenseurs. Elle peut être engendrée par inhibition de

l'ACE, provoquant ainsi la diminution de la formation d'angiotensine II (puissant vasoconstricteur) et l'augmentation de la production de bradykinines (puissant vasodilatateur), ainsi que par la fixation sur des récepteurs opioïdes.

REFERENCES

- Chang K.J., Cuatrecasas J.P., Wei E.T., Chang J.K. (1982). Analgesic activity of intracerebroventricular administration of morphiceptin and β -casormorphins : correlation with the morphine (μ) receptor binding affinity. *Life Sci.*, 30, 1547-1551.
- 5 Chen Y.F. (1988). Exaggerated depressor response to 6-iodoamiloride in NaCl-sensitive spontaneously hypertensive rats. *Amer. J. Med. Sci.*, 296, 78-83
- Church F.C., Swaisgood H.E., Porter D.H., Catignani G.L. (1983). Spectrophotometric Assay Using o-Phtaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. *J. Dairy Sci.*, 66, 1219- 1227.
- 10 Corvol P., Williams T.A., Soubrier F. 1995 Peptidyl dipeptidase A : Angiotensinl-Converting Enzyme. Barrett A.J. Ed *Methods in enzymology*. 248 : 238-305.
- Cushman D.W., Cheung H.S 1971 Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol.*
- 15 20(7):1637-48.
- Douillard R. 1985 Propriétés biochimiques et physico-chimiques des protéines de feuilles. Ed Lavoisier APRIA :Protéines foliaires végétales. 211-244.
- Erdos E.G., Skidgel R.A. 1987 The angiotensinl-converting enzyme. *Lab Invest.* 56 : 345-348.
- 20 Goodno C.C., Swaisgood H.E., Catignani G.L. (1981). A fluorimetric assay for available lysine im proteins. *Anal. Biochem.*, 115, 203-206.
- Marczak E.D., Usui H., Fujita H., Yang Y., Yokoo M., Lipkowski A., Yoshikawa M. (2003). New hypertensive peptides isolated from rapeseed. *Peptides*, 24, 791-798.
- 25 Matsui T., Li CH., Osajima Y. 1999 Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin l-converting enzyme inhibition from wheat germ. *Agric and Biol Chem.* 67(5) : 1302-8.

Meisel H. 1997 Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers* 43:119-128.

Miyoshi S., Ishikawa H., Kaneko T., Fukui F., Tanaka H., Maruyama S. 1991 Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an alpha-zein hydrolysate. *Agric and Biol Chem.* 55(5) : 1313-8.

Prevot-D'Alvise N.P., Lesueur-Lambert C., Dhulster P. 2003 Development of pilot process for the production of alfalfa peptide isolate. *J. Chemi Techno Biotech.* 78 : 518-528.

Singer P. Wirth M., Gerike U., Gödicke W., Moritz V. (1984). Age-dependent alterations of linoleic, arachidonic and eicosapentaenoic acids in renal cortex and medulla of spontaneously hypertensive rats. *Prostaglandins*, 27, 375-390.

Skeggs L.L., Khan J.R., Shumway N.P. 1956 Preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J. Exp. Med.* 103 :295-299.

Skidgel R.A., Erdos E.G. 1993 Novel activity of human angiotensin-converting enzyme: Release of the NH₂ and COOH-terminal tripeptides from the luteinizing hormone-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 82 :1025-1029.

Tauzin J., Miclo L., Gaillard J-L. 2002 Angiotensin-I6converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine α s₂-casein. *FEBS Letters.* 531:369-374.

Vermeissen V., Camp J.v., Verstraete W. 2002 Optimisation and validation of an angiotensin- converting enzyme inhibition assay for screening. *J. Bioch biophysical Methods.* 51 (1,4):75-87.

Yang H.Y.T., Erdos E.G., Levin Y. 1970 A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochem Biophys Acta.* 214, 374.

REVENDICATIONS

1. Procédé de production d'un hydrolysat de protéines blanches de la luzerne comprenant les étapes consistant à :

5 a) hydrolyser par la Subtilisine carlsberg (E.C. 3.4.21.62) une solution de protéines blanches de luzerne constituée par les protéines hydrosolubles de la luzerne, pendant 8 heures, à une température comprise entre 20°C et 60°C et à un pH compris entre 8 et 10, dans un réacteur enzymatique à membrane, l'hydrolyse étant couplée à une ultrafiltration en continu de la solution réactionnelle sur une membrane ayant un seuil de coupure compris entre 5 et 20 kDa; et

10 b) décolorer le perméat obtenu à l'issue de l'ultrafiltration en éliminant les polyphénols végétaux contenus dans le perméat ;

le perméat décoloré ainsi obtenu constituant une solution d'hydrolysat de protéines blanches de luzerne.

15 2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel l'hydrolyse est effectuée à une température de 40°C, à un pH de 9,5, et dans lequel la membrane d'ultrafiltration a un seuil de coupure de 10 kDa.

20 3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel les concentrations en protéines blanches de luzerne et en Subtilisine carlsberg dans le milieu réactionnel sont respectivement de 30 g.l⁻¹ et 2,4 g.l⁻¹.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, comprenant les étapes supplémentaires consistant à :

25 c) éventuellement dessaler le perméat décoloré obtenu ; et

d) sécher le perméat décoloré et éventuellement dessalé obtenu de manière à obtenir une poudre d'hydrolysat des protéines blanches de luzerne.

30 5. Hydrolysat de protéines blanches de luzerne susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

6. Hydrolysat de protéines blanches de luzerne selon la revendication 5 constitué par des polypeptides ou oligopeptides de poids moléculaire inférieur à 5000 Da.

5 7. Hydrolysat de protéines blanches de luzerne selon la revendication 6, constitué par des polypeptides ou oligopeptides de poids moléculaire compris entre 2200 et 200 Da.

10 8. Hydrolysat de protéines blanches de luzerne selon la revendication 6 ou 7, constitué par des polypeptides ou oligopeptides de poids moléculaire compris entre 400 et 200 Da.

15 9. Hydrolysat de protéines blanches de luzerne selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, ayant une CI_{50} vis-à-vis de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) inférieure à $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

20 10. Composition pharmaceutique comprenant un hydrolysat de protéines blanches de luzerne selon l'une des revendications 5 à 9 dans un excipient pharmaceutiquement acceptable.

11. Utilisation d'un hydrolysat de protéines blanches de luzerne selon l'une des revendications 5 à 9 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement de l'hypertension artérielle.

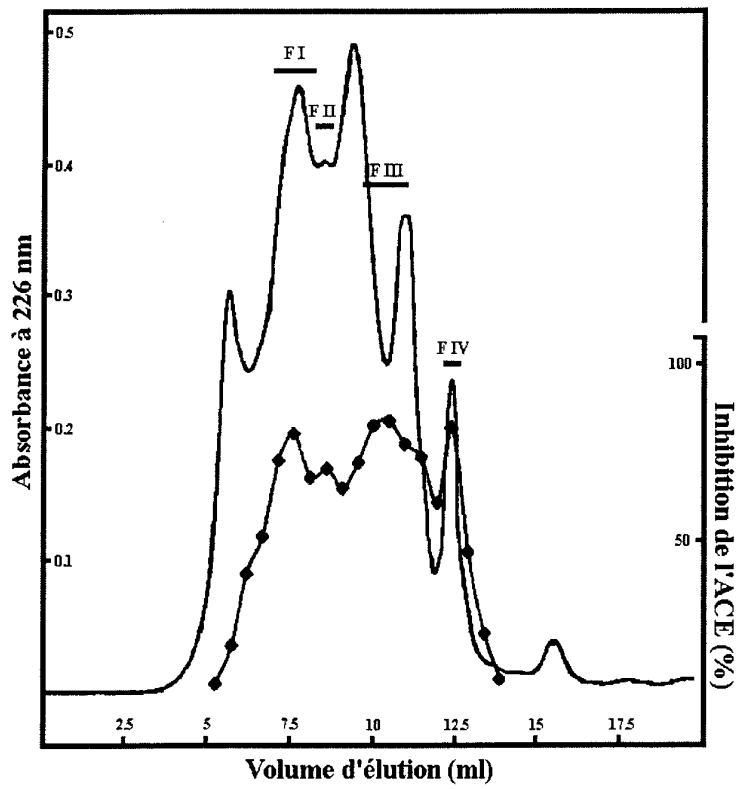
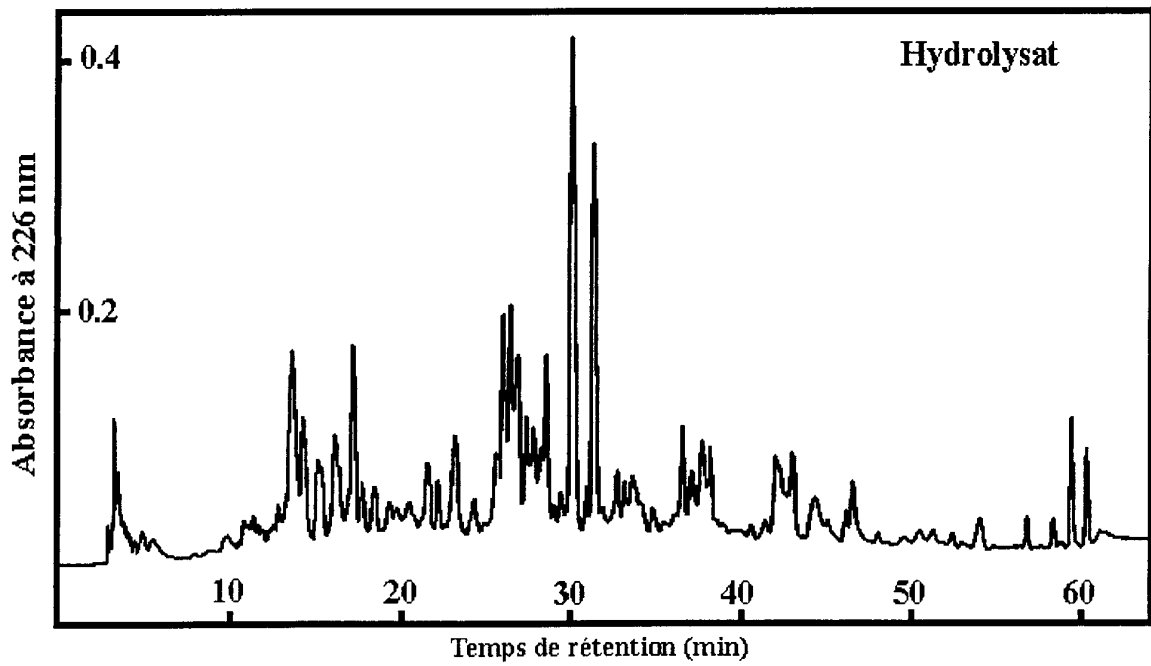
25 12. Aliment fonctionnel à activité antihypertensive comprenant un hydrolysat de protéines blanches de luzerne selon l'une des revendications 5 à 9.

30 13. Aliment fonctionnel selon la revendication 12, comprenant de 2 à 20 % en poids dudit hydrolysat de protéines blanches de luzerne, par rapport au poids de l'aliment.

14. Produit nutraceutique à activité antihypertensive comprenant un hydrolysat de protéines blanches de luzerne selon l'une des revendications 5 à 9.

15. Produit nutraceutique selon la revendication 14, comprenant de 50 à 90 % en poids dudit hydrolysate de protéines blanches de luzerne, par rapport au poids du produit nutraceutique.

1/4

FIG.1FIG.2

2/4

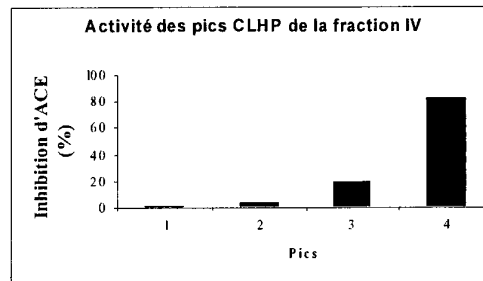
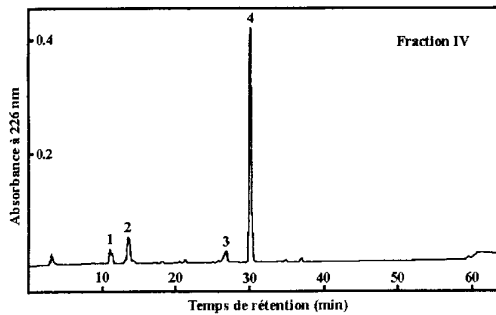
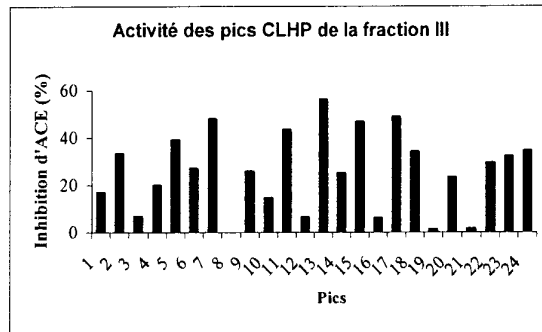
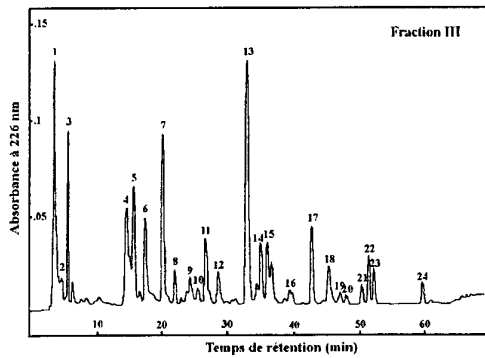
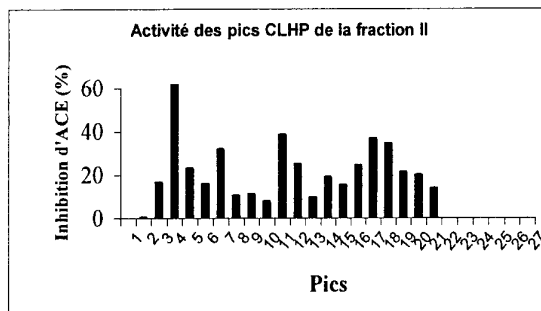
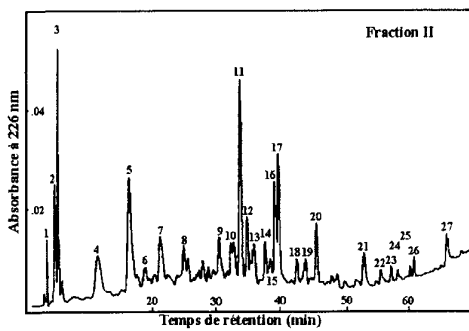
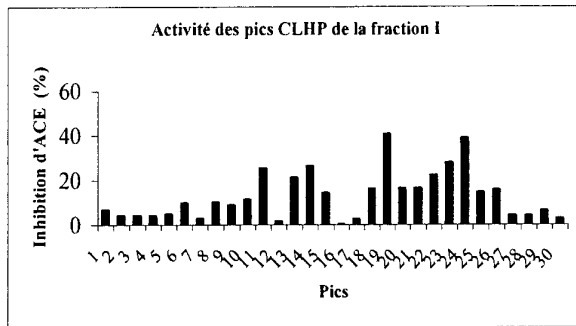
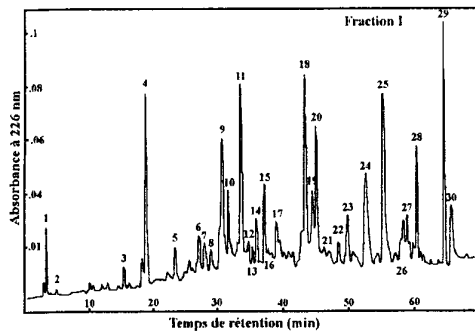
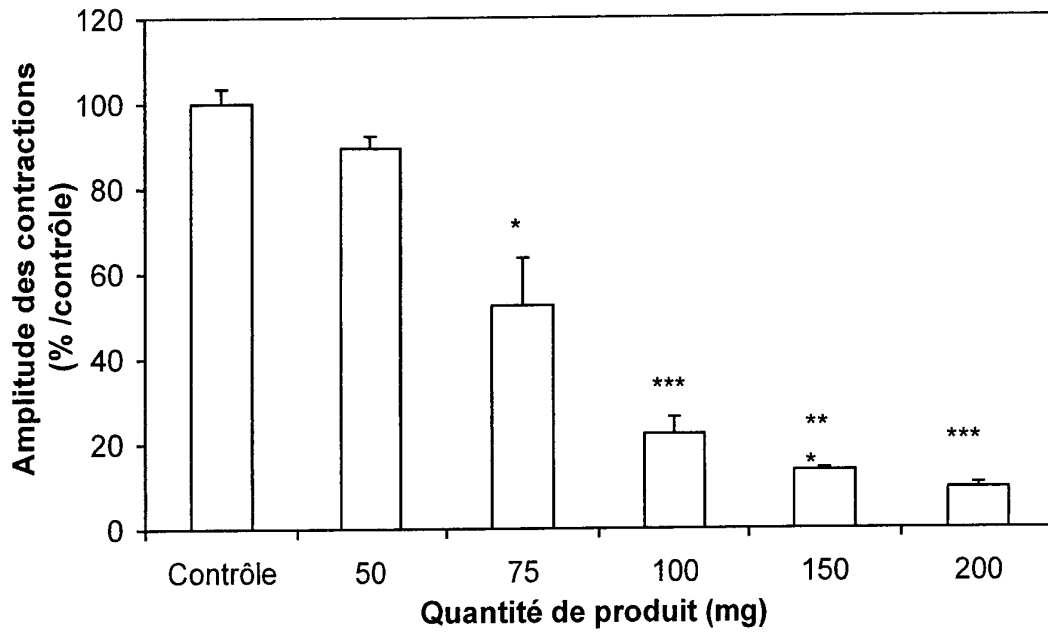
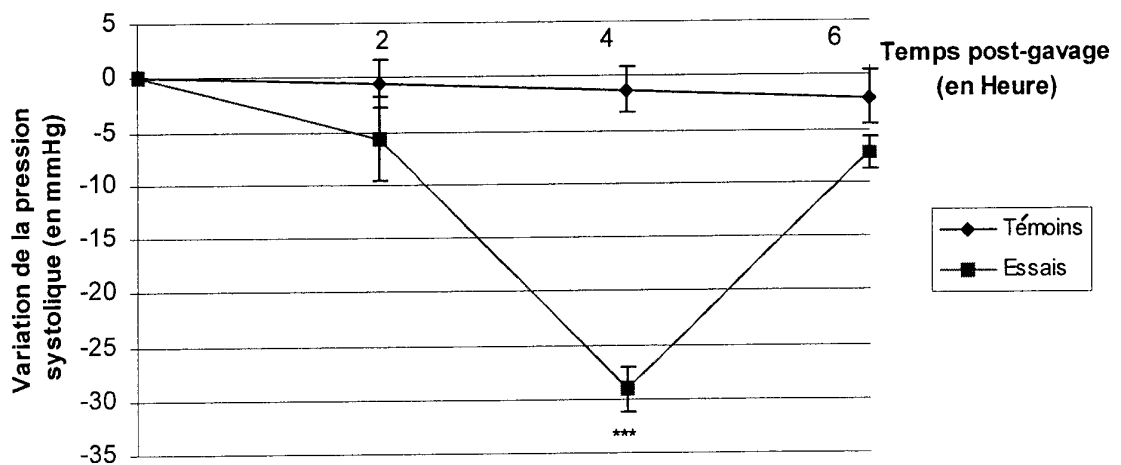
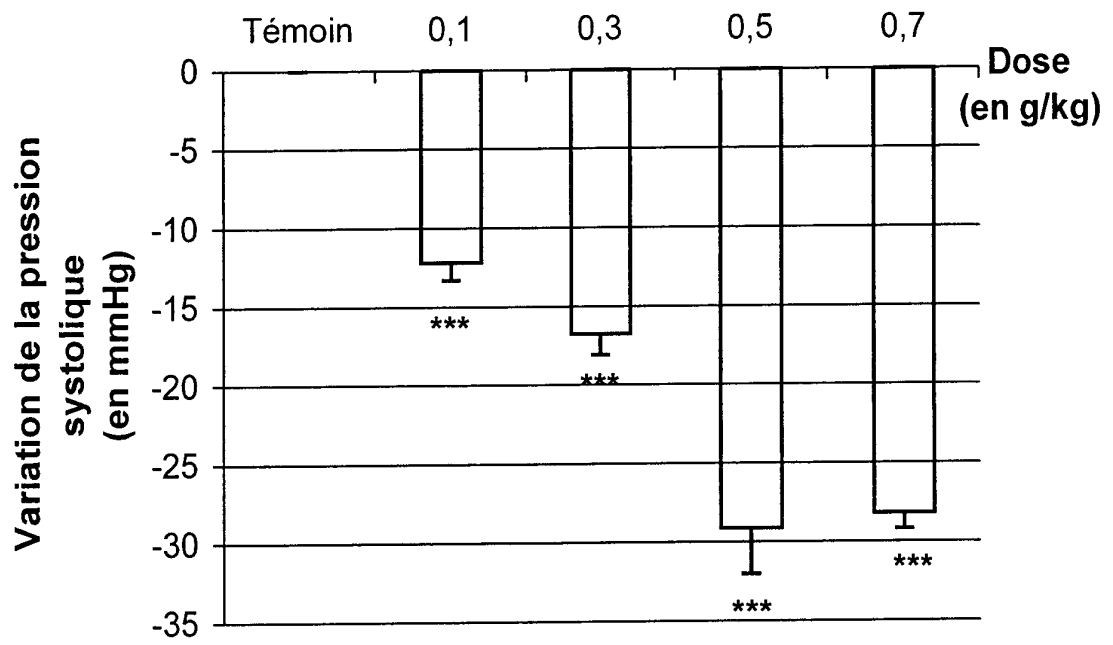


FIG.3

3/4

**FIG.4****FIG.5**

4/4

FIG.6



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 657163
FR 0410818

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
D,X	PREVOT-D'ALVISE NATHALIE ET AL: "Development of a pilot process for the production of alfalfa peptide isolate." JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 78, no. 5, mai 2003 (2003-05), pages 518-528, XP002330552 ISSN: 0268-2575 * page 518, colonne de droite, ligne 21 - page 519, colonne de gauche * * page 521; figure 1; tableau 1 * * page 522; figure 5 * * page 526, colonne de droite - page 527, colonne de gauche; figure 9 *	1-15	A23J3/14 A23L1/305 A61P9/12 A61K35/78 A23J1/14 C12P21/06
X	PREVOT-D'ALVISE N. ET AL: "Continuous enzymatic solubilization of alfalfa proteins in an ultrafiltration reactor" ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, vol. 34, no. 5, avril 2004 (2004-04), pages 380-391, XP002330553 * le document en entier plus particulièrement * page 388 - page 391; figure 8 *	1-15	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) C12P A23J A61K
X	D'ALVISE N ET AL: "Hydrolysis and large scale ultrafiltration study of alfalfa protein concentrate enzymatic hydrolysate" ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, STONEHAM, MA, US, vol. 27, 2000, pages 286-294, XP002282575 ISSN: 0141-0229 * le document en entier *	1-15	
D,A	WO 02/058482 A (VIRIDIS, SOCIÉTÉ ANONYME; LEVESQUE, DAMIEN; RAMBOURG, JEAN-CLAUDE) 1 août 2002 (2002-08-01)		
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		7 juin 2005	Le Cornec, N
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 657163
FR 0410818

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	MATSUI TOSHIRO ET AL: "Depressor effect of wheat germ hydrolysate and its novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide, Ile-Val-Tyr, and the metabolism in rat and human plasma" BIOLOGICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN, vol. 23, no. 4, avril 2000 (2000-04), pages 427-431, XP008048155 ISSN: 0918-6158 * le document en entier * -----	10-12,14	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
A	MEGIAS CRISTINA ET AL: "Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (Helianthus annuus L.) protein isolates" JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, vol. 52, no. 7, 7 avril 2004 (2004-04-07), pages 1928-1932, XP002330555 ISSN: 0021-8561 * le document en entier * -----	10-12,14	
A	WO 01/85984 A (DAVISCO INTERNATIONAL FOODS, INC; DAVIS, MARTIN, E; RAO, ANAND; GAUTHI) 15 novembre 2001 (2001-11-15) * revendications * -----	10-12,14	
A	PEDROCHE JUSTO ET AL: "Utilisation of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity" JOURNAL OF THE SCIENCE OF FOOD AND AGRICULTURE, vol. 82, no. 9, juillet 2002 (2002-07), pages 960-965, XP002330556 ISSN: 0022-5142 * le document en entier * -----	10-12,14	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
7 juin 2005		Le Cornec, N	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>	

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 657163
FR 0410818

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	MARCZAK E D ET AL: "New antihypertensive peptides isolated from rapeseed" PEPTIDES 01 JUN 2003 UNITED STATES, vol. 24, no. 6, 1 juin 2003 (2003-06-01), pages 791-798, XP002330557 ISSN: 0196-9781 * le document en entier * -----	10-12,14	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
7 juin 2005		Le Cornec, N	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>	

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0410818 FA 657163**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 07-06-2005

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 02058482 A	01-08-2002	FR 2819685 A1	26-07-2002
		CA 2434878 A1	01-08-2002
		WO 02058482 A1	01-08-2002

WO 0185984 A	15-11-2001	US 6630320 B1	07-10-2003
		AU 5962501 A	20-11-2001
		CA 2415688 A1	15-11-2001
		EP 1287159 A1	05-03-2003
		JP 2004519204 T	02-07-2004
		NZ 523036 A	30-04-2004
		WO 0185984 A1	15-11-2001
		US 2003171256 A1	11-09-2003
