

AVIS DE PRESENTATION DE THESE EN SOUTENANCE POUR L'OBTENTION DU  
DIPLOME NATIONAL DE DOCTEUR

**Mademoiselle Vanessa HAMME** présentera ses travaux intitulés :

**« Des cryptides issus de la fermentation du lactosérum par *Lactobacillus rhamnosus* et  
*Kluyveromyces marxianus* peuvent-ils contribuer à lutter contre le syndrome  
métabolique ? »**

**Spécialité : Biochimie**

**Le 6 juillet 2009 à 09h45**

**Lieu : Université de La Rochelle  
Maison des Sciences de l'Ingénieur  
Amphi 100 (rez-de-chaussée)  
Av. Becquerel  
17000 LA ROCHELLE**

**Composition du jury :**

**Mme BORDENAVE-JUCHEREAU Stéphanie** Maître de Conférences, Université de  
La Rochelle

**M. DEGRAEVE Pascal** Maître de Conférences HDR, Université de Lyon 1

**M. DHULSTER Pascal** Professeur, Polytech'Lille

**M. PIOT Jean-Marie** Professeur, Université de La Rochelle

**M. SANNIER Frédéric** Professeur, Université de La Rochelle

**M. THOUAND Gérald** Professeur, Université de Nantes

**M. VALET Philippe** Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse

**Résumé :**

Le lactosérum, coproduit de l'industrie laitière, fait l'objet d'innovations importantes dans le domaine de la santé et des aliments fonctionnels. Des études menées ces dernières années ont montré que le lactosérum était une matrice naturelle riche, renfermant des peptides bioactifs, les cryptides, ayant un potentiel en nutrition-santé. En particulier, le lactosérum est source de lactokinines, peptides inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), enzyme clé de la régulation de l'hypertension artérielle. Les inhibiteurs de l'ECA sont largement utilisés dans le traitement de l'hypertension artérielle. Cette pathologie est souvent associée à une constellation d'anomalies des métabolismes glucidiques et lipidiques regroupées sous le terme de syndrome métabolique.

L'objectif global de ce travail a consisté à produire des peptides inhibiteurs de l'ECA par fermentation aérobie du lactosérum caprin brut puis à évaluer leur potentiel dans la lutte contre le syndrome métabolique.

Au cours de l'étude, le lactosérum caprin brut a été fermenté par 32 microflores de fromages et de produits laitiers. 5 hydrolysats capables d'inhiber l'ECA ont ainsi été obtenus. L'hydrolysat présentant l'activité d'inhibition de l'ECA la plus importante résultait de la fermentation du lactosérum par une co-culture de *Lactobacillus rhamnosus* et *Kluyveromyces marxianus* issue de la microflore d'un fromage de type Bamalou des Pyrénées. En monoculture, chacun de ces deux micro-organismes a été capable de contribuer à la protéolyse des protéines sériques du lactosérum et de produire un hydrolysat inhibiteur de l'ECA. En effet, *Lactobacillus rhamnosus* a hydrolysé 15 % de la bêta-lactoglobuline ( $\beta$ -lg) et totalement l'alpha-lactalbumine ( $\alpha$ -la) alors que *Kluyveromyces marxianus* a dégradé un tiers des deux protéines. Les hydrolysats générés après fermentation par le lactobacille et la levure ont présenté des activités inhibitrices de l'ECA respectives de 52 % et 45 % pour 100  $\mu$ g de protéines testées. En co-culture pour une même quantité de protéines testée, les deux microorganismes ont généré un hydrolysat ayant une activité inhibitrice de l'ECA de 61 %. La concentration nécessaire pour inhiber de 50 % l'activité de l'ECA (CI50) était alors de 72  $\mu$ g/ml. Deux molécules potentiellement anti hypertensives ont été identifiées au sein de cet hydrolysat, le tryptophane libre (W), et le peptide Asparagine-Tyrosine-

Tryptophane (NYW), de CI50 respectives de 0,86  $\mu$ M et 20  $\mu$ M. Le W représentait une espèce majoritaire de l'hydrolysate.

L'impact de l'hydrolysate précédemment produit et du W a ensuite été évalué in vitro sur des adipocytes humains immortalisés. Une estimation par coloration à l'huile rouge des lipides totaux a montré une diminution du contenu lipidique total respectivement de 8 et 18 % après 22 h d'incubation avec 587  $\mu$ g/ml d'hydrolysate et avec 25,71  $\mu$ g/ml de W (concentration du W dans 587  $\mu$ g/ml d'hydrolysate). L'incubation de pré-adipocytes avec l'hydrolysate a entraîné une inhibition de leur prolifération respectivement de 32 et 58 % pour 58,7 et 587  $\mu$ g/ml d'hydrolysate testés. Cet hydrolysate ne serait pas cytotoxique. En revanche, une incubation des pré-adipocytes avec 25,71  $\mu$ g/ml de W de l'hydrolysate a abouti à une mortalité de 60% des cellules.

L'effet de l'hydrolysate et du W a également été évalué ex vivo sur des adipocytes humains issus de biopsies. Une incubation de 90 minutes avec 587  $\mu$ g/ml d'hydrolysate et 25,71  $\mu$ g/ml de tryptophane a provoqué une inhibition de la libération des acides gras non estérifiés respectivement de 88,31 et 87,45 %.

La fermentation du lactosérum caprin par la co-culture *Kluyveromyces marxianus* et *Lactobacillus rhamnosus* a permis la production d'un hydrolysate inhibiteur de l'ECA dont l'activité biologique serait principalement due au tryptophane. La présence de cet acide aminé, précurseur de la sérotonine, permettrait à l'hydrolysate produit d'exercer, en plus de son rôle sur la régulation de la pression artérielle, un rôle sur la régulation de l'humeur, de l'anxiété, de l'appétit, du stress et du sommeil.

D'un point de vue microbiologique, une caractérisation phylogénétique plus fine des souches isolées est envisagée afin de déterminer si *Lactobacillus rhamnosus* et *Kluyveromyces marxianus* font partie des microorganismes « GRAS » et probiotiques. Ces propriétés pourraient apporter une valeur ajoutée supplémentaire à l'hydrolysate produit au cours de ces travaux en tant qu'aliment-santé. D'un point de vue biologique, l'étude sur adipocytes humains immortalisés démontrant que des lactokinines pourraient intervenir dans la lutte contre le syndrome métabolique doit se poursuivre. Des expérimentations in vivo sur des modèles pathologiques animaux sont également envisagées.