



HAL
open science

Complexation du fer par le phosphopeptide (1-25) de la caséine β : action de l'alcalase et de la phosphatase acide

Said Bouhallab, J Léonil, JI Maubois

► To cite this version:

Said Bouhallab, J Léonil, JI Maubois. Complexation du fer par le phosphopeptide (1-25) de la caséine β : action de l'alcalase et de la phosphatase acide. *Le Lait*, 1991, 71 (4), pp.435-443. hal-00929257

HAL Id: hal-00929257

<https://hal.science/hal-00929257>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Complexation du fer par le phosphopeptide (1-25) de la caséine β : action de l'alcalase et de la phosphatase acide

S Bouhallab, J Léonil, JL Maubois

INRA, laboratoire de recherches de technologie laitière,
65, rue de Saint-Brieuc, 35042 Rennes Cedex, France

(Reçu le 13 novembre 1990; accepté le 15 avril 1991)

Résumé — L'incubation du phosphopeptide (1-25) de la caséine β bovine (β CN(1-25)) avec du FeCl_2 conduit à la formation d'un complexe dont la stoechiométrie est de 4 moles de fer/mole de β CN(1-25). Lorsque ce complexe a été élué sur un échangeur d'anions, 3 pics distincts, qui diffèrent par le rapport fer/ β CN(1-25), ont été obtenus. Ce résultat suggère l'existence d'au moins 2 types de complexes entre le fer et le β CN(1-25). L'hydrolyse du β CN(1-25)-fer par l'alcalase, enzyme à large spécificité, montre que la liaison Glu_4 - Glu_5 est la plus sensible, tandis que la partie centrale du peptide est résistante à l'enzyme. Le fer qui reste lié après passage sur échangeur d'anions n'est pas relargué après hydrolyse par l'alcalase. En revanche, la déphosphorylation du complexe, beaucoup plus lente en présence du fer, rend totalement dialysable le minéral initialement lié au phosphopeptide.

phosphopeptide β CN(1-25) / fer / hydrolyse / alcalase / phosphatase

Summary — Study of β -casein phosphopeptide (1-25)-iron complex: action of alcalase and acid phosphatase. Incubation of iron (FeCl_2) with the (1-25) phosphopeptide (β CN(1-25)) from bovine β -casein leads to the formation of a complex with the binding capacity of 4 mol Fe^{2+} per mol β CN(1-25). This complex injected on an anion exchanger resulted in 3 peaks which did not have the same iron/ β CN(1-25) molar ratio, suggesting the existence of several kinds of β CN(1-25)-iron complexes. The enzymatic hydrolysis of β CN(1-25)-iron by alcalase (EC.3.4.4.16) shows that Glu_4 - Glu_5 was the most susceptible bond, while the middle part of the peptide was not hydrolysed. On the other hand, the iron complexed by the peptide was not released after alcalase splitting. However, enzymatic dephosphorylation of the β CN(1-25)-iron complex, which was slower than that of β CN(1-25), rendered the iron initially bound to the phosphopeptide entirely dialysable.

phosphopeptide β CN(1-25) / iron / hydrolysis / alcalase / phosphatase

INTRODUCTION

La présence de sites phosphorylés confère aux 4 caséines du lait (α_{s1} , α_{s2} , β , κ) ainsi qu'aux caséinophosphopeptides (CPP) qui en dérivent, un pouvoir chélatant très marqué vis-à-vis des alcalinotereux et des oligo-éléments. L'hydrolyse trypsique ou pancréatique de ces protéines, suivie de l'addition d'un minéral bivalent, conduit à la polymérisation des CPP. Cette propriété est à la base des méthodes de préparation et d'extraction de ces peptides, aussi bien par précipitation par un sel de baryum (Manson et Annan, 1971) que par ultrafiltration sur membranes (Brulé *et al*, 1980).

De nombreux travaux font état des interactions des caséines avec les minéraux. Les différents récepteurs caséiniques étudiés étaient les caséines totales (Harzer et Kauer, 1982), les caséines individuelles (Brulé et Fauquant, 1982; Baomy *et al*, 1989) et les CPP (Brulé *et al*, 1980; Berrocal *et al*, 1989). Il ressort de ces études que la capacité ainsi que l'affinité des CPP pour les cations dépendent à la fois du degré de phosphorylation des caséines ($\alpha_s > \beta > \kappa$) et du cation utilisé (Demott et Dincer, 1976; Lonnerdal *et al*, 1985). Le fer et le cuivre, dont les fixations impliquent des liaisons ioniques et de coordination, sont les cations les plus affines vis-à-vis de ces récepteurs. Ils possèdent des affinités 50 à 100 fois plus élevées que celles du calcium et du magnésium, dont les liaisons sont uniquement de nature ionique (Brulé et Fauquant, 1982; Baomy et Brulé, 1988). De telles différences pourraient conduire à une biodisponibilité variable de ces deux types de cation.

Comparativement au calcium, peu de données sont disponibles sur le complexe formé par la liaison du fer ferreux aux

phosphopeptides des caséines et sur les conditions de sa dissociation sous l'effet des agents biologiques. Aussi, la forte interaction entre le fragment (1-25) de la caséine β bovine (β CN(1-25)) et le fer nous a-t-elle conduit à étudier la nature du complexe formé, et les possibilités de relargage de ce minéral sous l'action d'une endopeptidase à large spécificité : l'alcalase (EC 3.4.4.16) et de la phosphatase acide de pomme de terre (EC 3.1.8.2).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Enzymes

L'alcalase 0,6 L (Novo, Danemark) est un mélange d'endopeptidases à large spécificité, extrait de *B. licheniformis*. Le composé majeur est la substilisine A (EC 3.4.4.16), 0,6 U Anson/g. La phosphatase acide de pomme de terre lyophilisée (EC 3.1.8.2) 2 U/mg, provient de chez Boehringer (RFA). Tous les produits, en particulier $FeCl_2$, sont de qualité analytique.

La caséine β a été préparée à partir du caséinate de sodium (Armor Protéines, St-Brice-en-Coglès, France), par solubilisation à froid, 4 °C et pH 4,5 (Terré *et al*, 1987). Le phosphopeptide β CN(1-25) a été obtenu par hydrolyse trypsique ménagée de la caséine β (Léonil *et al*, 1989), et purifié sur un système Biopilot (Pharmacia) en gradient de NaCl. La pureté du β CN(1-25) obtenu dans ces conditions est de l'ordre de 90%. Le rapport molaire N/P, qui théoriquement est de 8, est dans cette préparation de 8,7. Cette valeur, légèrement supérieure, traduit la présence d'impuretés non ou peu phosphorylées.

Formation du complexe β CN(1-25)-fer

Deux ml d'une solution de β CN(1-25) à 12,5 mg/ml ($7 \cdot 10^{-6}$ mol) ont été incubés en présence de $7 \cdot 10^{-5}$ mol de $FeCl_2$ dans de l'eau milliQ (Millipore), pH = 5,3, pendant 30 min à 25 °C. La solution a été ensuite dialysée contre 2×1 l

d'H₂O pendant 24 h à 4 °C, en utilisant des sacs de dialyse Spectrapor de seuil de coupure de 1000 Da. Le fer complexé a été ensuite dosé. Un témoin de dialyse, sans peptide β CN(1-25), a été incubé et dialysé dans les mêmes conditions.

Hydrolyse de β CN(1-25)-fer par l'alkalase

Ont été hydrolysées $2,8 \cdot 10^{-5}$ mol du complexe β CN(1-25)-fer à pH = 8 et à 50 °C, par l'addition de l'alkalase 2% (P/P). Le pH de la réaction était maintenu constant par addition de NaOH 0,1 N à l'aide d'un pH-Stat Metrohm. Au bout de 5 h d'incubation, l'échantillon était dilué à 25 °C pour les analyses chromatographiques.

Hydrolyse de β CN(1-25) par la phosphatase acide

Le β CN(1-25), ainsi que le complexe β CN(1-25)-fer ont été traités par la phosphatase acide de pomme de terre : 2,6 mg de l'échantillon ont été incubés à 37 °C avec 0,26 mg d'enzyme dans le tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 5,8.

Le phosphore libéré a été déterminé selon la méthode de microdosage décrite par Chen *et al* (1956), modifiée : les échantillons ont été directement mélangés avec les solutions d'acide ascorbique et du molybdate d'ammonium, sans minéralisation préalable. Le fer a été dosé après dialyse extensive des échantillons dans les conditions décrites précédemment.

Effet du β CN(1-25) sur la précipitation du fer

On a mélangé 100 μ l d'H₂O ou de β CN(1-25) ($3,6 \cdot 10^{-7}$ mol) à 150 μ l d'une solution de phosphate de sodium 40 mM à pH 7 ou 8; 150 μ l d'une solution de FeCl₂ 40 mM sont ensuite ajoutés. Les échantillons ont été alors incubés à 37 °C pendant 0, 30, 60 ou 120 min. Après centrifugation à 3 000 g, 1 h, le fer des surnageants a été dosé.

Analyses chromatographiques

Le système FPLC-Pharmacia, équipé soit d'une colonne Superose 12 (1,5 x 30 cm), soit d'une MonoQ (0,5 x 5 cm) a été utilisé. L'équipement FPLC était composé du système LCC-500, de deux pompes P500 et d'un détecteur UV.

Filtration sur gel

Le complexe β CN(1-25)-fer a été analysé en gel filtration en injectant 100 μ l d'échantillon (200 μ g de β CN(1-25)). L'élution a été réalisée par H₂O à 0,6 ml/min. L'absorbance était lue à 214 nm. Les fractions contenant le peptide étaient rassemblées et le minéral associé était dosé par spectroscopie d'absorption atomique.

Échange d'ions

La séparation des produits a été effectuée dans les conditions suivantes sur un échangeur d'anions :

- tampon A : Phosphate 20 mM, pH 6,8;
- tampon B : A + 1 M NaCl;
- débit : 1 ml/min, détection à 214 nm.

Un gradient linéaire 0-80% de B en 24 min a été appliqué.

Différentes fractions ont été collectées pour le dosage du fer.

Dosage du fer

Le dosage du fer a été réalisé par spectroscopie d'absorption atomique, sur un appareil Varian AA 1275.

Dosage d'acides aminés

Les différents échantillons ont été hydrolysés pendant 24 h sous vide par l'HCl 5,7 N, à 110 °C.

Les acides aminés ont été analysés par l'analyseur Alpha Plus Pharmacia.

RÉSULTATS

Formation du complexe $\beta\text{CN}(1-25)\text{-fer}$

La quantité de fer lié au $\beta\text{CN}(1-25)$ a été déterminée après dialyse extensive du complexe. Dans ces conditions expérimentales, une mole de peptide fixe 4 moles de fer. Cette fixation s'accompagne de l'oxydation concomitante du fer ferreux (Fe^{2+}), se traduisant par une coloration rouge foncé de la solution. Ce phénomène, déjà observé par Brulé *et al* (1982), a été également décrit dans le cas de la transferrine (Bates *et al*, 1973), et dans le cas d'autres composés (Korycka-Dahl et Richardson, 1978).

Le complexe formé a été analysé par filtration sur gel sur une colonne Superose 12 (Pharmacia). Aucun relargage du minéral n'a été observé dans ces conditions. Le pic peptidique retient la totalité du fer initialement fixé. En revanche, dans le cas d'un complexe $\beta\text{CN}(1-25)\text{-calcium}$, la majorité du minéral était déplacée par effet de dilution chromatographique par l'éluant. Ces données confirment la forte interaction entre le fer et le phosphopeptide.

Comportement du complexe $\beta\text{CN}(1-25)\text{-fer}$ sur échangeur d'anions

La figure 1A représente l'éluion de $\beta\text{CN}(1-25)$ par un gradient de NaCl sur une colonne MonoQ. Le peptide est élué à 0,4 M NaCl. Lorsque le complexe était analysé dans les mêmes conditions, 3 pics P_1 , P_2 et P_3 étaient élués successivement à 0,4, 0,49 et 0,62 M NaCl. Le profil est présenté sur la figure 1B. P_1 et P_2 étaient identifiés par l'analyse de la composition en acides aminés (tableau I). Ces 2 pics représentent le $\beta\text{CN}(1-25)$. P_3 n'a pas été attribué, en raison de sa très faible quantité (de l'ordre du μg).

Ces 3 pics diffèrent par la quantité de fer complexé. Les résultats sont résumés dans le tableau II. Le pic P_1 , qui représente 72% de $\beta\text{CN}(1-25)$ injecté, contient en fait très peu de fer (0,4 mol/mol de $\beta\text{CN}(1-25)$), ce qui explique que son comportement chromatographique ne soit pas modifié. Le pic P_2 qui renferme 27% du peptide injecté, correspond à un complexe formé de 3,2 mol de fer par mol de $\beta\text{CN}(1-$

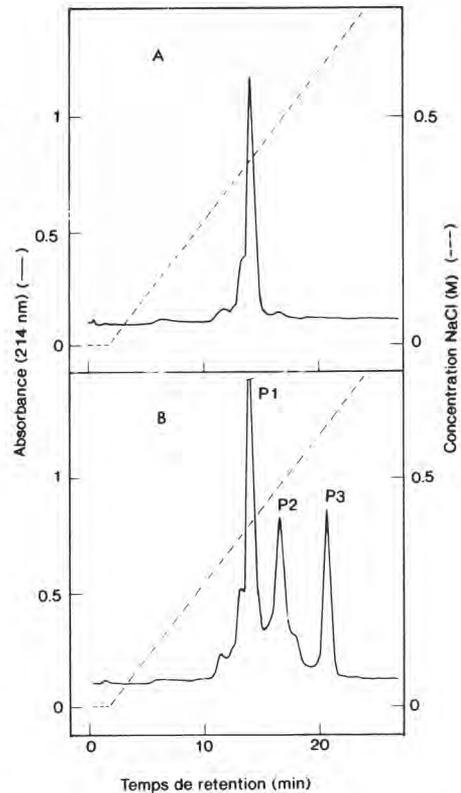


Fig 1. Analyse FPLC sur colonne MonoQ du phosphopeptide $\beta\text{CN}(1-25)$ (A) et du complexe $\beta\text{CN}(1-25)\text{-fer}$ (B). Les caractéristiques des pics sont indiquées sur les tableaux I et II. FPLC analysis on MonoQ column of phosphopeptide $\beta\text{CN}(1-25)$ (A) and $\beta\text{CN}(1-25)\text{-iron}$ complex (B). Peaks characteristics are given in tables I and II.

Tableau I. Composition en acides aminés des pics collectés après élution sur échangeur d'anions. Mono Q. P_1 , P_2 (complexe β CN(1-25)-fer); P'_1 , P'_2 , P'_3 , P'_4 (complexe hydrolysé par l' alcalase).
Amino acid composition of peaks eluted on Mono Q column. P_1 and P_2 (β CN(1-25)-iron complex); P'_1 , P'_2 , P'_3 and P'_4 (complex hydrolysed by alcalase).

| | P_1 | P_2 | P'_1 | P'_2 | P'_3 | P'_4 |
|--------------------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| Asn(N) | 1,1 | 1,5 | | 0,9 | 0,9 | 1,3 |
| Thr(T) | 1,0 | 1,1 | | 0,9 | 0,85 | - |
| Ser(S) | 4,7 | 5,0 | | 4,45 | 4,5 | 5,0 |
| Glu(E) | 7,7 | 7,5 | 2,0 | 5,55 | 5,4 | 5,7 |
| Pro(P) | 1,1 | 0,9 | | 0,8 | 0,8 | 1,0 |
| Gly(G) | 1,1 | 1,2 | | 0,9 | 0,8 | 1,0 |
| Val(V) | 1,7 | 1,8 | | 1,65 | 1,7 | 1,7 |
| Ile(I) | 1,5 | 1,9 | | 1,65 | 1,65 | 1,1 |
| Leu(L) | 3,1 | 3,4 | 1,0 | 1,5 | 1,4 | 1,8 |
| Arg(R) | 2,0 | 2,0 | | 1,0 | 1,0 | - |
| β CN-peptide | 1-25 | 1-25 | 2-4 | 5-25 | 5-25 | 5-22 |

Structure primaire du phosphopeptide β CN(1-25). *Primary structure of phosphopeptide β CN(1-25)* :
 $_2$ HN-R-E-L-E-E-L-N-V-P-G-E-I-V-E-S*-L-S*-S*-S*-E-E-S-I-T-R-COOH

* Sérines phosphorylées. * *Phosphorylated serines.*

Tableau II. Répartition du fer sur les pics obtenus après chromatographie du complexe β CN(1-25)-fer.

Iron distribution in peaks obtained after anion exchange chromatography of β CN(1-25)-iron complex.

| Peptide | % Fer associé ^(a) | Rapport molaire fer/peptide |
|---------|------------------------------|-----------------------------|
| P_1 | 1-25(72%) ^(b) | 10 |
| P_2 | 1-25(27%) | 30 |
| P_3 | * (0,5%) | 45 |

^(a) 100% correspondent à la quantité initialement fixée au β CN(1-25). *100% corresponds to the initially fixed quantity to β CN(1-25)*

^(b) La quantité du peptide dans chaque pic a été déduite de l'analyse des acides aminés. *The peptide quantity represented by each peak was deduced from the amino acid analysis.*

* Pic non identifié. *Unidentified peak.*

25). P_3 contient moins de 1%, du matériel peptidique, mais renferme 45% de fer initialement complexé au phosphopeptide. Se basant sur la quantité de fer lié, l'ordre d'élution des pics est l'inverse de celui attendu. Des interactions autres que ioniques avec le support pourraient expliquer ce résultat.

Lorsque FeCl_2 était analysé dans les mêmes conditions chromatographiques, aucun pic absorbant à 214 nm n'était détecté. La majorité du fer était éluee entre P_2 et P_3 .

Action de l'alcalase sur le complexe

Le profil des produits obtenus par l'action de l'alcalase sur le complexe β CN(1-25)

est représenté sur la figure 2. Au bout de 5 h d'incubation, 100% de β CN(1-25) étaient hydrolysés. Par ailleurs, seules les extrémités du peptide sont substrats de cette enzyme. La liaison préférentiellement coupée est Glu₄-Glu₅, ce qui donne les fragments P'_1 (2-4) et P'_2 , P'_3 (5-25). Une hydrolyse plus poussée fait apparaître le fragment P'_4 , qui correspond à la séquence 5-22. La partie centrale du peptide s'est donc avérée être résistante à l'attaque enzymatique. Le même résultat était obtenu par l'hydrolyse du β CN(1-25) non complexé au fer (résultat non montré). D'autre part, on note l'existence de 2 pics (P'_2 et P'_3) contenant le même fragment peptidique 5-25. Comme dans le cas du peptide non hydrolysé, ces 2 pics diffèrent par la quantité de fer associée (tableau III). Les rapports molaires fer/peptide des pics P'_2 et P'_3 sont comparables à ceux obtenus pour les pics P_1 et P_2 (tableau II). Le pic ayant un temps de rétention de

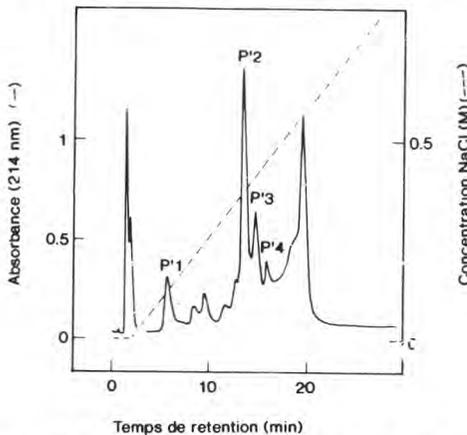


Fig 2. Séparation sur colonne MonoQ de peptides obtenus après 5 h d'hydrolyse du complexe β CN (1-25)-fer par l'alcalase 2% (P/P). Les tableaux I et III donnent les caractéristiques des pics.

Separation on MonoQ column of the peptides obtained after 5 h of hydrolysis of β CN (1-25)-iron complex by alcalase 2% (w/w). Peaks characteristics are given in tables I and III.

19 min, malgré sa forte absorption à 214 nm, contient très peu de matériel peptidique et n'a pas été identifié.

Action de la phosphatase acide sur le complexe β CN(1-25)-fer

La déphosphorylation du peptide β CN(1-25) par la phosphatase acide de pomme de terre est totale au bout de 3 h d'incubation dans nos conditions expérimentales (37 °C, E/S = 0,1 (P/P)). En revanche, 5 h d'incubation sont nécessaires pour une déphosphorylation quasi-totale du complexe β CN(1-25)-fer. Cela est probablement dû à une accessibilité réduite des groupements phosphates. Le dosage du fer résiduel après dialyse extensive indique que 92% du minéral lié au phosphopeptide sont rendus dialysables par l'action de la phosphatase acide.

Tableau III. Répartition du fer sur les produits obtenus par l'action de l'alcalase sur le complexe β CN(1-25)-fer.
Iron distribution in products obtained after β CN (1-25)-iron complex hydrolysis by alcalase.

| Peptide | % Fer associé ^(a) | Rapport molaire fer/peptide |
|---------|------------------------------|-----------------------------|
| P'_1 | 2-4 | 0 |
| P'_2 | 5-25 | 5 |
| P'_3 | 5-25 | 24 |
| P'_4 | 5-22 | ** |
| P'_5 | * | 59 |

^(a) 100% correspond à la quantité initialement fixée au β CN(1-25). 100% corresponds to the initially fixed quantity to β CN(1-25).

* Pic non identifié. Unidentified peak.

** Négligeable. Negligible.

DISCUSSION

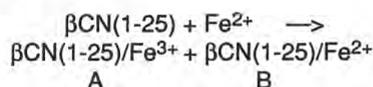
L'incubation du phosphopeptide $\beta\text{CN}(1-25)$ avec FeCl_2 conduit à la formation d'un complexe contenant 4 moles de fer par mole de $\beta\text{CN}(1-25)$. La formation de ce complexe s'accompagne de l'oxydation du minéral, selon un mécanisme qui à notre connaissance n'a pas encore été élucidé. Toutefois, ce phénomène d'oxydation, lié à la liaison du fer, a été observé aussi bien dans le cas des phosphoprotéines (Grant et Taborsky, 1966) que dans celui des transferrines (TRF) (Kojima et Bates, 1981). Dans ce dernier cas, il y aurait oxydation du Fe^{2+} dans une réaction mettant en œuvre un anion tel le carbonate, et aboutissant à la formation d'un complexe ternaire ($\text{Fe}^{3+}\text{-TRF-CO}_3^{2-}$) (Le Grand *et al*, 1988). Le même type de réaction pourrait être à l'origine de l'oxydation du Fe^{2+} lors de la formation du complexe phosphopeptide-fer, les groupements phosphates et/ou carboxyles (résidus Glu) du peptide jouant alors le même rôle que l'anion carbonate.

Lorsque le complexe $\beta\text{CN}(1-25)$ -fer a été analysé sur un échangeur d'anions, trois pics bien distincts P_1 , P_2 , P_3 ont été obtenus. Le dosage du fer associé indique que P_1 correspond au peptide $\beta\text{CN}(1-25)$ ayant relargué la quasi-totalité du fer, alors que le rapport molaire fer/ $\beta\text{CN}(1-25)$ de P_2 est voisin de celui du complexe initial (3,2 au lieu de 4). Divers phénomènes pourraient être à l'origine du comportement chromatographique du complexe $\beta\text{CN}(1-25)$ -fer :

- un dédoublement du complexe par le support chromatographique; cependant, lorsque P_1 et P_2 étaient collectés et rechromatographiés dans les mêmes conditions, un seul pic était obtenu dans chacun des cas;

- une oxydation partielle du fer, qui conduirait à l'existence de deux populations Fe^{2+}

et Fe^{3+} responsables de l'apparition des 2 pics de $\beta\text{CN}(1-25)$:



Tenant compte du fait que le fer ferreux possède une meilleure affinité pour les CPP que le fer ajouté sous forme de FeCl_3 (Brulé, résultats non publiés), le complexe A correspondrait au pic P_1 ayant relargué le fer, alors que le complexe B correspondrait au pic P_2 non dissocié. Toutefois, cette hypothèse est peu probable, du fait qu'elle nécessite que les 4 atomes de fer fixés sur une même molécule soient du même degré d'oxydation.

- l'existence de plusieurs types de complexes dans le mélange de départ en fonction du nombre de molécules $\beta\text{CN}(1-25)$ par complexe formé : dans un cas, le fer, entièrement oxydé, ferait intervenir plusieurs molécules de $\beta\text{CN}(1-25)$ par association intermoléculaire; dans l'autre cas, une seule molécule peptidique chélaterait les 4 atomes de fer. Cela serait à l'origine des pics P_1 et P_2 dont le relargage du minéral dépend de la sensibilité des 2 complexes aux conditions expérimentales. Le pontage de $\beta\text{CN}(1-25)$ par le fer pourrait contribuer au phénomène d'agrégation connu des phosphopeptides par les minéraux (Brulé et Fauquant, 1982).

Si cette dernière hypothèse est fort probable, elle mériterait d'être confirmée. Une bonne connaissance de la nature de ces interactions s'avère d'autant plus nécessaire que le rôle physiologique de ces séquences demeure controversé. En effet, il a été montré que les phosphopeptides des caséines interviendraient dans l'absorption intestinale du calcium, aussi bien chez le poulet (Mykkanen et Wasserman, 1980) que chez le rat (Sato *et al*, 1986). En revanche, les travaux réalisés récemment

chez le porc (Pointillart et Guéguen, 1989) et chez le rat (Brommage *et al*, 1991) tendent à montrer que des régimes alimentaires contenant ces phosphopeptides n'avaient pas d'effet significatif sur l'absorption du calcium. Par ailleurs, le pouvoir de solubilisation du calcium par ces séquences, démontré à plusieurs reprises (Gerber et Jost, 1986; Sato *et al*, 1986) a été relié au rôle de ces séquences dans la biodisponibilité du minéral. Nos résultats (tableau IV) indiquent qu'il en est de même dans le cas du fer. Le peptide β CN(1-25) augmente fortement le pourcentage de fer soluble aux pH 7 et 8. Cependant, l'affinité plus élevée du fer pour le β CN(1-25) comparativement au calcium, pourrait rendre le fer moins biodisponible (Kane et Miller, 1984; Hurrell *et al*, 1989) que le calcium.

Par l'utilisation de l'alcalase et de la phosphatase, nous avons étudié l'action enzymatique sur la libération du fer par le β CN(1-25). Si l'on en juge par la quantité de fer lié au pic P_2 , l'hydrolyse par l'alcalase ne permet pas de relarguer le fer complexé. L'enzyme n'est active que sur les extrémités N et C terminales du peptides. Le fragment 5-22 n'est pas hydrolysé malgré sa richesse en sites préférentiels de coupure (2 Leu, 2 Val, 1 Gly, 1 Ile).

Tableau IV. Inhibition de la précipitation du fer dans le tampon phosphate à pH 7 et pH 8 en présence et en absence du β CN(1-25), après 120 min d'incubation.

Inhibition of iron precipitation in phosphate buffer at pH 7 and pH 8 in the presence and in the absence of β CN(1-25) peptide after 120 min of incubation.

| | - β CN(1-25) | | + β CN(1-25) | |
|----------------------------|--------------------|--------|--------------------|--------|
| | pH = 7 | pH = 8 | pH = 7 | pH = 8 |
| Fer dans le surnageant (%) | 23 | 41 | 81 | 84 |

Ce résultat confirme la résistance connue des CPP vis-à-vis des endopeptidases (Naito et Suzuki, 1974; Meisel et Frister, 1989). En revanche, cette étude montre que les 4 phosphosérines sont accessibles à l'action de la phosphatase acide, même en présence du fer. Cependant, 5 h d'incubation ont été nécessaires pour une déphosphorylation complète, contre 3 h en absence du minéral.

Les résultats de cette étude laissent à penser que l'action des phosphatases intestinales pourrait contribuer à l'absorption de ce minéral. Une relation entre l'augmentation de l'activité des phosphatases intestinales et l'absorption du calcium chez le rat a d'ailleurs été décrite par Dupuis *et al* (1978). Cependant, des études approfondies sur la nature biochimique et physico-chimique des complexes phosphopeptide-minéraux sont nécessaires pour mieux appréhender le rôle physiologique de ces séquences.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient D Mollé pour la purification du β CN(1-25), et M Piot pour les analyses d'acides aminés.

RÉFÉRENCES

- Bates GW, Workman EF, Schlabach MR (1973) Does transferrin exhibit ferroxidase activity? *Biochem Biophys Res Commun* 50, 84-90
- Baomy JJ, Brulé G (1988) Effect of pH and ionic strength on the binding of bivalent cations to β -casein. *Lait* 68, 409-418
- Baomy JJ, Guenet P, Sinbandhit S, Brulé G (1989) Study of calcium binding to phosphoserine residues of β -casein and its phosphopeptide (1-25) by ^{31}P NMR. *J Dairy Res* 56, 403-409
- Berrocal R, Chanton S, Juillerat MA, Pavillard B, Scherz JC, Jost R (1989) Tryptic phospho-

- peptides from whole casein. II. Physicochemical properties related to the solubilization of calcium. *J Dairy Res* 56, 335-341
- Brommage R, Juillerat MA, Jost R (1991) Influence of casein phosphopeptides and lactulose on intestinal absorption in adult female rats. *Lait* 71, 173-180
- Brulé G, Fauquant J (1982) Interaction des protéines du lait et des oligo-éléments. *Lait* 62, 323-331
- Brulé G, Roger L, Fauquant J, Piot M (1980) Procédé de traitement d'une matière première à base de caséine, contenant des phosphocasinates des cations bivalents, produits obtenus et applications. Brevet français n° 80 02 280
- Chen PS, Toribara TY, Warner M (1956) Microdetermination of phosphorus. *Anal Chem* 28, 1756-1758
- Demott BJ, Dincer B (1976) Binding added iron to various milk proteins. *J Dairy Sci* 59, 1557-1559
- Dupuis Y, Digaud A, Fournier P (1978) Phosphatases alcalines intestinales et composés glucidiques dans leurs rapports avec l'absorption du calcium. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 18, 1129-1139
- Gerber HW, Jost R (1986) Casein phosphopeptides: their effect on calcification of *in vivo* cultured embryonic rat bone. *Calcif Tissue Int* 38, 350-357
- Grant CT, Taborsky G (1966) The generation of labile, protein-bound phosphate by phosphoprotein oxydation linked to the autoxydation of ferrous iron. *Biochemistry* 5, 544-555
- Harzer G, Kauer H (1982) Binding of zinc to casein. *Am J Clin Nutr* 35, 891-897
- Hurrell RF, Lynch SR, Trinidad TP, Dassenko SA, Cook JD (1989) Iron absorption in humans as influenced by bovine milk proteins. *Am J Clin Nutr* 49, 546-552
- Kane AP, Miller DD (1984) *In vitro* estimation of the effects of selected proteins on iron bioavailability. *Am J Clin Nutr* 39, 393-401
- Kojima N, Bates GW (1981) The formation of Fe^{3+} -transferrin- CO_3^{2-} via the binding and oxydation of Fe^{2+} . *J Biol Chem* 256, 12034-12039
- Korycka-Dahl MB, Richardson T (1978) Activated oxygen species and oxydation of food constituents. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 10, 209-241
- Le Grand D, Mazurier J, Montreuil J, Spik G (1988) Structure and spatial-conformation of the iron-binding sites of transferrins. *Biochimie* 70, 1185-1195
- Léonil J, Nau F, Mollé D, Maubois JL (1989) Procédé d'obtention à partir de la caséine β , de fractions enrichies en peptides à activité biologique, et les fractions peptidiques obtenues. Demande de brevet français n° 89 109 31
- Lonnerdal B, Keen CL, Hurley LS (1985) Manganese binding proteins in human and cow's milk. *Am J Clin Nutr* 41, 550-559
- Manson W, Annan WD (1971) The structure of a phosphopeptide derived from β casein. *Arch Biochem Biophys* 145, 16-26
- Meisel H, Frister H (1989) Chemical characterization of bioactive peptides from *in vivo* digests of casein. *J Dairy Res* 56, 343-349
- Mykkanen HM, Wasserman RM (1980) Enhanced absorption of calcium by casein phosphopeptides in rachitic and normal chicks. *J Nutr* 110, 2141-2148
- Naito H, Suzuki H (1974) Further evidence for the formation of phosphopeptide in the intestinal lumen from dietary β -casein. *Agric Biol Chem* 38, 1543-1545
- Pointillart A, Guéguen L (1989) Absence d'effet de l'incorporation d'un phosphopeptide du lait sur l'utilisation du calcium et du phosphore chez le jeune porc. *Reprod Nutr Dev* 29, 477-486
- Sato R, Noguchi T, Naito H (1986) Casein phosphopeptide enhances calcium absorption from ligated segment of rat small intestine. *J Nutr Sci Vitaminol* 32, 67-76
- Terré E, Maubois JL, Brulé G, Pierre A (1987) Procédé d'obtention d'une matière enrichie en caséine bêta, appareillage pour la mise en œuvre du procédé, et applications des produits obtenus par ce procédé comme aliments, compléments alimentaires ou additifs, en industrie alimentaire et pharmaceutique ou dans la préparation de peptides à activité physiologique. Brevet français n° 2592 769 A1