

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة الحراش – الجزائر-

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE

EL HARRACH (ALGER)

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT ES SCIENCES

en sciences agronomiques

Identification des peptides antibactériens issus de la caséine bovine par utilisation d'une métalloprotéase produite par une souche locale de *Lactococcus Lactis*

Présentée par :

Fateh **BOUGHERRA**

Devant le jury d'examen :

Président: **FERRADJI** Ali

Professeur ENSA EL Harrach

Directeur de thèse : **DILMIBOURAS** Abdelkader

Professeur UHBC Chlef

Co-directeur de thèse : **NEDAJR** Naima

Professeur UNIV. Lille1 France

Examineurs : **BENCHABANE** Ahmed

Professeur ENSA E Harrach

SEBAIHIA Mohamed

Maître de conférences UHBC Chlef

Remerciements

L'achèvement de ce travail mené sur plusieurs années procure une grande satisfaction. Il est l'occasion de se remémorer les différentes embûches qu'il a fallu surmonter mais surtout les personnes qui m'ont permis d'en arriver là.

Je tiens donc à exprimer toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse Monsieur le **professeur *Dilmi-Bouras Abdelkader***, dont les encouragements et les conseils bienveillants m'ont permis de réaliser ce travail. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront des moteurs de mon travail de chercheur.

Je tiens également, à exprimer ma reconnaissance et ma gratitude à Madame le **professeur *Naima Nedjar-Arroume***, de m'avoir accueilli au sein de son équipe au laboratoire ProBioGEM et pour toute son aide. Je suis ravi d'avoir travaillé en sa compagnie car outre son appui scientifique, elle a toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse.

A tous les membres de mon jury pour avoir consacré du temps et pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail, qu'il s'agit de :

Monsieur *Ferradji Ali*, professeur à l'ENSA d'El-Harrach. Je vous remercie vivement pour l'honneur que vous me faites de présider cette thèse. Pour m'avoir soutenue durant mon cursus universitaire en tant qu'enseignant et personne de qualité, veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.

A monsieur ***Benchabane Ahmed***, Professeur à l'ENSA d'El-Harrach. C'est avec joie que je le remercie également pour sa disponibilité, sa gentillesse et ses multiples conseils et d'avoir donné du temps pour évaluer ce travail.

A Monsieur ***Sbahia Mohamed***, maître de conférences à l'université Hassiba BenBouali de Chlef pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'être

membre de mon jury de thèse. Je tiens à l'assurer de ma profonde reconnaissance.

Je souhaite également, remercier chaleureusement tous les membres du laboratoire de Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien **ProBioGEM** de L'Université Lille 1 (France) sous la direction du professeur **Pascal Dhulster** et en particulier un retentissant hommage à feu monsieur le professeur **Didier Guillochon**. Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude et mes profonds respects.

Je tiens particulièrement à remercier Monsieur **Elhameur Hacène** maître de conférences à l'université Hassiba BenBouali Chlef, **Kadi Farid** manager de la SARL CSA et Monsieur **Balti Rafik** maître de conférences à l'institut de Biotechnologie de Béja université de Jendouba - Tunisie- pour leurs aides, leurs orientations et leurs conseils. Qu'ils trouvent ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Je ne peux manquer également d'exprimer avec tendresse toute ma reconnaissance à mes proches pour leur aide précieuse, leur réconfort et leurs encouragements efficaces.

Résumé

L'objectif de cette étude est l'obtention des peptides antimicrobiens issus de l'hydrolyse caséinolytique par une métalloprotéase pure de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* isolée à partir de lait de ferme de la région de Chlef.

La protéase a été purifiée essentiellement par les méthodes chromatographiques, la chromatographie échange de cations sur SP-Sépharose et la chromatographie sur gel filtration G-50SF. La masse moléculaire de la protéase a été estimée à 38KDa par gel filtration G-100 et SDS-PAGE. L'enzyme appartient à la classe des métalloprotéase, rarement signalée chez les lactocoques.

Le mode d'action de la protéase de Lc.116 sur la caséine a été révélée similaire que celui de la pepsine (protéase de référence). Ce mode adopte le mécanisme « one by one ». Ainsi, les peptides antimicrobiens sont considérés des produits d'hydrolyse intermédiaires.

Le cinétique d'hydrolyse été suivi par chromatographie liquide en phase inverse (CLHP-PI, colonne C18) et par électrophorèse type SDS-PAGE à 15%. Les peptides actifs ont été identifiés par spectrométrie de masse (LC/MS et MALDI-TOF), après fractionnement et purification en utilisant la méthode d'adsorption/désorption et la CLHP-PI. Ces sont caractérisés par la détermination de leurs concentrations minimales d'inhibition (CMI) et de la nature, bactériostatique ou bactéricide, de leur activité.

Des extraits enrichis en peptides antimicrobiens sont préparés par l'action d'une pepsine (enzyme de référence) et la protéase pure de Lc.116 sur la caséine bovine. Les peptides actifs obtenus du modèle pepsine/caséine correspondent à ceux déjà connus de la caséine α_{s2} (164-179 ; 148-166 ; 180-207 ; 183-207 et 176-207) et à de nouveaux fragments identifiés et dont certains sont des précurseurs de peptides actifs : (131-174), (153-196), (99-137) (99-163/100-164), (114-176) (115-174), (126-184), (28-90) et (138-184) pour la caséine α_{s2} et (9-68/70-126) pour la caséine α_{s1} . L'extrait enrichi en peptides antimicrobiens ainsi que le peptide α_{s2} (164-207) séparé à l'état pur, ont présenté des valeurs de CMI plus faibles sur les souches à Gram-positif comparées à celles déterminées sur les souches à Gram-négatif. A la CMI, ils présentent un effet bactériostatique sur les bactéries à Gram-positif et un effet bactéricide sur les souches à Gram-négatif.

Par contre, pour le modèle métalloprotéase de Lc.116/caséine, un seul peptide actif identifié et généré de la caséine α_{s2} de masse moléculaire égale à 851,385 Da avec une séquence en peptides de type SSSEESII correspondant au fragment (24-31). Ce peptide a démontré une activité antibactérienne contre deux bactéries Gram-positives *Listeria innocua* ATCC 33090 et *Micrococcus luteus* ATCC 4698, et deux bactéries Gram-négatives: *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Salmonella enteritidis* ATCC13076. La prédiction de la structure secondaire du peptide indique qu'il est anionique et adopte une structure en hélice aléatoire, avec une région d'hydrophobicité courte, ce qui lui confère un comportement particulier comparé aux celui des peptides antimicrobiens conventionnels. Ce peptide n'a jamais été signalé dans la littérature et considéré comme un nouveau peptide antibactérien qui va s'ajouter au groupe des peptides antimicrobiens.

Mots clés : peptides antimicrobiens, caséine bovine, métalloprotéase, *Lactococcus lactis*, RP-HPLC, MALDI-TOF, CMI.

Abstract

The objective of this study is the obtaining of antimicrobial peptides derived from hydrolysis caseinolytic by a metalloprotease of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* isolated from farm milk in the region of Chlef.

The protease was purified essentially by the chromatographic methods, the cation exchange chromatography SP-Sepharose chromatography and gel filtration on a G-50SF. The molecular weight of the protease is equal to 38KDa estimated by G-100 gel filtration and SDS-PAGE. The enzyme belongs to the class of metalloproteinase rarely reported in lactococci.

The action of the protease pepsin (reference protease) and Lc.116 protease on casein follows a mechanism named "one by one". According to the results, antimicrobial peptides are intermediate hydrolysis products.

The hydrolysis is carried out by the action of three gastrointestinal proteases; pepsin, trypsin and chymotrypsin. The hydrolysis is followed by chromatographic (RP-HPLC, C18 column) and electrophoresis (SDS-PAGE, 15 %) analysis. The active peptides were identified by mass spectrometry (LC/MS and MALDI-TOF), after split and purification on RP-HPLC. They are characterized by determination of the Minimum inhibitory concentration (MIC) and bactericidal or bacteriostatic properties.

Extracts enriched antimicrobial peptides are prepared by the action of a reference enzyme (porcine pepsin) and the purified protease Lc.116 Bovine casein. The active peptides obtained for the case of the reference protease correspond to those already known to the α_2 casein (164-179; 148-166; 180-207; 183-207 and 176-207) and new fragments identified and whose some are precursors of active peptides: (131-174) (153-196) (99-137) (99-163 / 100-164), (114-176) (115-174) (126-184), (28-90) and (138-184) for the α_2 casein (9-68 / 70-126) for α_1 casein. The enriched extract antimicrobial and α_2 the peptide (164-207), separated in the pure state, and showed lower MIC values against Gram-positive strains compared with those determined on the strains Gram negative. At the MIC, they exhibit a bacteriostatic effect against Gram-positive bacteria and a bactericidal effect on gram-negative strains.

However, in the case of the purified protease of Lc.116, only one active peptide identified and generated from the α_2 casein with a molecular mass equal to 851.385 Da having a sequence of peptide of the SSSEESII type. This peptide demonstrated antibacterial activity against two Gram-positive bacteria: *Listeria innocua* ATCC 33090 and *Micrococcus luteus* ATCC 4698, and two Gram-negative bacteria: *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella enteritidis* ATCC13076. Prediction of peptide secondary structure indicated that this peptide is anionic and must have random coil structure with a small region of hydrophobicity, which confers to the peptide unusual behavior compared to conventional antimicrobial peptides. This peptide has never been reported in the literature and is considered a novel antibacterial peptide which will be added to the group of antimicrobial peptides.

Key words: antimicrobial peptides, bovine casein, metalloprotease, *Lactococcus lactis*, RP-HPLC, MALDI-TOF, CMI.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو الحصول على ببتيدات مضادة للميكروبات من كازين حليب الأبقار بفعل التحلل الأنزيمي الخاص بالبكتريا اللبنة *Lactococcus lactis* subsp *lactis* المنتقاة من حليب بقر المزرعة لمنطقة الشلف. تم عزل الأنزيم بواسطة طرق التحليل الكروماتوغرافي أساسا، التحليل الكروماتوغرافي للتبادل الأيوني SP-Sépharose و الهلام النفوذى. الوزن الجزيئى لأنزيم تم تحديده بواسطة التحليل الكروماتوغرافي G-100 و SDS-PAGE مساويا 38KDa. الأنزيم ينتهي الى قسم الأنزيمات المعدنية التي ناذرا ما تم التطرق إليها بخصوص *Lactococcus lactis*. إن الأنزيمين البيبسين و الأنزيم المنتقاة من Lc.116 تعملان على الكازين وفقا لآلية وسيطة بين الآلية (واحد تلو الآخر). وفقا لنتائج المتحصل عليها ، البيبتيدات المضادة للميكروبات هي منتجات التحلل وسيطة.

يتبع التحلل عن طريق التحليل الكروماتوغرافي (RP-HPLC C18)، و الكهربائي (SDS-PAGE 15%). تم تحديد البيبتيدات النشطة بقياس الطيف الكتلي (MALDI-TOF و LC/MS) بعد تنقيتها بواسطة التحليل الكروماتوغرافي و ميزة هذه البيبتيدات عن طريق تحديد تركيز الحد الأدنى المثبط (MIC) و طريقة تأثيرها على البكتيريا .

التحلل بفعل الببسين ينتج بيبتيدات مضادة للميكروبات من كازين الأبقار. تم تحضير مستخلص من البيبتيدات المضادة من حلامة الكازين البقري بانتزاع هذه البيبتيدات عن طريق الترسيب تحت تأثير القوة الأيونية و درجة الحموضة. تستمد البيبتيدات النشطة من كازين α_{s2} و كازين α_{s1} إنها تتوافق مع الشظايا (179-164) (166-148) (180-100) (207-183) (207-176) كازين α_{s2} . وقد تم تحديد بيبتيدات نشطة جديدة : (174-132) (196-153) (137-99) (164-100) (176-114) (174-115) (184-126) (184-28) (90-28) (184-138) من كازين α_{s2} و (68-9) (126-70) من كازين α_{s1} . البيبتيد α_{s2} (207-164) الذي تم فصله في حالة نقية و مستخلص البيبتيدات النشطة أدهرو انخفاض في قيم الحد الأدنى المثبط (MIC) على البكتيريا إيجابية الجرام مقارنة بتلك التي حددت على سلالات سالبة الجرام. البيبتيدات المضادة التي تم اختبارها بتركيز يساوي لقيمة (MIC) ، يكون لها تأثير مثبت على تكاثر البكتيريا إيجابية الجرام و تأثير مبيد على سلالات سالبة الجرام .

أما فيما يخص الأنزيم المنتقاة فانه تم تحديد بيبتيد واحد مضاد للبكتيريا تم عزله من كازين α_{s2} ذو وزن جزيئى مساويا لـ 851.385 KDa و بنية تسلسلية الآتية SSSEESII و المتعلقة بالجزء (31-24). هذا البيبتيد أظهر نشاط ضد البكتيريا الضارة ، ضد اثنين تابعة الى قسم *Listeria innocua* ATCC 33090 Gram + و *Micrococcus luteus* ATCC 4698 و آخرتين تابعتين الى *Escherichia coli* ATCC 25922 Gram - و *Salmonella enteritidis* ATCC13076 . استشراف البنية الثانوية بينت أن البيبتيد ذو طبيعة أيونية ذو نمط حلقي عشوائي الشيء الذي يعطية خاصية غير موجودة عند البيبتيدات المعروفة.

الكلمات الرئيسية : البيبتيدات المضادة للميكروبات ، كازين ، الأنزيمات المعدنية ، *Lactococcus lactis* ، HPLC ,

MALDI-TOF, CMI

Liste des tableaux

Tableau 01	Peptides antimicrobiens dérivés des caséines bovines libérés par les protéases digestives (Benkerroum, 2010).	34
Tableau 02	Caractéristiques physicochimiques et teneur en lactoglobuline (β -Lg), α -lactalbumine (α -La) et lactoferrine (LF) dans le lactosérum et un isolât de protéine de lactosérum (Madureira <i>et al.</i> , 2010 ; Huffman et Harper, 1999).	35
Tableau 03	Conditions d'hydrolyse pour la production de peptides antimicrobiens à partir des protéines laitières.	43
Tableau 04	Lieu, origine animale et nombre de prélèvement du lait cru.	46
Tableau 05	Résultat du criblage de l'activité protéolytique des cultures pures de <i>Lactococcus lactis</i> .	72
Tableau 06	Résultats des étapes de purification de la protéase de Lc.116.	79
Tableau 07	Effet des inhibiteurs sur l'activité de la protéase Lc.L16.	82
Tableau 08	Effet de différents ions métalliques (5 mM) sur l'activité de la protéase Lc.L16.	84
Tableau 09	Activité antibactérienne des hydrolysats peptiques de la caséine bovine, test d'activité antibactérienne réalisé selon la méthode de diffusion sur milieu solide.	103
Tableau10	Activité antibactérienne des fractions peptidiques collectées par HPLC à partir de l'extrait peptidique.	107
Tableau 11	Masse moléculaire et séquence en acides aminés des peptides contenus dans l'extrait peptidique de l'hydrolysat pepsique de la caséine bovine.	115
Tableau 12	Concentration minimale inhibitrice (CMI) du peptide α_{s2} (164-207) et de l'extrait peptidique en comparaison à la tétracycline et la nisine.	122
Tableau 13	Taux de mortalité cellulaire engendré par le peptide α_{s2} (164-207) et de l'extrait peptidique lorsqu'ils sont employés à une concentration égale à leurs CMI	123

Tableau 14	Activité antibactérienne des hydrolysats protéasiques de la caséine bovine.	126
Tableau 15	Activité antibactérienne des de la solution de peptides de désorption et les fractions.	130
Tableau 16	Masse moléculaire et séquence en acides amines des peptides contenus dans la solution de désorption issue de l'hydrolysats de 4h de la caséine bovine.	134
Tableau 17	Masse moléculaire et séquence en acides amines du peptide actif contenu dans la Fraction 1	138

Liste des figures

Figure 1	Représentation schématique du système protéolytique chez <i>Lactococcus</i> d'après Garault <i>et al.</i> (2002) et Monnet (2006).	8
Figure 2	Modèle de transport d'oligopeptides (Opp) chez les bactéries Gram+ (Doeven <i>et al.</i> , 2008).	9
Figure 3	Représentation schématique du système de transport Ami chez <i>Lactococcus</i> .	10
Figure 4	Organisation génétique des gènes <i>amiA</i> chez <i>Lactococcus</i> (Garault <i>et al.</i> , 2002).	11
Figure 5	Représentation schématique des CEPs "cell envelope proteases" de différentes bactéries lactiques.	14
Figure 6	Schéma du mécanisme de libération de la protéase de <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> .	16
Figure 7	Comparaison des extrémités C-terminales des protéases de type Prt de différentes bactéries (<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i>).	17
Figure 8	Mécanisme d'attraction d'après Zasloff, (2002).	26
Figure 9	Modèle en "douve de tonneaux" d'après Brodgen (2005).	28
Figure 10	Modèle des "pores toroïdaux" d'après Brodgen, (2005).	29
Figure 11	Modèle en tapis d'après Brodgen, (2005).	30
Figure 12	Mode d'action intracellulaire des PAM d'après Brogden, (2005).	31
Figure 13	Séquence en acides aminés de la β -Lg et des 4 domaines antimicrobiens obtenus par digestion trypsique de la protéine (Pellegrini <i>et al.</i> , 2001).	36
Figure 14	Séquences en acides aminés des trois domaines antimicrobiens obtenus par hydrolyse trypsique (LDT1 et LDT2) et chymotrypsique (LDC) de l' α -Lactalbumine (Pellegrini <i>et al.</i> , 1999).	37
Figure 15	Illustration du domaine NI de la lactoferrine bovine. La lactoferrampine (LFampin), correspondant aux acides aminés 268 à 284, est située à proximité de la lactoferricine (LFcin) qui comprend les acides aminés 17 à 41 dans le domaine NI de la lactoferrine (Van der Kraan <i>et al.</i> , 2004).	39
Figure 16	Diagramme représentant la démarche expérimentale pour la recherche et l'identification des peptides antimicrobiens à partir de la collection lactocoques.	45
Figure 17	Système de laboratoire pour l'étude de la cinétique enzymatique.	54

Figure 18	Schéma réactionnel d'orthophtaldialdéhyde (OPA) sur les groupements amines.	56
Figure 19	Principe du MALDI.	61
Figure 20	Schéma en coupe d'un triple quadripôle.	63
Figure 21	Principe d'un spectromètre de masse en tandem	63
Figure 22	Schéma théorique de la <i>fragmentation</i> d'un peptide.	64
Figure 23	Spectromètre de masse de type UltraFlex II MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).	65
Figure 24	Schéma de principe de la méthode de diffusion sur gélose.	66
Figure 25	Exemple d'un résultat de la mise en évidence de l'activité protéolytique de trois souches de <i>Lactococcus</i> Lc.C1, Lc.C2, LcD3, Lc.111, Lc.112 et Lc.116 après 48h d'incubation sur gélose au lait.	73
Figure 26	Pouvoir protéolytique des souches de <i>Lactococcus</i> testées.	74
Figure 27	Cinétique de croissance et de production de la protéase de <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> Lc.L16. Les échantillons ont été prélevés à 3 heures d'intervalle pour la détermination de la croissance cellulaire (Log CFU / ml) et de l'activité de la protéase.	76
Figure 28	Profil d'élution de <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> Lc.L16 protéase à partir d'une colonne de SP-Sepharose. L'enzyme a été éluée avec un gradient linéaire de NaCl (0-1 M) dans 50 mM de tampon Tris-HCl (pH 8,0) à un débit de 120 mL/ h.	78
Figure 29	Profil de purification de la protéase de <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> Lc.L16 par gel filtration sur une colonne de Sephadex G-50.	78
Figure 30	a) SDS-PAGE de la protéase purifiée à partir de <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> Lc.L16. b) Zymogramme du surnageant brut de <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> et l'enzyme purifiée. c) Estimation de la masse moléculaire de la protéase Lc.L16.	80
Figure 31	Effet du pH sur l'activité (a) et la stabilité (b) de la Lc.L16 protéase purifiée.	81
Figure 32	Effet de la température sur l'activité (a) et la stabilité (b) de la protéase purifiée Lc.L16.	82
Figure 32	Profils HPLC (a et b) des hydrolysats de 24 H de la caséine bovine obtenus à différents rapports (E/S) par la pepsine à pH 2,5 et à 37°C.	89
Figure 33	Profil HPLC à 215 nm (a, b, c et d) de la cinétique d'hydrolyse pepsique de la caséine bovine à 5 % (p/v), à pH 2,5 et à 37°C, E/S = 1/100.	91
Figure 34	Profil électrophorétique sur SDS-PAGE à 15% de la cinétique	92

d'hydrolyse pepsique de la caséine bovine (E/S =1/100)

Figure 35	Evolution, en fonction du temps, du degré d'hydrolyse (DH) de la caséine bovine sous l'action de la pepsine (E/S=1/100).	92
Figure 36	Profil RP-CLHP des hydrolysats de 20 h de la caséine bovine obtenus à différents rapports (E/S) par la protéase purifiée de Lc.L16 à pH 7 et à 55°C.	95
Figure 37	Profil CLHP-PI (A, B, C, D et E) de la cinétique d'hydrolyse par protéase purifiée de Lc.L16 de la caséine bovine à 5 % (p/v), à pH 7 et à 55°C, rapport E/S = 1/5 à 215nm.	100
Figure 38	Profil électrophorétique sur SDS-PAGE à 15% de la cinétique d'hydrolyse de la caséine bovine par la protéase purifiée de Lc.L16 (1/5 de rapport E/S).	101
Figure 39	Evolution du degré d'hydrolyse (DH) de la caséine bovine sous l'action de la protéase purifiée de Lc.L16 (1/5 de rapport E/S) en fonction du temps.	101
Figure 40	Zones d'inhibition obtenues sur la souche <i>E.coli</i> JM109 des hydrolysats pepsiques de la caséine bovine	103
Figure 41	Profil HPLC de l'hydrolysat de caséine bovine obtenu à 30 min d'hydrolyse pepsique.	104
Figure 42	Profil HPLC des peptides antimicrobiens précipités à différentes forces ioniques exprimées en molarité de NaCl ajouté à l'hydrolysat, pH maintenu à 7,5.	106
Figure 43	Profil HPLC de l'extrait peptidique issu de l'hydrolysat pepsique à 30min de la caséine bovine par précipitation à 2M de NaCl et à pH 7,5.	107
Figure 44	Profil HPLC des peptides antimicrobiens précipités à différents pH de l'hydrolysat pepsique de la caséine bovine.	108
Figure 45	Photos montrant les zones d'inhibition observées sur <i>E.coli</i> JM109 (a) et <i>L. innocua</i> (b) des solutions obtenues par précipitation à différents pH de l'hydrolysat pepsique de la caséine bovine.	109
Figure 46	Spectre de masse du peptide α_{s2} (164-207) analysé en LC/MS, (ESI/Q).	111
Figure 47	Spectres de masse des fractions 4, 10, 13, 14, 15 et 17 collectées sur HPLC à partir de l'extrait peptidique et analysées par MALDI-TOF.	114
Figure 48	Représentation des peptides antimicrobiens sur la chaîne de la caséine α_{s1} (a) et de la caséine α_{s2} (b) bovine.	119
Figure 49	Zones d'inhibition des échantillons testés sur les souches cibles ; a : <i>B. cereus</i> , b : <i>S. aureus</i> CIP 4.83, c : <i>B. subtilis</i> ATCC 6633, d : <i>L. monocytogène</i> ATCC 3512, e : <i>L. innocua</i> LMG 11387, f : <i>E. coli</i> JM109 , g : <i>E. coli</i> CIP 54127, h : <i>E. coli</i> DH5α .	124

Figure 50	Photos montrant les zones d'inhibition obtenues sur la souche <i>Listéria innocua</i> LMG 11387 des hydrolysats de la caséine bovine par l'action de la protéase purifiée	125
Figure 51	Profils RP-CLHP des solutions de désorption des hydrolysats (a) ; (b) de caséine bovine à différents temps d'hydrolyses	129
Figure 52	Chromatogramme RP-CLHP de la solution de désorption issue de l'hydrolysats de 4 h.	131
Figure 53	Zone d'inhibition de la fraction 1 testée sur <i>L. innocua</i> LMG 11387.	131
Figure 54	Spectre de masse en MALDI-TOF de la fraction de l'hydrolysats de 4h issue de la désorption.	132
Figure 55	Représentation des peptides antimicrobiens sur la chaine de la caséine α_{S1} (a) et de la caséine α_{S2} (b) de la solution de désorption de l'hydrolysats de 4h.	135
Figure 56	Représentation des peptides antimicrobiens sur la chaine de la caséine béta (a) et de la caséine kappa (b) de la solution de désorption de l'hydrolysats de 4h.	136
Figure 57	Spectres de masse de la fraction 1 obtenu par MALDI-TOF.	137
Figure 58	Résultat de l'analyse en MS/MS du peptide actif de masse 851,385 Da.	139

Tables des matières

Listes des tableaux

Listes des figures

Introduction générale.....	5
I. Classification actuelle des peptides antimicrobiens	6
1.1. Les peptides antimicrobiens cationiques	6
a. Les peptides linéaires formant des hélices α	6
b. Les peptides linéaires riches en certains AA	6
c. Les peptides riches en cystéine	7
1.2 Les peptides anioniques	8
1.3. Mécanismes d'action et spectres d'activité	9
1.4. Mécanismes d'action et spectre d'activité des PAM antibactériens	9
1.4.1. Caractéristiques des membranes cellulaires	9
a. Les cellules procaryotes	9
b. Les cellules eucaryotes.....	12
1.4.2. Caractéristiques et spécificités des PAM	12
a. La charge des peptides antimicrobiens	13
b. La conformation des peptides	13
c. Amphiphilie des peptides	14
1.4.3 Mode d'action des peptides antimicrobiens cationiques	14
a. Attraction	14
b. Attachement, fixation à la surface de la bactérie	15
c. Interactions peptide/membrane	15
d. Les mécanismes de mort cellulaire	20
II. Obtention de peptides antimicrobiens par hydrolyse enzymatique de protéines.....	22
2.1. Généralités	22
2.2. Peptides antimicrobiens issus des protéines laitières.....	22
2.2.1. Peptides antimicrobiens issus des caséines	22
2.2.2. Peptides antimicrobiens issus des protéines de lactosérum.....	25
2.3. Production de peptides antimicrobiens par hydrolyse enzymatique.....	30
2.4. Protéases digestives.....	30

2.4.1. Protéases d'origine végétale et animale.....	31
2.4.2. Protéases d'origine bactérienne (de bactéries lactiques).....	31
2.4. Conditions d'hydrolyse pour la production de peptides antimicrobiens	32

II. Matériels et méthodes 35

1. Matériel biologique	35
1.1. Le lait.....	35
1.1.1. Origine.....	35
1.1.2. Prélèvement et contrôle	35
1.1.3. Technique de prélèvement.....	35
1.2. Souches de lactocoques.....	35
1.2.1. Origine des souches.....	36
1.2.2. Choix des laits.....	36
1.2.3. Prélèvement et conditionnement.....	36
1.3. Isolement et purification des lactocoques	37
1.3.1. Techniques d'isolement.....	37
1.3.2. Techniques de purification	37
1.3.3. Conservation des souches.....	37
1.3.4. Identification des isolats.....	37
1.4. Etude des caractères cultureux et morphologique.....	38
1.5. Etude des caractères physiologiques et biochimiques.....	38
1.5.1. Caractères physiologiques.....	38
1.5.2. Caractères biochimiques.....	39
1.5.3. Caractérisation du métabolisme carboné.....	40
1.5.4. Etude du métabolisme azoté.....	41
1.6. Recherche et sélection de souches protéolytiques	41
1.6.1. Détection de l'activité protéolytique sur milieu solide.....	41
1.6.2 Sélection de souches protéolytiques.....	41
1.6.2. Mesure de l'activité protéolytique.....	41
1.6.3. Dosage de l'activité protéolytique.....	41
1.6.4 Identification génotypique de la souche productrice.....	42
1.6.5. Détermination des conditions optimales pour l'extraction de l'enzyme	42

1.7. Purification de la protéase.....	42
1.7.1. Ultrafiltration.....	43
1.7.2. Chromatographie par échange ionique sur SP-Sepharose.....	43
1.7.3. Gel filtration sur Sephadex G-50.....	43
1.7.4. Electrophorèse sur gel polyacrylamide et Zymographie.....	43
1.7.5. Détermination des protéines	44
1.7.6. Détermination du poids moléculaire.....	44
1.7.7. La caractérisation biochimique de la protease purifiée.....	45
a. Effet du pH sur l'activité et la stabilité de l'enzyme.....	45
b. Effet de la température sur l'activité et la stabilité de l'enzyme.....	45
c. Effets des inhibiteurs de l'enzyme.....	45
d. Effet des ions métalliques.....	45
1.8. Hydrolyse enzymatique de la caséine bovine.....	46
1.9. Méthode d'analyses des peptides.....	46
1.9.1. Analyse des peptides par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse.....	46
1.9.2. Analyse des peptides par spectrométrie de masse.....	47
1.9.2.1. Technique de la désorption laser assistée par matrice : MALDI-TOF.....	48
1.10. L'activité antimicrobienne.....	52
1.10.1. La méthode de diffusion sur la gélose	52
III- Résultats et discussion.....	54
1. Elaboration du souchier	54
1.1 Caractéristiques des laits.....	54
1.2. Caractéristiques phénotypiques des isolats	54
2. Etude de l'activité protéolytique des souches isolées	56
2.1. Recherche de l'activité protéolytique.....	56
2.2. Détermination du pouvoir protéolytique.....	57
2.3. Identification génotypique de la souche Lc.L16.....	58

2.4. Détermination des conditions optimales pour l'extraction de l'enzyme	58
3. La purification de la protéase de Lc.L16	60
3.1. La caractérisation biochimique de la protéase purifiée.....	63
3.1.1. Effet du pH sur l'activité de la protéase et de la stabilité.....	63
3.1.2. Effet de la température sur l'activité et la stabilité.....	64
3.1.3. Effet de divers inhibiteurs sur l'activité de la protéase.....	65
3.1.4. Effet des ions métalliques.....	66
3.2. Obtention et caractérisation de peptides antimicrobiens issus d'hydrolyse enzymatique de caséine bovine	67
3.2.1. Hydrolyse enzymatique de la caséine bovine.....	68
3.2.2. Mise en évidence des peptides à activité antimicrobienne à partir d'hydrolysats de caséines bovines.....	77

IV. Conclusion générale

Références bibliographiques

Annexe

Introduction

Depuis des millénaires, les êtres humains ne cessent de se servir des microorganismes pour élaborer des produits alimentaires. Ces êtres microscopiques omniprésents notamment dans certains aliments que nous consommons, ne cessent d'occuper une place de plus en plus importante dans notre vie et sont actuellement des acteurs prépondérants dans l'essor des biotechnologies.

En effet, ce sont de remarquables usines biologiques, ils sont à l'origine de la genèse de nombreuses molécules d'intérêt. On leur doit, via des biotransformations (fermentation, bioconversion), la production de molécules organiques d'applications extrêmement variées en alimentaire, en pharmaceutique, en cosmétiques et en chimie. Parmi cette panoplie de molécules douées de propriétés fonctionnelles, on peut citer les alcools, les acides organiques, les acides aminés, les polysaccharides, les vitamines, les enzymes, les antibiotiques, les antifongiques, les bactériocines, etc.

Par ailleurs, on ne peut ignorer que certains de ces microorganismes sont responsables de pathologies pour l'homme qui les combat depuis toujours. L'usage de l'antibiothérapie (surtout abusive) a généré une antibioresistance chez ces microorganismes et est reconnue comme un problème majeur en termes de santé humaine et animale au niveau international. En effet, l'émergence et la diffusion croissante de souches de bactéries résistantes aux antibiotiques remettent en question l'efficacité de ces traitements tant chez l'Homme que chez l'animal. Un exemple bien connu de bactérie ayant acquis une résistance à plusieurs antibiotiques est *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM). La bactérie résistante peut se propager par différentes voies notamment celles associées à la chaîne alimentaire. A ce propos et dans une stratégie de combattre en urgence ces microorganismes pathogènes, des recherches intenses sont actuellement entreprises par beaucoup de scientifiques de la planète dans le but de trouver de nouvelles molécules bioactives d'origine naturelle, à savoir des antibiotiques, des antifongiques et des bactériocines, pour des applications pharmaceutiques, agricoles et alimentaires (Caplice et Fitzgerald, 1999).

Dans le domaine de la sécurité des aliments, les décideurs doivent protéger les consommateurs contre les risques liés à la chaîne alimentaire et définir les meilleures options de contrôle pour diminuer ces risques. Les scientifiques doivent rechercher les solutions les plus adaptées et les plus efficaces et les fournir aux transformateurs. En effet, les aliments que nous consommons qui sont en grande majorité d'origine biologique (végétale ou animale) et les modifications microbiologiques (par le développement de microorganismes altérants et pathogènes) qu'ils subissent, les rendent très vite inconsommables et voir impropres à la

consommation. L'une des voies, très prometteuse dans cette stratégie de combat investie par les scientifiques, est l'usage de peptides antimicrobiens qui peuvent être une alternative possible aux antibiotiques classiques (Swartz, 1994 ; Nikaido, 1994 ; Davies, 1994). Des travaux de recherches intensives ont été effectués pour détecter, purifier et caractériser la plupart de ces peptides pour une application à l'échelle industrielle (Benkerroum, 2010).

A ce jour, un répertoire de plus de 880 de ces peptides existent dans les bases de données internationales (Wang et Wang 2004 ; Rydengard *et al.*, 2008). Ce chiffre ne cesse d'augmenter, vu la diversité des protéines alimentaires qui sont maintenant reconnues comme une source importante de peptides bioactifs (Pellegrini, 2003).

De plus, il existe une grande variété de peptides antimicrobiens cryptés dans la séquence des protéines du lait qui sont libérés lors de l'hydrolyse appropriée par les protéases digestives (Clare et Swaisgood 2000) ou par fermentation avec des bactéries lactiques protéolytiques sélectionnées (Hayes *et al.*, 2006). Une fois que ces peptides sont libérés, ils exercent, en plus des activités antimicrobiennes, d'autres fonctions biologiques intéressantes comme antihypertenseur, opioïde, antithrombotique, immunomodulateur, (Clare et Swaisgood 2000). En outre, les peptides antimicrobiens présentent l'avantage d'être dérivée d'une source sans danger et peu coûteuse, avec un potentiel indéniable pour une utilisation en médecine ou dans l'industrie alimentaire.

À ce jour, les peptides antimicrobiens ont été obtenus à partir des protéines de lait de vache, la lactoferrine (Bellamy *et al.*, 1992b), α S1-caséine (Lahov et Regelson, 1996), α S2-caséine (Zucht *et al.*, 1995 ; Recio et Visser, 1999), α -actalbumine (Pellegrini *et al.*, 1999), β -lactoglobuline (Pellegrini *et al.*, 2001) et de k-caséine (Malkoski *et al.*, 2001).

Les protéases d'origine microbienne, y compris celles des bactéries lactiques, jouent un rôle primordial dans la production de peptides à partir de la caséine et éventuellement la libération de peptides antimicrobiens (Matar *et al.*, 2003). En raison de la nature hautement protéolytique des bactéries lactiques tels que *Lactococcus lactis* (Pritchard *et al.*, 1993 ; Kunji *et al.*, 1998) et *Lactobacillus helveticus* (Zevaco et Gripon, 1988 ; Martin-Hernandez *et al.*, 1994) leur utilisation en tant que levains pour la production de peptides bioactifs a été décrite (Nakamura *et al.*, 1995 ; Maeno *et al.*, 1996 ; Tsakalidou *et al.*, 1999 ; Gobetti *et al.*, 2000 ; Hayes *et al.*, 2006 ; de Castro et Sato, 2015).

La première partie de cette thèse, Rappels bibliographiques, consiste à une étude bibliographique détaillée, portant sur les généralités sur les bactéries lactiques, en particulier le

genre *Lactococcus*, en développant les différents systèmes protéolytiques caractéristiques à ce genre. Ensuite, une revue sur les peptides antimicrobiens, leurs classifications et leurs caractéristiques ainsi leurs mécanismes d'actions, enfin les différentes sources et les moyens pour l'obtention de ces peptides actifs.

La deuxième partie est consacrée à la description de la démarche globale adoptée pour la génération et l'identification des peptides antimicrobiens issus de l'hydrolyse caseinolytique par l'action d'une protéase appartenant à l'espèce *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Cette démarche consiste à :

- La recherche de souches de bactéries lactiques protéolytiques résidentes du microbiote du lait de chèvres, de brebis et de vaches dans le bassin laitier du moyen chellif.
- La purification et caractérisation de l'enzyme pouvant générer des peptides antimicrobiens à partir de la souche potentiellement protéolytique.
- Le comportement de la caséine bovine à la protéolyse par l'action de la protéase purifiée à partir de la souche productrice et le comparé avec celui de la protéase de référence (pepsine).
- Mise en évidence de l'activité antagoniste et une identification moléculaire de peptides antimicrobiens à partir des hydrolysats de caséine bovine par la protéase de référence (pepsine) et de la protéase purifiée on adoptant la même stratégie.

La troisième partie est consacrée à la présentation des résultats des différents points consignés au niveau de la démarche.

Rappels bibliographiques

I. Classification actuelle des peptides antimicrobiens

Les **peptides cationiques** sont classés selon trois grandes familles (Boman 2003; Andres *et al.* 2007) :

- les peptides linéaires formant des hélices α
- les peptides contenant un pourcentage élevé en un seul AA
- les peptides riches en cystéine avec un ou plusieurs ponts disulfure.

Parmi les **peptides non-cationiques**, nous distinguons les peptides anioniques et les peptides dérivés des protéines liées à l'oxygène.

1.1. Les peptides antimicrobiens cationiques

Les trois grandes familles de PAM cationiques présents dans de nombreuses espèces très différentes.

a. Les peptides linéaires formant des hélices α

Plusieurs centaines de peptides sont regroupés dans cette famille, identifiés dans une grande variété d'organismes : plantes, invertébrés ou vertébrés (Castro *et al.* 2005; Lemaitre *et al.* 2007; Lai *et al.* 2009; Guani-Guerra *et al.* 2010). Ces peptides sont caractérisés par :

- leur taille, inférieure à 40 AA ;
- leur caractère amphiphile marqué ;
- leur charge ;
- l'absence de résidus cystéine ;
- leur structure tertiaire qui forme des nœuds ou articulations (Diamond *et al.* 2009).

En solution aqueuse, la plupart de ces peptides sont déstructurés, et c'est au contact de la membrane bactérienne, ou de milieux mimant les membranes, qu'ils prennent une conformation en hélice α amphipatique (Powers *et al.* 2003; Brogden 2005; Jenssen *et al.* 2006).

b. Les peptides linéaires riches en certains AA

Ce sont des peptides qui n'adoptent pas de structure secondaire en hélice α ou en feuillet β . En anglais, on les nomme « extended peptides » ce qui signifie « peptide étendu » (Lai *et al.* 2009) ; ils possèdent une séquence dont la composition est dominée par un certain type d'AA, et sont composés d'environ 44 résidus (Andres *et al.* 2007; Diamond *et al.* 2009).

c. Les peptides riches en cystéine

Ces peptides dits cycliques sont stabilisés par un ou plusieurs ponts disulfure intramolécule-laires formés grâce à la présence de cystéine (Brogden 2005; Andres *et al.* 2007). Un des premiers peptides antimicrobiens cycliques découvert est la θ -défensine chez le singe rhésus, qui aurait apparemment évolué en α -défensine chez d'autres espèces par mutation au cours du temps (Lai *et al.* 2002; Bulet *et al.* 2004).

C'est un groupe très diversifié et le nombre de ponts disulfure conditionnent leur structure et leur activité : ces ponts disulfure peuvent être entre des feuilletts β (ex. des α -défensines), entre des structures mixtes α et β aussi appelées « open-ended » (ex. de la drosomycine), ou encore en épingle à cheveux (« hairpin-like ») (Bulet *et al.* 2004).

i. Peptides à un pont disulfure

Les peptides avec un pont disulfure sont très représentés chez les amphibiens, et se retrouvent au niveau de la peau essentiellement. Ils sont classés en 4 sous-groupes :

- les Brévinines chez la grenouille rouge d'Europe (*Rana esculenta*), Gaégurines chez la grenouille de Corée (*R. rugosa*), Ranalexines et petites Esculentines (contenant de 20 à 34 AA) ;
- les grandes Esculentines (36 à 46 AA) ;
- les Ranatuérines chez différentes espèces de grenouilles, comme *R. catesbeiana* et *R. temporaria* ;
- les Tigérinines chez la grenouille indienne (*R. tigerina*), constitués de 11 et 12 AA (Bulet *et al.* 2004).

Chez les mammifères, un seul représentant a été identifié, la Bacténécine, un dodecapeptide cyclique isolé dans les neutrophiles de bovins (Romeo *et al.* 1988).

ii. Peptides à deux ponts disulfure

Concernant le groupe ayant deux ponts disulfure, on retrouve :

- chez les arthropodes, la Gomesine isolée de la tarentule (*Lycosa tarentula*), l'Androctocine retrouvée chez le scorpion (*Androctonus australis*) (Ehret-Sabatier *et al.* 1996) ou encore les Tachyplésines isolées du crabe fer à cheval (*Tachypleus tridentatus*) (Kawabata *et al.* 1999).
- chez les mammifères, les seuls représentants sont les Protégrines, constituées de 16 à 18 résidus, et isolées dans les leucocytes porcins (Bulet *et al.* 2004). Notons que les Protégrines ont 17% d'homologie avec la Gomesine et 25% avec l'Androctocine, ce qui peut faire penser à l'existence d'un gène ancestral codant ces peptides.

iii. Peptides à quatre ponts disulfure

Une seule famille prenant une conformation en épingle à cheveux avec quatre ponts disulfure a été mise en évidence à ce jour chez les vertébrés : il s'agit des Hepsidines. On les trouve chez de nombreuses espèces de poissons au niveau des ouïes et du foie, ainsi que chez des mammifères, dont l'Homme, où elles sont présentes dans l'urine, le plasma et le foie. Deux hepsidines prédominent chez l'Homme, formées respectivement de 20 et 25 résidus, et il en existe une mineure, contenant 22 AA (Park *et al.* 2001; Shike *et al.* 2002).

iv. Peptides à 3 ou 4 ponts disulfure : les défensines

Une grande classe de PAM, retrouvée à la fois chez les vertébrés et les invertébrés, et constituée de 3 ou 4 ponts disulfure : ces PAM sont de forme cyclique (« open-ended cyclic ») (Wong *et al.* 2007). C'est un groupe de peptides très divers, appelés Défensines (Boman 2000).

v. Peptides à cinq ponts disulfure

Parmi les peptides cycliques, il existe un peptide cationique isolé de la sangsue (*Theromyzon tessulatum*) et nommé Théromacine, de 75 AA dont 10 résidus cystéine formant ainsi cinq ponts disulfure. Cette structure unique n'a été jusqu'à présent retrouvée dans aucune autre espèce, et joue un rôle important dans l'activité biologique de la molécule : la réduction du nombre de ponts disulfure entraîne la perte de son activité antibactérienne (Tasiemski *et al.* 2004).

1.2. Les peptides anioniques

Il existe, en plus des peptides cationiques, d'autres peptides possédant une activité antimicrobienne dans de nombreux organismes et notamment les peptides anioniques.

Les premiers peptides anioniques découverts en 1992 dans le liquide broncho-alvéolaire des ovins sont au nombre de trois, et requièrent la présence de zinc pour que leur activité soit maximale (Brogden *et al.* 2003).

Certains peptides dérivés des neuropeptides sont anioniques et ont été isolés des exsudats infectieux des bovins et de l'Homme : le Peptide B et l'Enkélytine. Ces peptides sont surtout actifs sur les bactéries à Gram négatif. Des molécules similaires ont été signalées chez des invertébrés (Marshall *et al.*, 2003). D'autres peptides anioniques sont riches en acide aspartique. Isolés dans les poumons infectés des ruminants, ils ont des structures similaires aux pro-peptides des protéases, comme la trypsine. Ils semblent jouer un rôle de régulateur dans le système enzymatique pulmonaire (Fales-Williams *et al.* 2002). En général, ce sont de petites molécules, présentant des régions d'homopolymère d'acide aspartique qui leur donnent le caractère anionique. Ils sont présents au niveau d'extraits de surfactants, dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire et dans les cellules épithéliales ciliées des voies aériennes. Produits en

quantité millimolaire, ils requièrent la présence de Zinc comme co-facteur pour leur action biologique et sont actifs contre les bactéries à Gram positif et négatif (Brogden 2005). Un de ces peptides, possédant 47 AA, a été identifié dans la sueur humaine : la Dermcidine (Schitteck *et al.* 2001). Le premier peptide anionique des invertébrés a été trouvé chez la sangsue (*Theromyzon tessulatum*), la Théromyzine, peptide de 86 AA (Tasiemski *et al.* 2004). Chez les amphibiens, le premier peptide anionique a été découvert chez *Bombina maxima*, la Maximin H5, contenant 3 résidus aspartiques et aucun AA basique (Lai *et al.* 2002).

Les PAM possèdent diverses activités, dont la principale est l'élimination de microorganismes, permettant ainsi la défense de l'organisme hôte. En effet, les PAM sont antibactériens, antiviraux, antifongiques, mais aussi antiparasitaires.

1.3. Mécanismes d'action et spectre d'activité des PAM antibactériens

In vitro, la plupart des PAM sont actifs contre différents types d'organismes, comme les bactéries à Gram positif et négatif, les protozoaires, les champignons filamenteux mais aussi certains virus enveloppés (Zasloff 2002; Powers *et al.* 2003; Lai *et al.* 2009). Les PAM ont donc un spectre d'activité antimicrobienne très large.

Les caractéristiques de ces peptides déterminant leur action sont la conformation, la charge mais également l'amphiphilie. Présents dans la plupart des tissus, les PAM sont capables de faire la distinction entre la cellule hôte et les agents pathogènes : il y a reconnaissance du soi et du non-soi (Yeaman *et al.* 2003).

1.4. Caractéristiques des membranes cellulaires

a. Les cellules procaryotes

Commençons par un petit rappel sur la structure des parois bactériennes. On définit la paroi comme l'ensemble des structures externes qui entourent la cellule bactérienne à l'exception de la membrane plasmique. Les bactéries à Gram positif et négatif possèdent toutes une structure commune qui forment un réseau autour de la membrane plasmique : c'est le peptidoglycane. Comme son nom l'indique, le peptidoglycane est constitué :

- d'une **partie glucidique** : il s'agit d'une alternance de N-Acétyl-

Glucosamine (NAG) et d'acide N-Acétyl-Muramique (NAM) reliés par des liaisons osidiques β 1-4.

- et d'une **partie peptidique** : 4 AA qui sont reliés par une liaison amide au niveau du NAM.

Le peptidoglycane est formé par de longues chaînes répétitives montrant une alternance NAG-NAM. Les macromolécules ainsi formées sont réunies au niveau des tétrapeptides pour former une structure solide (**figure 1**).

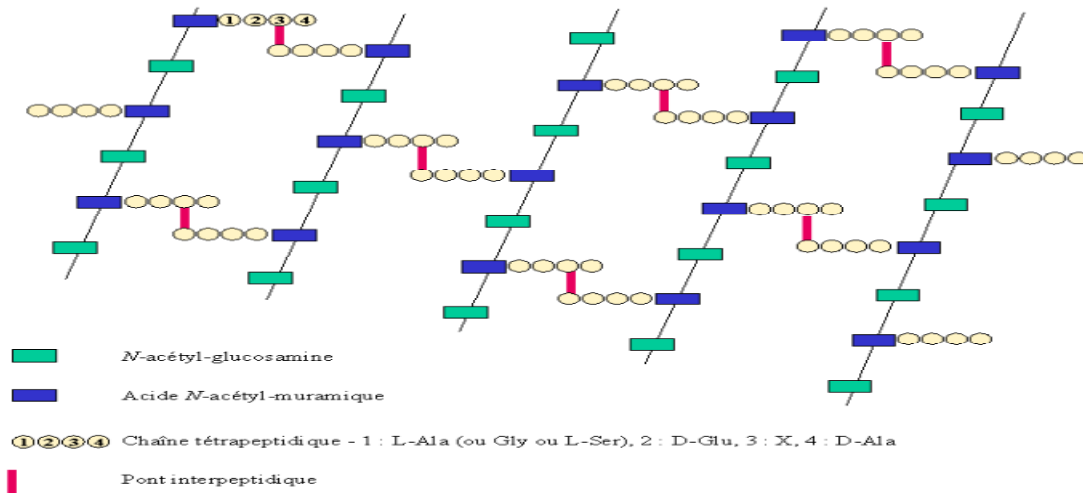


Figure 1 : Structure du peptidoglycane

i. Paroi des bactéries à Gram positif

Les bactéries à Gram positif (figure 2) contiennent un peptidoglycane pouvant aller jusqu'à 80 nm d'épaisseur, qui constitue 90% de la surface de la paroi. Des acides téichoïques (polymère à base de ribitol et glycérol phosphate) traversent ce peptidoglycane.

Certains sont ancrés directement dans la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une partie lipidique et portent le nom d'acides lipoteichoïques.

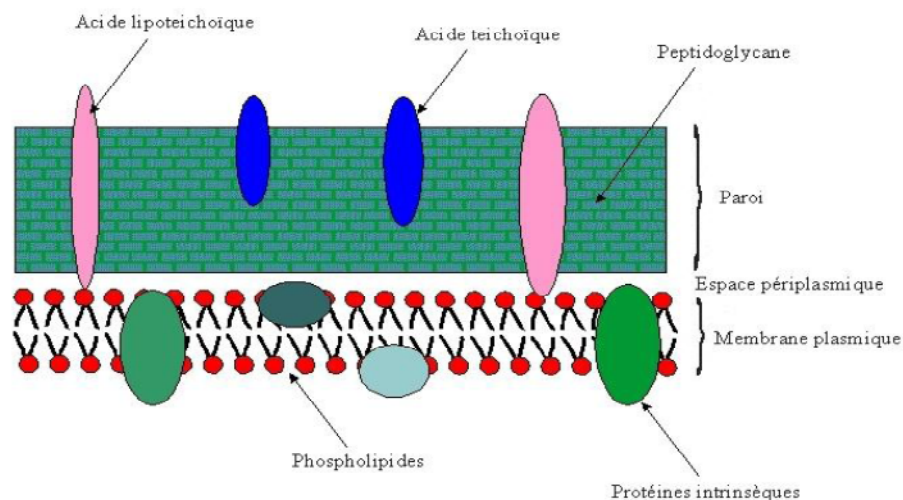


Figure 2 : Structure de la paroi des bactéries à Gram positif

ii. Paroi des bactéries à Gram négatif

La paroi des bactéries à Gram négatif se caractérise par un peptidoglycane plus fin (quelques nanomètres), représentant 5 à 20% des constituants, mais possède en plus une membrane externe entourant toute la cellule (figure 3). Cette membrane externe est formée d'une double couche de phospholipides et possède une molécule particulière encastrée dans cette double couche lipidique : le lipopolysaccharide (LPS), chargé négativement et spécifique aux bactéries à Gram négatif. Le LPS, également porteur d'une activité endotoxine est composé :

- d'une **partie lipidique hydrophobe**, le lipide A, responsable du pouvoir toxique du LPS
- et d'une **partie polysaccharidique**, constituée d'un core (= noyau) lié d'un côté au lipide A et de l'autre à une chaîne polysaccharidique terminale, aussi appelé chaîne O spécifique, responsable de la reconnaissance antigénique et de l'antigénicité.

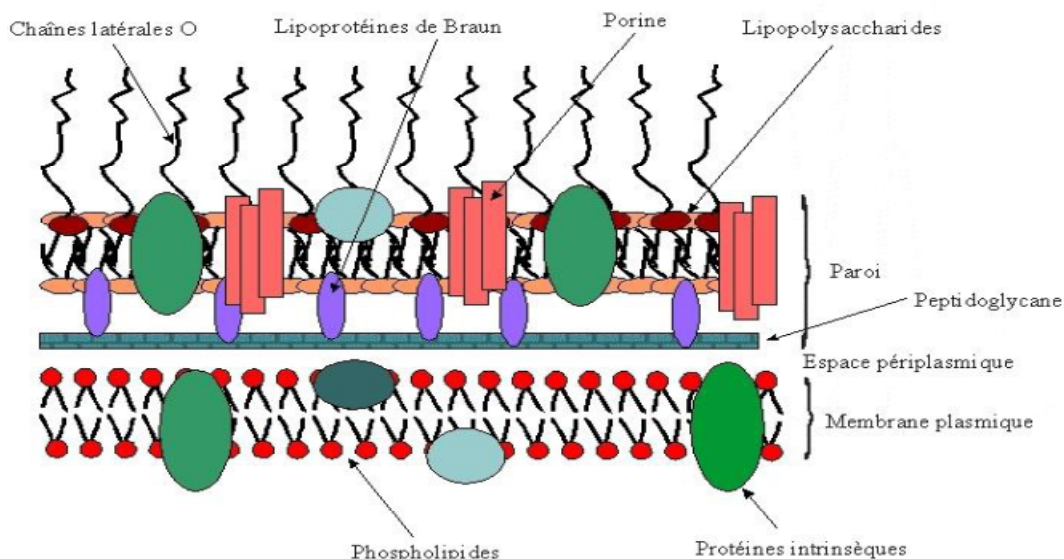


Figure 3 : Description de la paroi des bactéries à Gram négatif

iii. La membrane plasmique

L'élément essentiel de la membrane plasmique est la double couche lipidique (figure 24) : elle est constituée de phospholipides qui présentent un caractère amphiphile, avec un pôle hydrophile orienté vers l'extérieur et un domaine hydrophobe, orienté vers l'intérieur.

Cette répartition des phospholipides entre face externe et interne, et la proportion des autres composants de celle-ci diffèrent entre les cellules procaryotes et eucaryotes (Yeaman *et al.* 2003).

Chez les procaryotes, on trouve très rarement des stérols induisant cette charge neutre. Les membranes composées de façon prédominante en phosphatidylglycérol, cardiolipides ou phosphatidylsérine tendent vers une charge de surface très anionique ; ces compositions se retrouvent chez de nombreuses bactéries.

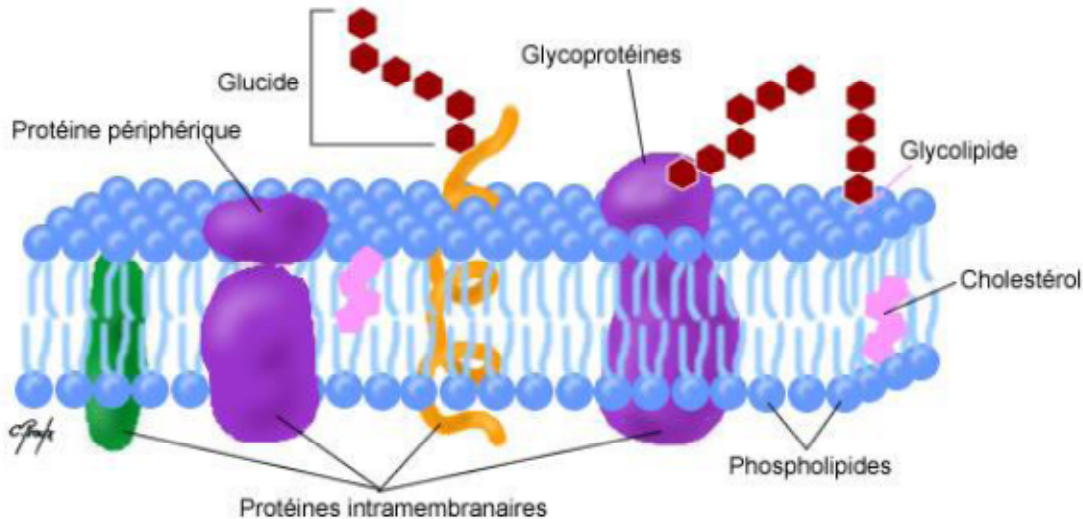


Figure 4 : Schéma d'une membrane plasmique de bactérie

b. Les cellules eucaryotes

Les phospholipides formant la membrane des cellules eucaryotes sont distribués de façon asymétrique (Shai 2002). La membrane est composée de phosphatidylcholine et de sphingomyéline ainsi que de stérols ayant une charge globale neutre (Yeaman *et al.* 2003). Cette richesse en phospholipides neutres et la présence de cholestérol comme élément stabilisateur entraînent peu d'interactions vis-à-vis des peptides cationiques antibactériens (Andres *et al.* 2007).

Les doubles membranes riches en phospholipides zwitterioniques (phosphatidyléthanolamine, phosphatidylcholine), présents dans les membranes cytoplasmiques des mammifères, ont généralement une charge neutre (Yeaman *et al.* 2003).

Ces caractéristiques de charge sont essentielles pour la compréhension des mécanismes d'action des PAM, notamment le fait qu'ils ne s'attaquent pas aux cellules eucaryotes.

1.5. Caractéristiques et spécificités des PAM

De nombreuses études ont été menées sur la relation entre la structure des PAM et leurs activités antimicrobiennes, mais il existe peu de données sur les bases moléculaires régissant la spécificité propre de chaque peptide (Gennaro *et al.* 2000; Tossi *et al.* 2000; Powers *et al.* 2003).

En effet, chaque peptide a un spectre d'activité distinct. Ainsi, la taille, la charge, la séquence en AA, l'hydrophobicité, l'amphiphilie ou encore le degré de structuration sont des facteurs spécifiques à chaque peptide (Boman *et al.* 1987; Gennaro *et al.* 2000). La modification d'un de ces paramètres entraîne des changements plus ou moins significatifs de l'activité antimicrobienne mais aussi de l'activité hémolytique de ces PAM, notamment en hélice α (Dathe *et al.* 2002). La présence d'une activité hémolytique est un inconvénient majeur pour la notion de bénéfique/risque.

De même, la composition de la surface des micro-organismes est importante, un PAM agissant parfois contre un microorganisme donné (Matsuzaki *et al.* 1995). En effet, certaines bactéries ont une résistance naturelle à certains PAM. La structure et la composition du LPS de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, ou la composition du peptidoglycane chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif sont deux propriétés pouvant jouer sur la résistance aux PAM.

a. La charge des peptides antimicrobiens

Le caractère cationique des PAM explique leur rapidité d'action et leur affinité pour les membranes anioniques des bactéries : plus la charge est importante, plus les interactions augmentent. Une étude menée sur 2 analogues des magainines démontre ce phénomène. L'augmentation de la charge cationique conduit à une augmentation de l'activité contre les bactéries à Gram positif et négatif. Cependant, il existe une limite au-delà de laquelle l'augmentation de la charge positive n'induit plus d'augmentation d'activité. Cela induit au contraire, une diminution de cette activité antibactérienne et une augmentation de l'activité hémolytique (Dathe *et al.* 2001).

b. La conformation des peptides

En milieu neutre, les peptides n'ont pas de structure précise. C'est en se fixant à la membrane bactérienne que les PAM vont prendre des structures spécifiques. Comme nous l'avons vu, plus le peptide est chargé, plus il se fixera aisément.

Chez les insectes et les amphibiens, les structures linéaires en hélice α sont fréquemment rencontrées. N'étant pas stable dans tous les milieux, le peptide va passer de la forme linéaire à hélicoïdale lorsqu'il se trouve en contact avec la paroi bactérienne (Matsuzaki *et al.* 1991; Bechinger *et al.* 1993).

A l'inverse, les peptides en feuillets β , contenant en plus des ponts disulfures, prennent des conformations beaucoup plus stables, possédant des surfaces hydrophobes et hydrophiles bien distinctes et montrent une interaction plus importante avec la paroi bactérienne.

Les formes cycliques sont plus rigides que les formes linéaires, et ont une efficacité moindre lors de la fixation initiale à la paroi bactérienne ; mais à concentration équivalente, elles présentent la même efficacité de perméabilisation membranaire. Ces conformations rigides cycliques n'étant pas affectées par l'interaction avec la membrane, leur activité peut être liée à une modification de leur structure tertiaire.

Il a été démontré que des peptides ont la capacité de se lier entre eux, en orientant leur domaine hydrophobe et hydrophile de façon à s'assembler. Cette aptitude à se lier est à l'origine de la formation des pores dans les membranes des bactéries, virus et fungi (Yeaman *et al.* 2003).

c. Amphiphilie des peptides

L'ensemble des PAM possèdent des groupements hydrophiles et hydrophobes, formant ainsi une structure amphiphile. L'augmentation de l'amphiphilie, qui peut se faire par l'augmentation du nombre d'hélices, accroît l'activité du peptide sur les membranes anioniques des micro-organismes, mais augmentent également les interactions avec les membranes neutres des cellules eucaryotes, rendant le peptide plus hémolytique (Yeaman *et al.* 2003).

1.6. Mode d'action des peptides antimicrobiens cationiques

La plupart des PAM cationiques ont une action directe sur la membrane des bactéries, mais certains agissent au niveau intra-cytoplasmique. Le mode d'action des PAM est surtout connu pour les peptides en hélice α , notamment les magainines et les cécropines, qui ont été beaucoup étudiés [Andres *et al.* 2007]. La composition particulière de la paroi bactérienne et sa charge globale nette négative (*versus* une charge globale neutre pour les cellules eucaryotes) en font une cible idéale pour les PAM (Zaslhoff 2002). Plusieurs modèles de systèmes membranaires ont été étudiés. Les mécanismes par lesquels les peptides perméabilisent et traversent les membranes bactériennes ne sont encore pas complètement élucidés, et varient selon les peptides [Yeaman *et al.* 2003].

Mais pour commencer, nous allons voir le mode d'action général de ces PAM, qui se déroule en plusieurs étapes. Nous détaillerons, à certaines étapes, les différents types de mécanisme qui ont été proposés.

a. Attraction

Le mécanisme d'action des peptides dépend en tout premier lieu de l'interaction du peptide avec la paroi bactérienne (figure 25). Cette attraction initiale se fait par l'intermédiaire de liaisons électrostatiques entre le peptide cationique et les phospholipides chargés négativement au niveau de la membrane externe de la bactérie à Gram négatif (Jenssen *et al.* 2006). Chez les bactéries à

Gram positif, l'attraction a lieu entre le PAM et les composants du peptidoglycane. C'est le mode d'attraction supposé pour la plupart des PAM. En effet, de nombreuses études ont démontré une forte corrélation entre la charge du peptide et l'attachement à la membrane (Bessalle *et al.* 1992; Vaz Gomes *et al.* 1993; Dathe *et al.* 2001).

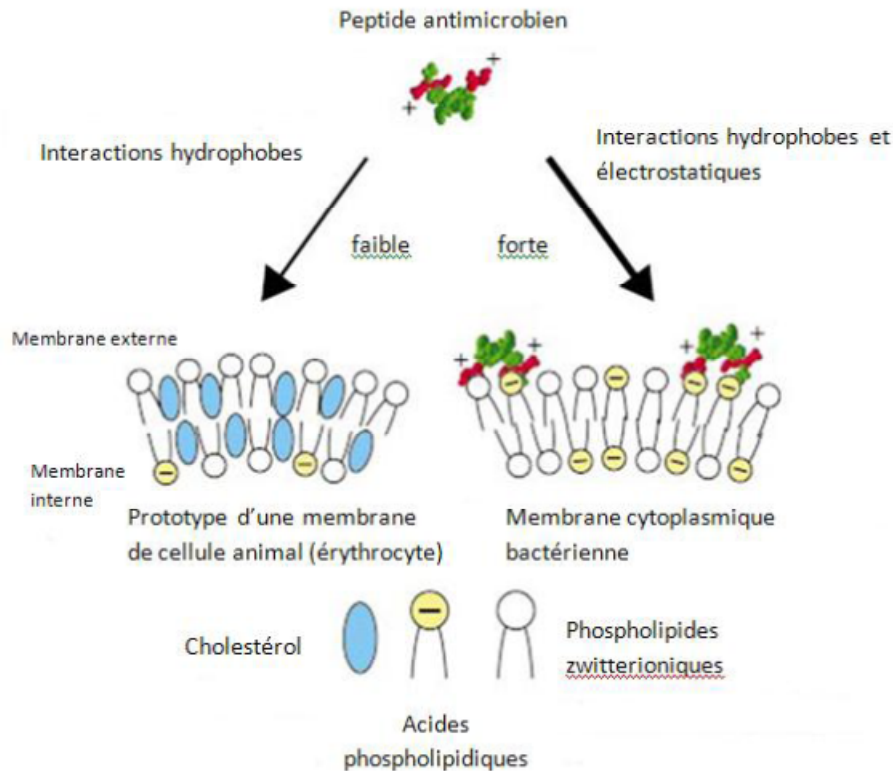


Figure 5 : Mécanisme d'attraction

b. Attachement, fixation à la surface de la bactérie

Vient ensuite l'étape d'attachement à la membrane externe pour les bactéries à Gram négatif ou au peptidoglycane pour les bactéries à Gram positif. Cette fixation se fait grâce aux groupements phosphates qui sont situés au niveau :

- du LPS pour les bactéries à Gram négatif
- des acides lipoteichoïques présents à la surface des bactéries à Gram positif.

L'importante proportion de lipides chargés négativement à la surface de la paroi des bactéries permet aux PAM de sélectionner les bactéries et non les cellules de l'hôte.

c. Interactions peptide/membrane

Après fixation, les peptides vont entraîner des perturbations et/ou une modification de la membrane externe ou plasmique ; cela aboutit à une modification de la perméabilité

membranaire. Le ou les mécanismes par lesquels les peptides exercent leur action font l'objet de plusieurs hypothèses:

- une privilégiant une action directement à la surface de la bactérie (3 modèles ont été proposés) : modèles de perméabilisation membranaire.

- une seconde indiquant une action intracellulaire provoquant la mort de la bactérie (un modèle décrit) : modèle de cible intracellulaire.

i. Les peptides perméabilisant les membranes

Les contraintes provoquées sur la bicouche lipidique (que ce soit la membrane externe des bactéries à Gram négatif ou la membrane plasmique des bactéries à Gram positif et négatif) entraînent une déstabilisation de la structure, formant ainsi des pores qui engendrent l'osmolyse de la cellule (Brogden 2005).

Il a été montré que les PAM peuvent avoir des états de fixation différents sur la membrane lipidique. En effet, il existe un état de surface, nommé « état S » et un « état I », lors de la formation de pores (Huang 2000).

« L'état S » correspond à un état inactif, où les peptides sont à plat sur la membrane de la bactérie, provoquant ainsi un amincissement de celle-ci (Chen *et al.* 2003). Les peptides prennent cet état S, avec une orientation parallèle à la membrane lorsqu'il y a un faible ratio peptides/lipides (Yang *et al.* 2001).

Lorsque ce ratio augmente, les peptides vont s'orienter perpendiculairement à la membrane, et s'y insérer : ils vont ainsi former des pores transmembranaires, et sont alors dans un « état I ». Pour créer un pore, il faut l'action simultanée de plusieurs peptides. Pour comprendre et expliquer la perméabilisation de la membrane par les peptides antimicrobiens, plusieurs modèles ont été proposés (Brogden 2005).

a- Le modèle « barrel stave »

Ce terme de « barrel-stave » signifiant douves de tonneau, fut le premier décrit (figure 26), et explique l'organisation des peptides lors de la perméabilisation des membranes. Dans ce modèle, un nombre variable de canaux sont formés par les peptides qui se positionnent en cercle formant un pore aqueux [Yeaman *et al.* 2003]. Les peptides s'insèrent ainsi dans la bicouche, les « lattes » du tonneau étant constituées de peptides en hélice α (Ehrenstein *et al.* 1977; Yang *et al.* 2001; Yeaman *et al.* 2003).

Plus précisément, la formation des pores implique plusieurs étapes. En premier lieu, les monomères en hélice α doivent s'associer à la surface membranaire. Une fois attachés, ces peptides vont subir des changements de conformation, les résidus hydrophobes des hélices vont

être en contact avec la partie hydrophobe de la membrane, les résidus hydrophiles des peptides constituant la lumière du pore (Yang *et al.* 2001; Yeaman *et al.* 2003).

Enfin, un recrutement progressif de peptides au niveau de la membrane permet d'agrandir la taille des pores. La translocation des phospholipides et l'agrandissement des pores entraînent le transport des peptides à l'intérieur de la membrane cytoplasmique par le biais du gradient de concentration induit par les peptides liés à la surface. Tout ceci conduit à la fuite du contenu cytoplasmique par le pore ainsi formé et à la mort de la bactérie. Ce mécanisme d'action a été très étudié pour un peptide : l'alaméthicine (Yeaman *et al.* 2003).

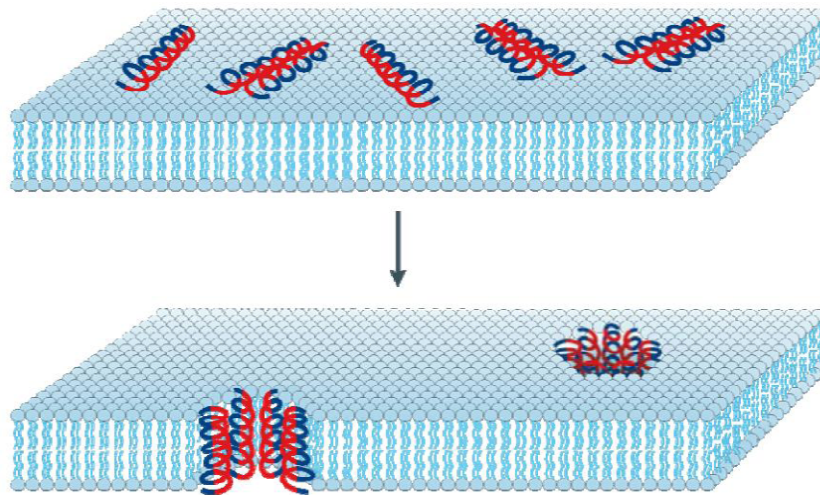


Figure 6 : Modèle en "douve de tonneaux"d'après Brodgen 2005

b- *Un second modèle : les pores toroïdaux (ou toroidal-pore)*

Encore appelé mécanisme de galerie (figure 7), ce modèle ressemble au précédent car les peptides vont également former des pores, induisant la lyse osmotique de la bactérie. La différence réside dans le fait que les lipides membranaires sont intercalés avec les peptides dans le canal transmembranaire (Yeaman *et al.* 2003; Jenssen *et al.* 2006). En effet, dans le modèle en douve de tonneaux, il n'y a pas de déformation de la double couche lipidique : les peptides s'insèrent en « forant » la membrane.

Dans le modèle des pores toroïdaux, les peptides vont rester fixés à la tête polaire de la monocouche lipidique, même une fois qu'ils sont insérés perpendiculairement dans la bicouche (Matsuzaki *et al.* 1996; Yang *et al.* 2001). Grâce à des études par RMN (résonance magnétique nucléaire), dichroïsme circulaire et d'extinction de fluorescence (fluorescence quenching), ce mécanisme a pu être décrit (Hara *et al.* 2001). Les hélices sont initialement orientées parallèlement à la surface membranaire, puis s'insèrent dans la monocouche extérieure, induisant

une distorsion de la membrane. La courbure de cette dernière permet au pore d'être bordé à la fois par la face polaire des peptides et les têtes polaires des lipides membranaires (Matsuzaki *et al.* 1996; Yang *et al.* 2001; Yeaman *et al.* 2003). Ainsi, l'invagination des lipides entraîne la jonction des deux feuillettes lipidiques, formant un trou toroïdal. Ce type de pores transmembranaires a été étudié et décrit notamment pour les magainines, les protégrines ou encore la méllitine (Matsuzaki *et al.* 1996; Yang *et al.* 2001).

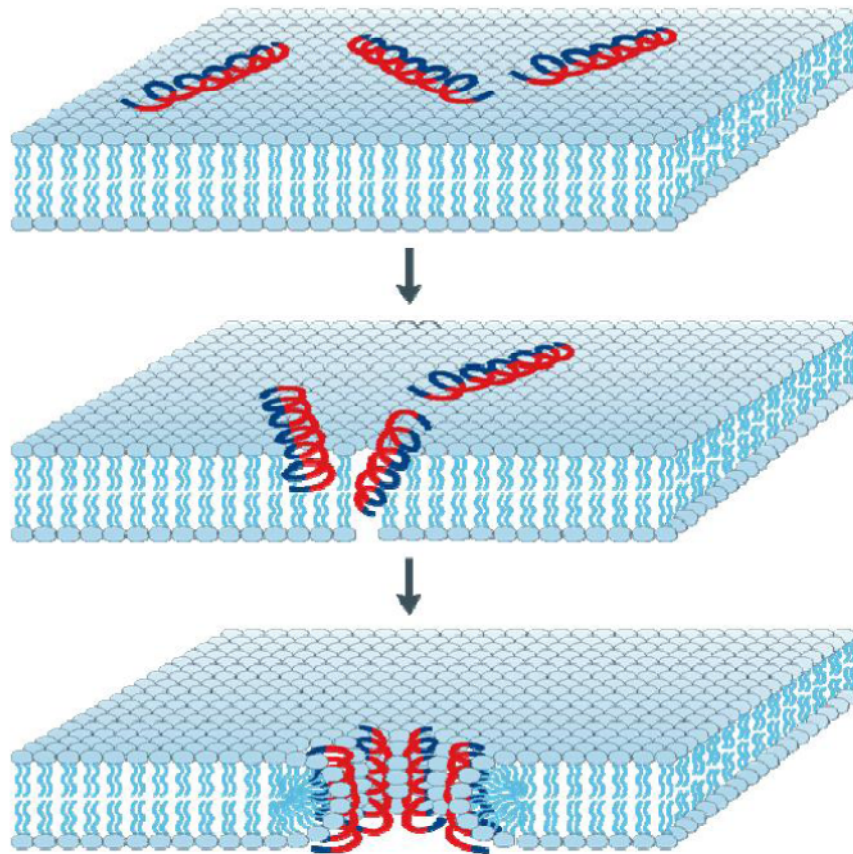


Figure 7 : Modèle des "pores toroïdaux" d'après Brodgen, 2005

c- *Le modèle « carpet » ou modèle en tapis*

Enfin, un troisième modèle (figure 8) a été décrit pour la première fois concernant le mode d'action de la dermaseptine S (Pouny *et al.* 1992; He *et al.* 1996). Dans ce modèle, les peptides sont en contact avec les têtes polaires des lipides durant tout le processus de perméabilisation, mais ne s'insèrent à aucun moment dans le coeur hydrophobe de la membrane. En effet, les peptides vont se fixer à haute concentration à la surface de la membrane par des interactions électrostatiques (Shai *et al.* 2001), et vont former un tapis fixés sur les phospholipides, les peptides s'organisent et provoquent l'effondrement de la membrane une fois la concentration seuil atteinte, créant ainsi un effet détergent, perforant la membrane, laissant ainsi le contenu cytoplasmique s'échapper (Ehrenstein *et al.* 1977).

Pour que ce mécanisme fonctionne, il est nécessaire que les peptides recouvrent toute la surface de la membrane, et qu'ils se trouvent en concentration efficace pour agir. Ce modèle diffère des deux précédents pour deux raisons. Premièrement, nous l'avons dit, les peptides ne s'insèrent pas dans la membrane lipidique comme le modèle en douve de tonneau ou encore le modèle de pores toroïdaux. Deuxièmement, il n'est pas nécessaire que les peptides adoptent une structure en hélice α dans ce mode d'action.

Ce mécanisme d'action a ensuite été décrit pour la cécropine P1 retrouvée dans l'hémolymphe du papillon de nuit (Gazit *et al.* 1995; Yeaman *et al.* 2003), mais également pour la cathélicidine humaine LL-37 (Oren *et al.* 1999).

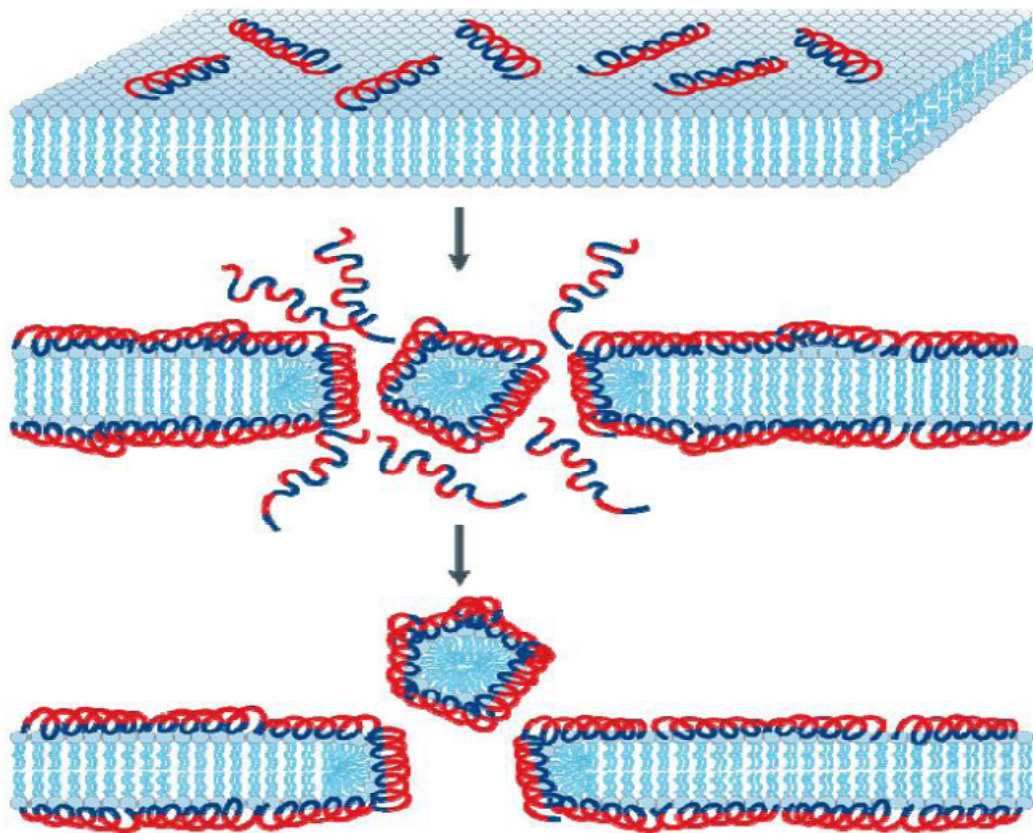


Figure 8 : Modèle en tapis d'après Brodgen, 2005

ii. Les peptides agissant au niveau intracellulaire

Les modes d'action les plus connus sont indéniablement les ruptures de membranes et la formation de pores. Toutefois, il existe d'autres mécanismes d'action, intracellulaires cette fois (figure 9). En effet, grâce à des études sur la translocation, il a été montré que des peptides riches en arginine peuvent à la fois être transportés à travers la membrane externe des bactéries à Gram négatif, mais également à travers la membrane plasmique, que ce soit pour les bactéries à Gram

négatif ou à Gram positif (Powers *et al.* 2003). Ces peptides passent donc la membrane plasmique, puis interagissent avec l'ADN, l'ARN et/ou des protéines, et peuvent inhiber différentes voies de synthèses (Powers *et al.* 2003; Jenssen *et al.* 2006. Les histatines agissent, par exemple en inhibant l'activité enzymatique indispensable à la survie de la cellule (Brogden 2005).

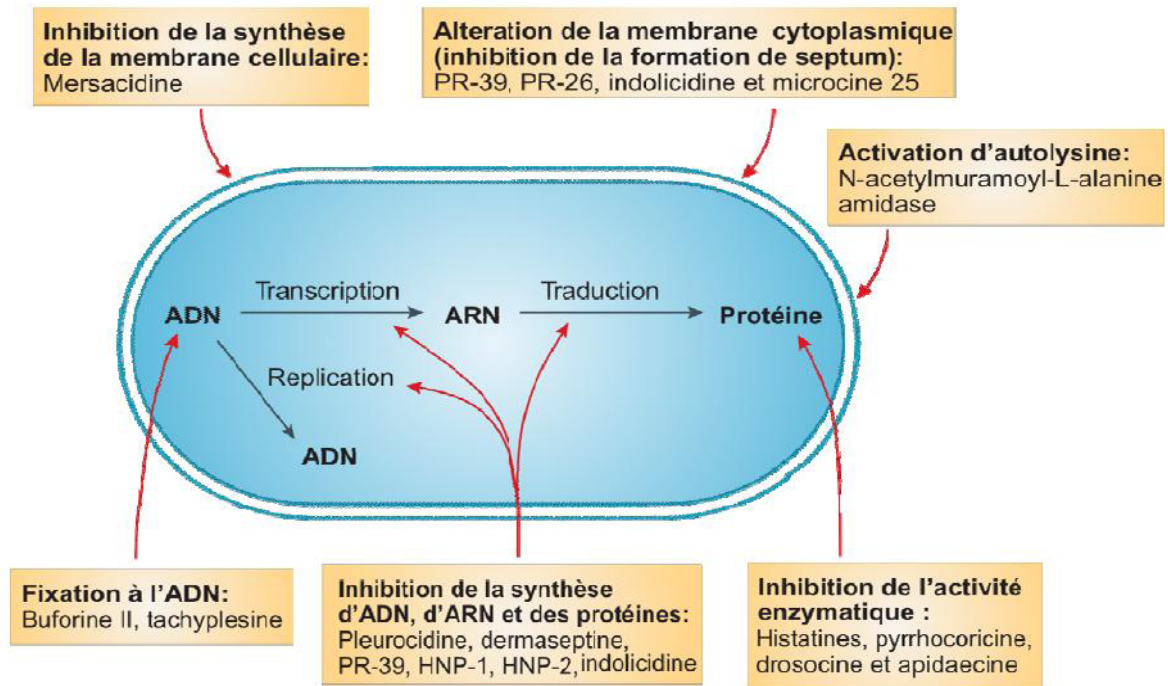


Figure 9 : Mode d'action intracellulaire des PAM d'après Brogden, 2005

d. Les mécanismes de mort cellulaire

La mort de la bactérie est causée par de multiples défauts provoqués par les peptides au niveau de la membrane. La formation de pores entraîne ainsi la fuite des ions et des métabolites, puis la dépolarisation membranaire, l'arrêt de la synthèse du peptidoglycane, et finit par entraîner la mort de la bactérie (Yeaman *et al.* 2003).

En plus des attaques membranaires, d'autres processus sont mis en jeu pour provoquer la mort de la bactérie.

i. Les dysfonctions membranaires

La membrane plasmique et la membrane externe sont responsables de nombreuses fonctions essentielles pour la vie de la bactérie, notamment la perméabilité sélective, le maintien du gradient de concentration, la synthèse du peptidoglycane et d'autres polymères. Ainsi, les

dysfonctions de la membrane externe et/ou de la membrane plasmique causés par les PAM interfèrent avec une ou plusieurs de ces fonctions, entraînant la mort directement ou indirectement (Yeaman *et al.* 2003).

Les études portant sur ces mécanismes indiquent qu'en présence de la plupart des peptides, la mort des bactéries est rapide, entre 2 et 3 minutes après un contact avec le peptide (Lehrer *et al.* 1989; Tossi *et al.* 1997). Cette mort rapide de la bactérie est attribuée à la rapide modification de la perméabilité de la membrane, à la perte en ions et en métabolites, et à l'arrêt de fonctions essentielles comme la respiration (Blondelle *et al.* 1999; Hancock *et al.* 1999). Pour les bactéries à Gram négatif, les PAM interagissent probablement indépendamment avec la membrane externe, le peptidoglycane et la membrane plasmique. Par exemple, les défensines humaines peuvent perméabiliser consécutivement les membranes externe et plasmique. L'action dans un premier temps sur la membrane externe puis dans un second temps sur la membrane plasmique entraîne la mort de la bactérie.

Chez les bactéries à Gram positif, il n'existe pas dans la littérature à notre connaissance de données expliquant le passage du PAM dans le peptidoglycane, dont le maillage est beaucoup plus épais et serré que chez les bactéries à Gram négatif, mais le résultat obtenu est le même : la mort de la bactérie.

Toutefois, il apparaît que la seule perturbation de la membrane n'est pas suffisante pour entraîner la mort de la bactérie par les PAM. En effet une étude a montré que la perméabilisation de la paroi par les PAM ne peut tuer, à elle seule les Staphylocoques (Yeaman *et al.* 2003).

L'inhibition de la synthèse du peptidoglycane et d'autres macromolécules est un important mécanisme d'action des PAM. Les précurseurs du peptidoglycane sont activés et transportés à travers la membrane plasmique. Les PAM peuvent donc perturber la synthèse du peptidoglycane mais aussi sa translocation, ou encore son organisation (création de liaisons intermoléculaires). Les bactéries à Gram positif sont donc particulièrement sensibles à ce mode d'action (Yeaman *et al.* 2003).

ii. Inhibition des fonctions intracellulaires.

De nombreux peptides n'agissent pas par perméabilisation des membranes. En effet, ces peptides subissent une translocation à l'intérieur du cytoplasme des bactéries, et s'y accumulent, induisant l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques, des protéines, et des certaines activités enzymatiques, empêchant la bactérie de produire les éléments essentiels à sa survie (Jenssen *et al.* 2006).

II. Obtention de peptides antimicrobiens par hydrolyse enzymatique de protéines

2.1. Généralités

Un ensemble de peptides antimicrobiens a été mis en évidence au sein des protéines laitières. Par exemple l'isracidine, séquence 1-23 de la caséine α 1, a un large spectre d'action *in vitro* contre les bactéries Gram+ et Gram-. Son activité antibactérienne a été confirmée *in vivo* chez la souris qui acquiert une plus grande résistance face à l'infection *Staphylococcus aureus*, *S. pyogenes* et *Listeriamonocytogenes*, et avec une efficacité tout fait comparable à celle des antibiotiques. En plus de leur action antibactérienne, d'autres peptides issus de la caséine α 2 (région 150-188) présentent une activité antifongique. Le GMP (séquence 106- 169 de la caséine κ) est capable d'inhiber l'adhésion cellulaire d'agents pathogènes tels que les streptocoques ou les actynomyces.

Ces peptides bioactifs présentent une diversité de structures et de propriétés physico-chimiques par la nature de leur séquence qui peut être hydrophobe, amphiphile, chargée, riche en hélice α ou encore porteuse de modification post-traductionnelle (phosphorylation, glycosylation). Tout ceci laisse envisager une diversité de mode d'action qui met en jeu des interactions probables avec des molécules telles les lipopolysaccharides pour les bactéries à Gram-, l'acide lipoteichoïque pour les Gram+ ou encore avec la membrane cellulaire des bactéries qui, perméabilisée par ces antimicrobiens, provoque l'efflux des composants cellulaires. Aucun phénomène de résistance n'a été reporté jusqu'à maintenant pour les peptides antimicrobiens d'origine laitière. Leur exploitation est limitée par les doses importantes nécessaires pour avoir un effet significatif et le coût prohibitif des technologies d'obtention de ces peptides purifiés.

2.2. Peptides antimicrobiens issus des protéines laitières

Il existe une variété de peptides antimicrobiens issus des protéines du lait. Jusqu'à présent, ce type de peptides a été identifié dans les caséines et certaines protéines du lactosérum, notamment la β -lactoglobuline (β -Lg), l' α -lactalbumine (α -La) et la lactoferrine (LF). Ces peptides seront décrits plus en détails dans les sections qui suivent.

2.2.1. Peptides antimicrobiens issus des caséines

Les caséines sont les protéines les plus abondantes dans le lait bovin. On y retrouve quatre fractions caséiques prédominantes : α 1 ; α 2 ; β et κ .

a- Caséine α

Les casécidines sont obtenues suite à la digestion de la caséine α_1 par la chymosine à pH neutre et font parties du groupe des glycopeptides basiques ayant un poids moléculaire relativement élevé (4-6 kDa). Les casécidines posséderaient une activité antimicrobienne contre les bactéries Gram positif et causeraient des dommages aux bactéries comme *Staphylococcus aureus*, *Sarcina ssp.*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes* (Benkerroum, 2010).

Un autre peptide antimicrobien produit par l'hydrolyse de la caséine- α_1 à l'aide de la chymosine est l'isracidine. Ce peptide cationique de 23 résidus d'acide aminé posséderait un spectre d'activité contre les bactéries Gram positif et Gram négatif. L'isracidine serait active contre des pathogènes alimentaires comme *Escherichia coli* 0157:H7, *Enterobacter sakakii* et *Staphylococcus aureus*, mais seulement à forte concentration (entre 0,1 et 1 mg/mL) (Haque et Chand, 2008).

La caséine α est également reconnue comme une source de peptides antimicrobiens tels la casocidine-I et les autres fragments peptidiques illustrés dans le tableau 01. La casocidine-I est libérée par l'hydrolyse trypsique de la caséine- α_1 . Ce peptide, composé de 39 acides aminés, inhiberait la croissance de bactéries d'altération comme *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium*, *E. coli* et *Rhodotorula rubra*. Les concentrations efficaces de ce peptide seraient entre 1 et 180 $\mu\text{g/mL}$.

b. Caséine-K

La caséine-K est un précurseur important de peptides antimicrobiens. Lors de la fabrication fromagère, l'hydrolyse de la caséine-K par la chymosine libère le segment f106-169, nommé caséinomacropeptide (CMP) ou glycomacropeptide (GMP). Ce peptide posséderait une activité antibactérienne contre la majorité des pathogènes oraux (*Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* et *Actinomyces naeslundii*) et contre *E. coli* (Dashper et al., 2007).

Le CMP est un polypeptide qui possède plusieurs variants génétiques et un taux variable de groupements glycolyses. La kappacine est la seule forme active de la molécule phosphorylée et non glycolysée du CMP. L'activité antimicrobienne du variant A de la kappacine serait supérieure à celle du variant B (Benkerroum, 2010). Cette différence d'activité s'expliquerait par la substitution du résidu Asp dans le variant A par le résidu Ala dans le variant B.

La kappacine A possède une activité antimicrobienne contre les bactéries Gram positif et Gram négatif. Sa séquence est différente de celle des peptides antimicrobiens cationiques, même si elle présente aussi la capacité de former une structure en hélice de nature amphiphile. La kappacine A est un phosphopeptide anionique contenant une forte proportion d'acides

Tableau 01 : Peptides antimicrobiens dérivés des caséines bovines libérés par les protéases digestives (Benkerroum, 2010)

Antimicrobial peptide	Source	MW (kDa)	Cleaving protease	Amino acid sequence (one letter code) ^a	Activity	Main chemical properties	Reference
Casecidins	bovine α_{S1} -casein	4 - 6	Chymosin	NA	Gram positive bacteria	Cationic glycopeptides	(Lahov <i>et al.</i> 1971) (Lahov and Regelson 1996)
Isracidin f(1-23)	bovine α_{S1} -casein	2.7	Chymosin	R ₁ PKHPKIQHGLPQEVLENENL-LRF ₂₃	Gram-positive and -negative bacteria	Cationic and hydrophobic peptide	(Hill <i>et al.</i> 1974)
Casocidin-I f(150-188)	bovine α_{S2} -casein	4.9	Trypsin ^b	K ₁₅₀ TKLTEEKRNLF ₁₈₈ KISQRYQK ^c FALPQYLK ^c VYQH ^c Q-K ₁₈₈ ^c	Gram-positive and -negative bacteria, and yeasts	Polyproline-helix like structure Cationic peptide	(Malin <i>et al.</i> 2001) (Zucht <i>et al.</i> 1995) (Forssmann <i>et al.</i> 2003)
f(181-207)	bovine α_{S2} -casein	3.3	Chymosin	KT ₁₈₁ VYQH ₁₈₈ QK ₁₉₅ AMK ₂₀₇ P- WIQPKTK-VIPYVRYL	Gram-positive and gram negative bacteria	Cationic peptide	(McCann <i>et al.</i> 2005)
f(180-207)	bovine α_{S2} -casein	3.4	Chymosin	LKT ₁₈₀ VYQH ₁₈₈ QK ₁₉₅ AMK ₂₀₇ P- WIQPKTK-KV ₁₈₀ IPYVRYL	Gram-positive and gram negative bacteria	Cationic peptide	
f(175-207)	bovine α_{S2} -casein	4.0	Chymosin	ALPQYLK ₁₇₅ TVYQH ₁₈₈ Q- KAMK ₁₉₅ PW-IQPKTK ₂₀₇ V- PYVRYL	Gram-positive and gram-negative bacteria	Cationic peptide	
f(172-207)	bovine α_{S2} -casein	4.4	Chymosin	QK ₁₇₂ FALPQYLK ₁₈₉ TVYQH ₁₉₆ Q- KAM-KPWIQPKTK ₂₀₇ V- PYVRYL	Gram-positive and gram-negative bacteria	Cationic peptide	
f(164-207)	bovine α_{S2} -casein	5.4	Chymosin	LKKISQRYQK ₁₆₄ FALP- QYLK ₁₈₁ TVYQH ₁₈₈ QK ₁₉₅ AMK ₂₀₇ P- WIQPKTKVIP-YVRYL	Gram-positive and Gram-negative bacteria	Cationic peptide	
f(165-170)	ovine α_{S2} -casein	0.7	Pepsin	LKKISQ	Mainly Gram-positive bacteria	Cationic peptide	(López-Expósito <i>et al.</i> 2006a)
f(165-181)	ovine α_{S2} -casein	2.2	Pepsin	LKKISQYYQKFAWPQYL	Gram-positive and Gram-negative bacteria	Cationic peptide	
f(184-208)	ovine α_{S2} -casein	3.0	Pepsin	VDQH ₁₈₄ QKAMK ₁₉₁ PWTQPK ₂₀₈ T- NAIPYVR-YL	Mainly Gram-positive bacteria	Cationic peptide	
f(203-208)	ovine α_{S2} -casein	0.8	Pepsin	PYVRYL	Mainly Gram-positive bacteria	Cationic peptide	
Kappacin A ⁴ f(106-169)	bovine κ casein	6.8	chymosin	A ₁₀₆ IPPKKNQDKTEIPTIN- TIASGE-PTSTPTTEA- VESTVATLEDE ^e PEVIES- PPEIN ^e TVQVTSTAV ^e ₁₆₉	Gram-positive and Gram-negative bacteria	Cationic peptide Anionic phosphopeptide	(Malkoski <i>et al.</i> 2001)
f(42-49)	bovine κ casein	1.0	Pepsin	YYQQKPVV	Gram-positive and Gram-negative bacteria	Cationic	(López-Expósito <i>et al.</i> 2006b)
f(28-30)	bovine κ casein	0.4	Pepsin	IQY	Mainly gram-negative bacteria	Neutral	
f(162-169)	bovine κ casein	0.8	Pepsin	VQVTSTAV	Mainly Gram-positive bacteria	Neutral	

aminés chargés négativement. Ses groupements phosphorylés seraient essentiels à son activité antibactérienne puisqu'ils permettraient à la molécule de changer sa conformation par le biais de répulsions électrostatiques, ou encore, par la liaison d'ions bivalents. La liaison de cations bivalents stabiliserait la structure de la kappacine ce qui faciliterait son transport jusqu'à la surface de la cellule bactérienne. Enfin, la forme phosphorylée de la kappacine lui permettrait de s'attacher aux phospholipides des membranes (Malkoski *et al.*, 2001).

2.2.2. Peptides antimicrobiens issus des protéines de lactosérum

Parmi les protéines de lactosérum, des peptides antimicrobiens ont été identifiés dans la β -lactoglobuline (β -Lg), l' α -lactalbumine (α -La) et la lactoferrine (LF). Le Tableau 1 montre la teneur de ces protéines dans le lactosérum et dans un isolât de protéine de lactosérum (IPL) ainsi que certaines de leurs caractéristiques physicochimiques. Ces trois protéines seront décrites brièvement dans les sections qui suivent, de même que les peptides antimicrobiens issus de ces dernières.

Tableau 1: Caractéristiques physicochimiques et teneur en lactoglobuline (β -Lg), α -lactalbumine (α -La) et lactoferrine (LF) dans le lactosérum et un isolât de protéine de lactosérum (Madureira *et al.*, 2010; Huffman et Harper, 1999).

Protéines	Nombre d'acides aminés	Masse moléculaire (Da)	Teneur dans le lactosérum (%)	Teneur dans un IPL*(%)
β -Lg	162	18400	52,5	74,7
α -La	123	14200	22,5	8,3
LF	700	80000	1,5	-

a. β -Lactoglobuline

La β -Lg est la plus importante des protéines dans le lactosérum des ruminants et des monogastriques. Elle est absente dans le lait des humains et des rongeurs. Il s'agit d'une protéine anionique (p_i -4,8) ayant une masse moléculaire de 18,3 kDa (Hernandez -Ledesma *et al.*, 2008). Cette protéine contient 162 résidus d'acide aminé dans une seule chaîne polypeptidique. La structure globulaire de cette protéine est remarquablement stable en milieu acide et résiste à l'hydrolyse par les enzymes protéolytiques de l'estomac (Papiz *et al.*, 1986). La structure tertiaire de la β -Lg bovine partage une forte homologie de séquence avec la protéine du plasma liant le

rétinol et les autres protéines impliquées dans le transport de petits ligands hydrophobes (Dalgarrondo *et al.*, 1990). La β -Lg est soluble dans l'eau et peut se complexer avec le rétinol (Furterman et Heller, 1972). Elle serait donc un transporteur du rétinol, un capteur d'acide gras, ainsi qu'une molécule antioxydante. Toutefois, les fonctions biologiques de la β -Lg ne sont pas encore entièrement élucidées.

La β -Lg contient des peptides ayant une activité bactéricide, lesquels sont libérés suite à l'action de la trypsine. Pellegrini *et al.* (2001) ont identifié quatre de ces fragments dont les séquences sont illustrées à la Figure 9. Ces séquences sont: VAGTWY (f15-20), AASDISLLDAQSAPLR (f25-40), IPA VFK (f78-83) et VLVLDTDYK (f92-100).

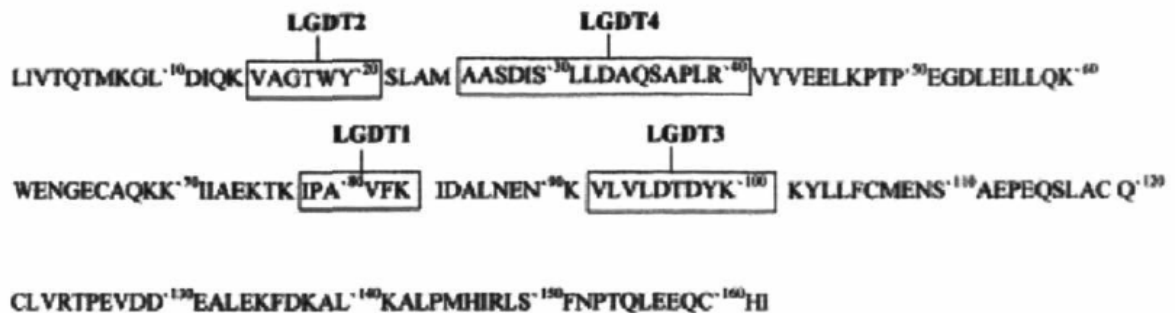


Figure 9: Séquence en acides aminés de la P-Lg et des 4 domaines antimicrobiens obtenus par digestion trypsique de la protéine (Pellegrini *et al.*, 2001).

Trois des peptides antimicrobiens identifiés dans la P-Lg, LGDT2, LGDT3 et LGDT4, sont anioniques, avec des p_i théoriques de 5,5, 4,2 et 4,2, respectivement. Ces fragments de la β -Lg chargés négativement ont une activité antibactérienne plus élevée envers les bactéries Gram positif. Cette caractéristique explique pourquoi les hydrolysats de β -Lg sont moins efficaces contre les bactéries Gram négatif dont les membranes contiennent du LPS qui est une molécule chargée négativement (Pellegrini *et al.*, 2001). Par ailleurs, le fragment LGDT1 est un peptide cationique et hydrophobe qui serait efficace uniquement envers les bactéries Gram positif. L'activité de ce peptide suggère donc que ce n'est pas seulement la charge et l'hydrophobicité qui sont importants dans l'activité bactéricide d'un peptide, mais que d'autres propriétés physicochimiques inconnues pourraient aussi être impliquées.

b. α -Lactalbumine

Parmi les protéines majeures du lactosérum, l' α -La est la plus petite des molécules avec une masse moléculaire de 14,2 kDa et un pi théorique de 4,8. Elle joue un rôle très important dans la biosynthèse du lactose par le réarrangement du complexe synthétase du lactose. Elle a la capacité de modifier la spécificité du substrat de la galactosyltransférase lors de la synthèse du lactose (Ng-Kwai-Hang, 2003). Elle est composée de 123 résidus d'acide aminé, incluant 8 résidus cystéine impliqués dans quatre ponts disulfures qui permettent de stabiliser sa structure tertiaire. Environ 40% de sa séquence est homologue à celle du lysozyme, un peptide antimicrobien retrouvé dans le blanc d'oeuf. L' α -La peut lier des cations comme le calcium, mais aussi d'autres ions comme le Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ et K^+ . Mise à part ses propriétés liantes, anticancérigènes et immunomodulantes, cette protéine présente la capacité d'interagir avec les peptides hydrophobes et les membranes lipidiques (Pellegrini, 2003).

Pellegrini *et al.* (1999) ont étudié la libération de peptides antimicrobiens à partir de l' α -La en utilisant la trypsine et la chymotrypsine. La Figure 10 illustre les fragments obtenus par l'hydrolyse trypsique et chymotrypsique de l' α -La. Dans le cas de la chymotrypsine, le fragment f61-68 S-S f75-80 (LDC) est libéré et possède la capacité d'inhiber l'activité métabolique des bactéries Gram positif comme *Bacillus subtilis*. La digestion de l' α -La par la trypsine libère deux fragments peptidiques antimicrobiens, f1-5 (LDT 1) et f17-31 S-S f109-114 (LDT 2), lesquels présenteraient des propriétés bactéricides contre les bactéries Gram positif, mais une action plus limitée contre les bactéries Gram négatif. Contrairement à la majorité des autres peptides antimicrobiens, la plupart des peptides dérivés de l' α -La sont chargés négativement. L'effet bactériostatique des hydrolysats d' α -La nécessiterait des concentrations plus élevées (25 mg/mL) que celles (10 μ g/mL) des hydrolysats de lactoferrine (Saito *et al.*, 1991). Ainsi, un hydrolysat d' α -La aurait une plus faible capacité antimicrobienne qu'un hydrolysat de lactoferrine. Enfin, l' α -La non digérée ne permettrait pas d'inhiber la croissance ou d'affecter le métabolisme des bactéries.

LDT 1	H₂N- E-Q-L-T-K-COOH	
f1-5		
LDT 2	H₂N- G-Y-G-G-V-S-L-P-E-W-V-C-T-T-F-COOH	α-chaîne
f17-31 S-S f109-114	H₂N-A-L-C-S-E-K- COOH	β-chaîne
LDC	H₂N- C-K-D-D-Q-N-P-H- COOH	α-chaîne
f61-68 S-S f75-80	H₂N- I-S-C-D-K-F- COOH	β-chaîne

Figure 10: Séquences en acides aminés des trois domaines antimicrobiens obtenus par hydrolyse trypsique (LDT1 et LDT2) et chymotrypsique (LDC) de l' α -La (Pellegrini *et al.*, 1999).

c. Lactoferrine

La lactoferrine (LF) est une glycoprotéine multifonctionnelle de 80 kDa qui est présente dans la plupart des fluides chez les mammifères. Elle est sécrétée par le facteur d'immunité inné dans les fluides comme la salive et le lait, mais on la retrouve également dans les granules des neutrophiles (Pellegrini *et al.*, 1999). Elle est donc une composante de la défense de l'hôte contre les infections microbiennes. La LF est un constituant protéique mineur du lactosérum qui joue également un rôle important dans les mécanismes de défense non spécifiques, notamment en favorisant la phagocytose par les macrophages et l'activation des cellules tueuses naturelles. Elle possède différentes activités biologiques, incluant des propriétés antimicrobienne, antivirale, antioxydante, anti-cancérogène et immunomodulante (Orsi, 2004; Wakabayashi *et al.*, 2006; Weinberg, 2007). De plus, la LF bovine est une protéine qui fixe le fer ce qui lui confère une action bactériostatique, notamment contre les bactéries ayant une exigence élevée en fer comme les coliformes et certaines espèces de *Pseudomonas*. Des études ont démontré que la LF inhibait la croissance de l'ensemble des bactéries (Gram négatif et Gram positif), des levures et des moisissures, de même que celle de plusieurs virus (VIH, herpes, hépatite C, influenza et rotavirus) (Maubois et Léonil, 1989).

Plusieurs études ont confirmé que les effets antimicrobiens (bactériostatique et bactéricide) de la LF sont associés à la région N-terminale de cette protéine. La Figure 11 illustre ce domaine, nommé la lactoferricine B (LFcine B), qui correspond aux résidus f17-41 de la protéine native. Ce peptide a un poids moléculaire de 3126 Da, lequel a été calculé à partir de sa séquence en acides aminés (Bellamy *et al.*, 1992b). Il est libéré de la LF bovine par hydrolyse enzymatique avec la pepsine, bien que la chymotrypsine permette de produire des fragments analogues. La LFcine B est le peptide laitier possédant le spectre d'action le plus large puisqu'elle

possède une action antimicrobienne (Gram positif et Gram négatif), antifongique et antivirale (Korhonen et Marnila, 2002). Les autres peptides cationiques antimicrobiens libérés de la LF par la pepsine correspondent aux fragments f277-288, f267-285 et Q67-288 (Recio et Visser, 1999). Le peptide LF f268-284, illustré à la Figure 11, est nommé la lactoferrampine (LFampine).

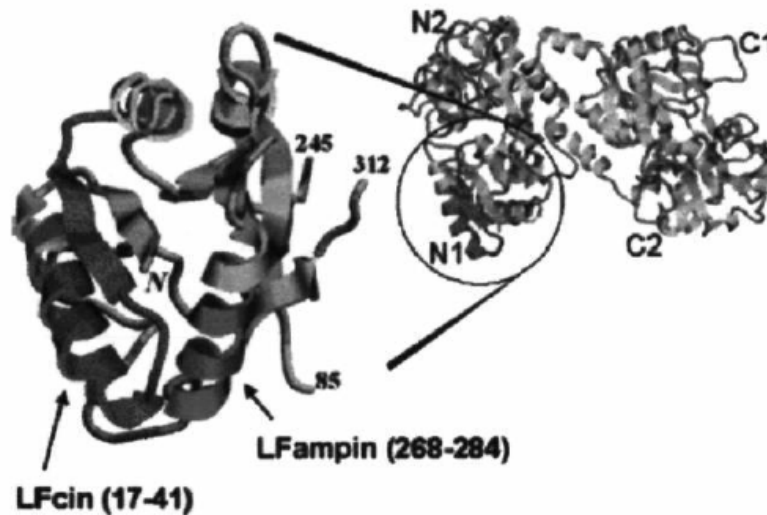


Figure 11: Illustration du domaine N1 de la lactoferrine bovine. La lactoferrampine (LFampin), correspondant aux acides aminés 268 à 284, est située à proximité de la lactoferricine (LFcin) qui comprend les acides aminés 17 à 41 dans le domaine N1 de la lactoferrine (van der Kraan *et al.*, 2004).

La LFcin et la LFampine possèdent une activité bactéricide 100 à 1000 fois supérieure à celle de la LF native (Bellamy *et al.*, 1992a). Le mécanisme d'action des peptides antimicrobiens dérivés de la LF est indépendant de sa capacité à lier le fer (Meisel, 1998). Ces peptides partagent les mêmes caractéristiques structurales que les autres peptides antimicrobiens : la présence de résidus chargés positivement et une région hydrophobe contenant souvent du tryptophane. Par ailleurs, Bellamy *et al.*, (1992a) ont démontré que la présence de LFampine à proximité de la LFcin donne deux molécules amphiphiles et cationiques dans le domaine N1 de la protéine (Fig. 11). Ce domaine permettrait ainsi à la protéine de se rendre à l'interface des membranes, puis de désorganiser leur intégrité (van der Kraan *et al.*, 2004). L'activité antimicrobienne de la LFcin et des autres fractions de la LF semble être corrélée avec la charge nette positive de ces peptides (Kang *et al.*, 1996).

2.3. Production de peptides antimicrobiens par hydrolyse enzymatique

Mise à part les bactériocines qui sont généralement obtenues par la fermentation de certaines bactéries lactiques, ou encore par l'acidification du lait suivi d'un traitement de chaleur (Tomita *et al.*, 2002), les peptides antimicrobiens contenus dans la séquence des protéines sont plutôt obtenus par hydrolyse enzymatique. Dans cette section, nous nous limiterons à décrire les enzymes et les conditions d'hydrolyse qui sont habituellement utilisées pour la production de peptides antimicrobiens à partir des protéines laitières.

2.4. Protéases digestives

2.4.1. Protéases d'origine végétale et animale

Plusieurs études ont démontré que l'hydrolyse enzymatique des protéines laitières permet d'obtenir des peptides antimicrobiens. Ces peptides peuvent être libérés par l'action de différentes enzymes protéolytiques comme la pepsine, la chymosine, la trypsine et la chymotrypsine. La pepsine est une endoprotéase digestive trouvée dans l'estomac; elle hydrolyse les liaisons peptidiques du côté C-terminal des acides aminés aromatiques Phe, Tyr et Trp et de l'acide aminé hydrophobe Leu. L'activité optimale de cette protéase est à pH acide, soit à des valeurs se situant entre 1 et 4 (Godfrey et West, 1996). La chymosine possède également une activité optimale à pH acide (3-6), mais la spécificité de cette endoprotéase se caractérise surtout par sa capacité d'hydrolyse de la liaison peptidique Phe-Met de la caséine-K du lait. Dans le cas de la trypsine et la chymotrypsine, elles sont les deux principales enzymes sécrétées par le pancréas. Ces endoprotéases hydrolysent aussi les liaisons peptidiques du côté C-terminal des acides aminés, mais leur spécificité est très différente. En effet, la trypsine agit uniquement sur les acides aminés basiques, Lys et Arg, alors que la chymotrypsine est spécifique aux acides aminés aromatiques ou ceux dont la chaîne latérale est hydrophobe tels Phe, Tyr, Trp et Leu. Ces deux protéases sont composées d'environ 230 acides aminés (~24 kDa) et leur pH d'activité optimale se situe entre 6 et 8. En raison de leurs caractéristiques physicochimiques similaires et de leur origine commune (pancréas), les préparations commerciales de trypsine et de chymotrypsine contiennent généralement des proportions variables de ces deux enzymes. Par conséquent, les peptides contenus dans les hydrolysats protéiques préparés à partir de ces préparations enzymatiques montrent, la plupart du temps, des sites de coupure associés à l'une ou l'autre de ces deux enzymes. La contamination croisée des préparations enzymatiques issues du pancréas est donc un facteur important à considérer lors de la caractérisation de la composition en peptides des hydrolysats tryptiques et chymotryptiques.

2.4.2. Protéases d'origine bactérienne (de bactéries lactiques)

La première étape de l'utilisation de la caséine par LAB est effectuée par la protéase de l'enveloppe cellulaire (CEP). Cinq types de ces enzymes différentes ont été clonés et caractérisés de LAB (fig. 12), y compris PrtP de *L. lactis* et *Lactobacillus paracasei*, PRTH de *L. helveticus*, PrtR de *Lactobacillus rhamnosus*, PrtS de *S. thermophilus* et de *L. bulgaricus* PRTB (Kok *et al.* 1988; Holck et Naes 1992; Gilbert *et al* 1996;. Pederson *et al* 1999;. Siezen 1999; Fernandez-Espla *et al* 2000; pastar *et al* 2003). Dans lactocoques, PrtP gènes peuvent être soit plasmidique ou génomique, alors que CEP caractérisés de lactobacilles sont génomique. LAB possède généralement un seul CEP mais la présence de deux CEP a été signalé dans des souches de *L. helveticus* et *L. bulgaricus* (Stefanitsi *et al* 1995. ; Pederson *et al* 1999).

CEP ont une forte préférence pour les caséines hydrophobes, les protéines les plus abondantes dans le lait (Swaisgood 1982). Caséines sont divisés en α_{s1-} , α_{s2-} , $\beta-$, et κ caséines; chacune contient un grand nombre de résidus de proline que les deux empêchent la formation de α et β hélices de feuilles et favorise la formation de bobines aléatoires. PrtPs Lactococcus sont divisés en type PIII et PI et des enzymes, qui se distinguent par leur spécificité de substrat pour α_{s1-} , $\beta-$, et κ -caséine (Kunji *et al.*, 1996). Le type PI dégrade principalement β -caséine qui est clivée en plus 100 oligopeptides différents allant de 4 à 30 amino résidus acides (Juillard *et al.*, 1995). κ -caséine est clivé à un moindre degré par l'enzyme de type PI, alors que le type PIII est capable de cliver α_{s1-} , $\beta-$, et κ -caséine de manière identique (Pritchard et Coolbear 1993). PrtP de *L. lactis* a été également démontré à agir comme autolysine (Buist *et al.*, 1998), qui est nécessaire pour la séparation cellulaire et l'autolyse pendant la phase stationnaire de croissance. Le taux et le degré d'autolyse a été constaté dépend de la spécificité, l'emplacement et la quantité de la PrtP. Pour *Lactobacillus*, CEP PI, PIII, l'intermédiaire PI / PIII type, et quelques spécificités de substrat de type roman ont été signalés, alors que un CEP (PRT) présentant la intermédiaire PI / PIII type spécificité a été purifié à partir de *S. thermophilus* (Fernandez-Espla *et al.*, 2000).

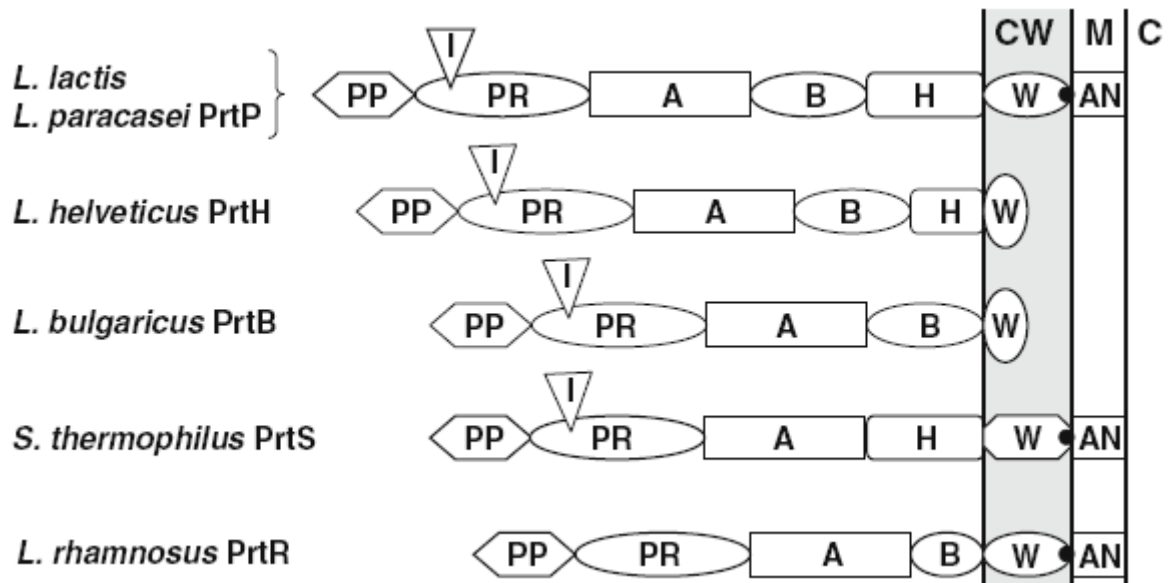


Figure 12 : Représentation schématique du CEP de différentes souches de LAB (modèle conformément à Siezen 1999). La paroi cellulaire CW, M membrane, C cytoplasme, PP prépro domaine, PR région catalytique, I région d'insertion, A région A, B région B, H région de l'hélice, W région de séparation entre cellule et paroi, point noir signal de triage, AN région d'ancrage.

2.4. Conditions d'hydrolyse pour la production de peptides antimicrobiens

L'efficacité d'une réaction d'hydrolyse enzymatique et les propriétés finales d'un hydrolysats protéique reposent sur de nombreux facteurs dont la nature du substrat protéique, la spécificité de l'enzyme utilisée, les conditions du milieu réactionnel (pH, température, force ionique, ratio enzyme/substrat) et la durée de la réaction (Arnolds et al., 1998). Généralement, la spécificité de l'enzyme est la principale propriété permettant d'exercer un certain contrôle sur le profil des peptides libérés. De plus, l'enzyme représente la composante la plus coûteuse lors de la préparation d'hydrolysats protéiques. Par conséquent, les conditions d'hydrolyse sont généralement ajustées de manière à optimiser l'activité de l'enzyme et éviter sa dénaturation lors de la réaction d'hydrolyse.

Les conditions les plus critiques pour maximiser l'activité d'une enzyme sont le pH et la température réactionnelle qui sont, la plupart du temps, ajustés aux valeurs optimales connues des enzymes. Dans le cas des protéases digestives citées précédemment, leur température optimale se situe à 37°C puisqu'elles sont toutes présentes dans l'organisme. L'optimum de température de ces enzymes est aussi relativement étroit, i.e. qu'elles supportent mal les écarts de température. En outre, elles sont rapidement inactivées à partir de 45°C et sont complètement dénaturées par un traitement d'environ 10 min à 75°C. Bien que les températures froides ne mènent pas à leur dénaturation, leur activité est fortement réduite à des températures inférieures à

30°C. Dans le cas de la force ionique du milieu réactionnel, elle doit demeurer faible et proche de celle du milieu cellulaire. Les enzymes étant des protéines, elles peuvent donc s'agréger et/ou précipiter à forces ioniques élevées (salting out). D'autre part, certaines enzymes nécessitent l'ajout d'ions spécifiques dans le milieu réactionnel comme le calcium dans le cas de la trypsine et la chymotrypsine. Pour ces protéases, le calcium n'est pas vraiment un activateur, mais il permet de stabiliser la structure tridimensionnelle des enzymes et indirectement, de maintenir leur activité protéolytique. Enfin, le ratio enzyme:substrat (E:S) et la durée de la réaction d'hydrolyse sont deux paramètres inter-reliés, dont l'ajustement dépendra surtout du coût de l'enzyme et des manipulations à réaliser en cours de réaction. En fait, la cinétique d'hydrolyse étant proportionnelle à la quantité d'enzyme dans le milieu réactionnel, il est souvent préférable de prolonger la durée d'hydrolyse en ajoutant des quantités plus faibles d'enzyme; ceci permet non seulement de réduire les coûts, mais facilite aussi le contrôle de la cinétique d'hydrolyse tout en permettant la prise d'échantillon en début de réaction. Par contre, la durée d'hydrolyse ne doit pas être trop longue pour éviter les contaminations microbiennes dans le milieu.

Les conditions d'hydrolyse utilisées pour la production de peptides antimicrobiens à partir des protéines laitières peuvent donc varier de façon importante. Un aperçu des conditions déjà utilisées pour la production de ce type de peptides est présenté dans le tableau 02.

Tableau 2: Conditions d'hydrolyse pour la production de peptides antimicrobiens à partir des protéines laitières.

Enzyme	Protéine	pH	T(°C)	Ratio E/S	Référence
Chymosine	Caséine	6,4	30	0,0006%	Lahov et Regelson, 1996
Pepsine	Lactoferrine	3	37	3%	Recio et Visser, 1999
		3	37	3%	Tomita et al., 1991
		2.5	37	3%	Bellamy et al., 1992b
		2.5	37	3%	Enrique et al., 2009
	β -lactoglobuline	2,0	37	1:200	Pihlanto-Leppalà et al., 1999
	α -lactalbume	2,0	37	1:200	Pihlanto-Leppalà et al., 1999
Trypsine	β -lactoglobuline	7,8	37	1:10	Pellegrini et al., 2001
	β -lactoglobuline	8,0	37	1:200	Pihlanto-Leppala et al., 1999
		7,8	37	1:10	Pellegrini et al., 1999

MATERIELS ET METHODES

II- Matériels et méthodes

1. Matériel biologique

1.1. Le lait

1.1.1. Origine

Les exploitations sélectionnées sont localisées dans les trois étages bioclimatiques du bassin laitier, les populations animales sont retenues après confirmation de leur état de santé. Elles sont constituées de la population ovine Arabya qui tire son origine d'Ouled Djellal, de la population caprine Amazigh ou Kabyle et enfin de la population bovine.

1.1.2. Prélèvement et contrôle

Les échantillons de laits ont été aseptiquement prélevés. La traite est réalisée après lavage soigné des mains et aseptisation. La fréquence et les lieux de prélèvement sont indiqués dans le tableau 03. Le lait a été recueilli dans un flacon en verre de 250 ml stérile après avoir éliminé la première dizaine de jets, conservé à 4 °C et acheminé directement au laboratoire pour analyse. Les laits prélevés correspondent aux laits d'une seule traite, celle du matin. Les échantillons ont été soigneusement étiquetés (population, lieu, date de prélèvement, état physiologique de l'animal, période de traite, saison...).

1.1.3. Technique de prélèvement

Les échantillons de lait ont été aseptiquement prélevés. Pour ce faire, le pis et la mamelle de l'animale ont été nettoyés à l'eau savonneuse, rincées à l'eau distillée stérile et essuyés à l'aide d'une serviette de papier stérile. La traite est réalisée après un lavage soigné et aseptisation des mains. Le lait a été recueilli dans des flacons stériles de 250 ml soigneusement étiquetés, après avoir éliminé les premiers jets, et immédiatement conservé à 4°C et analysés dans la journée. Les laits prélevés correspondent aux laits d'une seule traite, celle du matin. Les laits contaminés ou mammités ont été écartés. Seuls les laits sains sont retenus pour la recherche des lactocoques.

1.2. Souches de lactocoques

Les souches présumées lactocoques ont été isolées à partir des laits de vache, de chèvre et de brebis de différentes fermes du périmètre du moyen Chélif en différentes saisons de

l'année (hiver, printemps et été) de l'année 2006. Elles ont été cultivées sur milieux sélectifs et conservées en vue d'être étudiées.

1.2.1. Origine des souches

Les souches ont été isolées à partir des laits de vache, chèvre et brebis de différentes fermes du périmètre du moyen Chélif durant les saisons de l'hiver, printemps et été de l'année 2006. Le tableau 01 présente les principaux sites de prélèvement ainsi que le nombre d'échantillons de laits collectés.

Tableau 01 : Lieu, origine animale et nombre de prélèvement du lait cru.

	Lieu	Origine animale	Nombre de prélèvement
Périmètre du moyen Chélif	Oued Fodda	Vache + Brebis	4
	El-Karimia	Vache + Brebis	3
	Bir Saf-Saf	Vache + Brebis	4
	Oum Drou	Vache	3
	Ouled Abbes	Vache +Brebis + Chèvre	4
	Chlef centre	Vache	3
	Chettia	Vache +Chèvre	3
	Ouled fares	Vache +Chèvre+ Brebis	4
	Boukadir	Vache+ Chèvre+ Brebis	4
	Oued -Sly	Vache	4
	Medjadja	Vache +Chèvre+ Brebis	5

1.2.2. Choix des laits

Les laits sont choisis selon leur état sanitaire et hygiénique. Les prélèvements sont faits à partir d'animaux sains et ne présentant pas de signes de mammites. Les éventuelles mammites subcliniques au niveau des quartiers des trayons et/ou de mamelles sont détectées par le papier test mammite. Le virage du papier du jaune au bleu au contact du lait est un indice de mammite et l'échantillon est écarté. Le contrôle microbiologique au laboratoire concerne la recherche et le dénombrement des coliformes fécaux et des staphylocoques à coagulase positif.

1.2.3. Prélèvement et conditionnement

Les échantillons des laits sont collectés chacun dans des flacons stériles en verre de 250 ml de capacité et remplis à 220 ml juste à la sortie de la mamelle. Rapidement conditionnés à 4°C, et acheminés vers le laboratoire. Les laits sains sont la source d'isolements sélectifs des lactocoques et subissent parallèlement une caractérisation physicochimique et biochimique.

1.3. Isolement et purification des lactocoques

1.3.1. Techniques d'isolement

L'isolement a été effectué à partir des échantillons le jour même de leur réception. Une série de dilutions décimales jusqu'à 10^{-5} dans l'eau physiologique stérile a été réalisée à partir de l'échantillon homogénéisé par agitation. Les trois dernières dilutions ont été ensemencées en masse dans la gélose M17 en boîtes de Pétri. Les boîtes sont incubées couvercles en bas à 30°C pendant 24 à 48 h.

1.3.2. Techniques de purification

La purification consiste à effectuer des repiquages successifs sur les bouillons M17, MRS et Elliker jusqu'à l'obtention de colonies pures bien distinctes. La purification des souches sur milieu gélosé se fait par la méthode des stries. La pureté des souches est confirmée par prélèvement de colonies représentatives du genre *Lactococcus*, par observation microscopique après coloration de Gram et le test de la catalase à chaque repiquage. Seules les bactéries Gram positif et catalase négative et de forme cocci sont retenues et conservées pour une identification ultérieure.

1.3.3. Conservation des souches

Les cultures pures sont stockées à 4°C pour l'usage de routine dans les milieux gélosés M17, MRS et Elliker (en boîte de Pétri et en tube), à -20°C comme stock de deuxième utilisation et à -80°C comme stock stratégique. Dans ce cas le culot d'une culture de 24 heures (dans les différents bouillons en tube) est centrifugé à 6000 trs.mn/15mn/4°C le culot dans des tubes Eppendorf est additionné d'un bouillon de culture neuf glycérolé à la concentration de 15% v/v (autoclavé à 121°C/20mn).

1.3.4. Identification des isolats

Une batterie de tests portant sur les caractéristiques culturelles, morphologiques et biochimiques sur les cultures pures a été conduite en vue de leur l'identification.

1.4. Etude des caractères cultureux et morphologique

Les colonies des cultures pures sur milieu gélosé sont examinées selon leur caractéristiques relatives à leur taille, contour, forme, couleur, aspect (brillant, mat, muqueux) ainsi que leur consistance. Cet examen peut être effectué à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire. Par examen microscopique en immersion d'un frottis on distingue la morphologie, la taille et l'arrangement des cellules. La coloration différentielle de Gram permet une distinction, selon la coloration finale des cellules, les Gram positifs (de coloration violette) sont retenus pour la suite des investigations.

1.5. Etude des caractères physiologiques et biochimiques

1.5.1. Caractères physiologiques.

- Type respiratoire

Le comportement vis à vis de l'oxygène a été étudié par ensemencement d'une gélose profonde VF (viande-foie) répartie en tubes en culot de 10 à 15cm. L'ensemencement est effectué par pique centrale à l'aide d'une pipette Pasteur jusqu'au fond du tube et que l'on remonte ensuite en décrivant une spirale de façon à répartir uniformément la suspension sur toute la hauteur du culot. Les tubes sont incubés 24 à 48 heures à 30°C.

- Température de croissance

La croissance à 10°C et à 45°C est déterminée en ensemençant des tubes de bouillons de cultures ou lait écrémé stérile. Les tubes incubés à 45 °C sont examinés après 24 à 48 heures, alors que ceux incubés à 10°C sont examinés après 7 à 10 jours. L'apparition d'un trouble est synonyme de croissance.

- Croissance en conditions hostiles

- Halophilie

Pour étudier l'halophilie des lactocoques, on cultive les souches pures sur milieu hypertonique (bouillon additionné de NaCl à 2,4 et 6,5 %). L'incubation est réalisée durant une période de 24 à 48 heures à 30°C. La croissance est appréciée par l'apparition de troubles.

- *Croissance à pH 9,6*

Le bouillon réparti en tubes et ajusté à pH 9,6 par ajout de NaOH 1N stérile est inoculé par des souches pures ensuite incubés à 30°C pendant 24 à 48 heures. La mise en évidence de la croissance est traduite par le développement d'un trouble.

- *Croissance en présence de la bile*

La tolérance aux sels biliaires des lactocoques a été étudiée par ensemencement par une suspension jeune de souches isolées d'une série de tubes de bouillon M17 additionnés de 0,3 % de bile. Après 24 heures d'incubation à 30°C, la croissance de ces souches est appréciée par la détermination de la densité optique à 620 nm (Tanaka et *al.*, 1999).

- *Thermorésistance*

Les bouillons en tubes sont inoculés par des cultures jeunes de souches pures puis chauffés à 60°C pendant 30 minutes. Après rapide refroidissement, ils sont incubés 24 à 48 heures à 30°C. Les souches mésophiles sont incapables de se développer dans ces conditions.

- *Croissance sur lait bleu de Sherman*

L'activité réductasique du bleu de méthylène est une caractéristique des espèces lactiques mésophiles. Du lait écrémé stérile à 1 % (p/v) de bleu de méthylène est ensemencé et incubé 24 à 48 heures à 30°C. Le test est positif s'il y a décoloration du lait.

- *Tolérance au tellurite*

La tolérance au tellurite est recherchée par ensemencement du milieu gélosé contenant 0,4 % de tellurite de potassium. Les cocci résistants donnent des colonies noires ; ceux qui poussent mal donnent de petites colonies grises après une période d'incubation de 24 à 48 heures à 30°C.

1.5.2. Caractères biochimiques

- *Mise en évidence des enzymes de respiration catalase et oxydase*

La présence de la catalase consiste à déposer une goutte d'H₂O₂, dilué au 1/dixième, sur une lame de verre et à l'aide d'une pipette Pasteur une colonie jeune est prélevée ensuite délayée dans la goutte. Un dégagement gazeux (O₂) indique la présence de la catalase. La présence d'oxydase est mise en évidence par la technique de Kovacs. Un disque « OX » est placé sur une lame et imbibé d'une goutte d'eau distillée stérile puis un fragment d'une

colonie jeune est déposé à la surface. Une coloration rose apparaît en quelques minutes signe d'une réaction positive.

- *Culture sur lait tournesolé*

Ce test a pour objectif de mettre en évidence la présence de la réductase. Un ensemencement à 1 % dans un lait écrémé à partir d'une culture jeune sur bouillon. L'activité au cours de culture à 30°C est notée. Le tournesol est un indicateur du potentiel d'oxydoréduction et de pH. Un virage du mauve au rose indique une acidification (A) due à l'attaque du lactose, une décoloration de l'indicateur depuis le fond du tube traduit une réduction (R), la souche peut ensuite coaguler le lait (C). Les lactocoques réduisent le tournesol avant de coaguler le lait..

- *Caractère hémolytique*

Le caractère hémolytique est étudié par culture sur gélose au sang. Une base gélosée est fondue, ramenée à 45°C, additionnée de 5 % de sang défibriné de cheval et coulée en boîtes de pétri. Le milieu est ensemencé par les souches isolées par stries, après incubation et culture, l'aspect de la gélose autour des colonies est examiné :

- Zone verdâtre : hémolyse α
- Auréole claire : hémolyse β
- Pas de modification : pas d'hémolyse ou hémolyse γ

- *Recherche de la citratase*

Elle est mise en évidence par culture sur gélose semi-solide au lait écrémé citraté. La gélose est ensemencée dans la masse et incubée à 30°C pendant 2 à 7 jours. La fermentation se traduit par la production de gaz. Cette enzyme n'est présente que chez *Lactococcus lactis subsp lactis* biovar *diacetylactis*. Elle conduit à la formation d'acétoïne.

- *Hydrolyse de l'amidon*

Elle est testée par une culture sur milieu gélosé additionné de 0,3 % d'amidon soluble de pomme de terre en boîtes de Pétri. Après incubation 24 à 72 heures à 30°C, l'hydrolyse est caractérisée par pulvérisation d'une solution iodo-iodurée à la surface de la boîte. Les zones claires autour des colonies traduisent une activité amylolytique.

1.5.3. Caractérisation du métabolisme carboné

- Recherche du type fermentaire

Le test de Gibson et Abd El Malek permet d'apprécier le type de métabolisme par lequel le substrat carboné est utilisé. Il est homofermentaire si l'acide lactique est le seul produit formé et hétérofermentaire si d'autres composés sont aussi présents tel que l'acide acétique, l'éthanol et le CO₂. Les tubes sont incubés à 30°C pendant 24 à 48 heures.

- Fermentation des sucres

L'eau peptonée en tubes contenant du pourpre de Bromocrésol BCP comme indicateur de pH sont additionnés de sucres à la concentration finale de 0,5% sontensemencés par une culture jeune. Après 24 à 48 heures d'incubation à 30°C, le développement de la culture se traduit par le virage de l'indicateur coloré dû à l'acidification. Les sucres suivants sont testés : maltose, tréhalose, Mélibiose, raffinose, inuline, sorbitol, arabinose, mannitol, lactose, xylose, Inositol, cellobiose, rhamnose, ribose et galactose.

1.5.4. Etude du métabolisme azoté

L'activité de l'arginine dihydrolase (ADH) est mise en évidence par la méthode classique sur bouillon de Moeller en tube. Chaque tube estensemencé par 3 ou 4 gouttes d'une suspension dense d'une culture jeune. Après incubation 24 à 48 heures à 30°C,

1.6. Recherche et sélection de souches protéolytiques

1.6.1. Détection de l'activité protéolytique sur milieu solide

L'activité protéolytique est mise en évidence sur milieu gélose au lait à 5 % (v/v) (Gordon et al., 1973). Une culture jeune de chaque souche a étéensemencée en surface et incubée 24 à 48 h à 37°C. L'activité protéolytique se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des colonies.

1.6.2. Mesure de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique a été déterminée selon la méthode décrite par Beynon (1989) en utilisant l'azocaséine (sigma) comme substrat chromogène.

1.6.3. Détermination du pouvoir protéolytique

L'azocaseine est une caséine couplée à un chromogène lorsqu'une enzyme active hydrolyse l'azocaseine celle-ci libère le chromogène que l'on récupère en faisant précipiter les caséines en acidifiant le milieu avec une solution de Trichloracétique (TCA) à 10%, après centrifugation le chromogène se trouve dans le surnageant que l'on détecte par spectrophotomètre en lisant l'absorbance à 440 nm.

0.15 ml de l'enzyme purifiée est mélangé avec 0.25 ml d'une solution de l'azocaseine à 2% préparée dans le tampon phosphate à 100mM et un pH 7, puis incubé à 55°C pendant 1h. Ensuite la réaction est arrêtée par l'ajout de 1.2 ml TCA à 10% et laisser reposer pendant 15min à température ambiante puis centrifuger à 8000 rpm/min pendant 15 min. Prélever 1.2 ml du surnageant est additionné à 1.4 ml de NaOH 1M. La lecture au spectrophotomètre est réalisée à 440 nm. Une unité de l'activité protéolytique est définie comme étant la quantité de protéase qui permet d'augmenté 0.01 l'absorbance par heure à 440 nm.

1.6.4. Identification génotypique de la souche productrice

La souche à haut pouvoir protéolytique a été sélectionnée pour une identification génotypique.

1.6.5. Détermination des conditions optimales pour l'extraction de l'enzyme

A fin de déterminer les conditions optimales pour la production de la protéase à partir de la souche à haut pouvoir protéolytique, une cinétique de production de la protéase a été conduite comme suit :

Dans des flacons stériles contenant 500 ml de lait commercial stérilisé et écrémé (UHT) ont été inoculé avec une pré-culture d'une nuit de la souche productrice (à 5% v/v) puis incubé à 37°C pendant 48h sous agitation à 150 rpm. La production de l'enzyme a été suivie par le dosage de l'activité protéolytique, la détermination de la biomasse ainsi que la mesure du pH. Périodiquement, chaque 3 heures, un volume de 10 ml du milieu de culture est collecté aseptiquement à l'intérieur de la haute à flux laminaire, ensuite centrifugé à 10⁴ rpm à 4°C pendant 15 min pour éliminer les particules insolubles.

1.7. Purification de la protéase

Un volume de 1 L du lait commercial UHT a été inoculé par une pré-culture d'une nuit de la souche productrice (à 5% v/v) ensuite incubé dans les conditions optimales à 37°C pendant 48 h. Le surnageant de culture qui représente l'extrait enzymatique brut a été

centrifugé 10^4 rpm/4°C/ 15 min ensuite filtré à travers des filtres de 45µm afin d'éliminer les particules insolubles et les débris cellulaires. Environ 900 ml de l'extrait enzymatique brut récupéré et constitue le volume de purification de la protéase.

la détermination du rendement d'extraction et la vérification de la pureté de l'enzyme ont effectués après chaque étape de purification, par la détermination des paramètres suivants :

- Le dosage de l'activité protéolytique ;
- La détermination de la concentration en protéines ;
- La détermination du profil protéique par SDS-PAGE et zymographie ;

1.7.1. Ultrafiltration

900 ml de l'extrait enzymatique brut a été concentrée en premier lieu par ultrafiltration dans un tampon de Tris-HCl 50mM à pH 7 à travers une membrane de 10 Kda seuil de coupure (Sartorius vivacell 250, 10000 MWCO). 50 ml de l'extrait enzymatique ultrafiltré a été récupéré.

1.7.2. Chromatographie par échange ionique sur SP-Sepharose

La fraction contenant la protéase issue de l'ultrafiltration (50 ml) a été percolée à travers une colonne SP-Sepharose (2.6 cm × 15 cm) (GE Healthcare Bio-Sciences AB) préalablement équilibrée avec 50mM du tampon Tris-HCl à pH 8. Les protéines adsorbées sont éluées avec un gradient linéaire de NaCl entre 0 à 1M dans le même tampon. Des fractions de 4 ml ont été collectées avec un débit de 2 ml/min. Les fraction actives ont été rassemblées et ensuite concentrés par ultrafiltration avec une membrane de 10 KDa.

1.7.3. Gel filtration sur Sephadex G-50

La dernière étape de purification a été effectuée sur une colonne de Sephadex G-50 (1.2 cm x 120 cm) (Pharmacia-Amersham, Uppsala, Sweden) préalablement équilibrée avec du tampon du Tris-HCl à 50 mM, pH 7 contenant du NaCl à 0.15M. La fraction concentré a été percolée à travers la colonne et éluée avec un débit de 0.5 ml/ min. Les fractions actives de 4 ml ont été rassemblées et ensuite concentrés par ultrafiltration avec une membrane de 10 KDa.

1.7.4. Électrophorèse sur gel polyacrylamide et Zymographie

Une électrophorèse sur gel Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide (SDS-PAGE) a été utilisée pour la détermination de la pureté et le poids moléculaire de la protéase purifiée selon la méthode décrite par Laemmli (1970), en utilisant deux gels, un gel de concentration à 5 % (w/v) et un gel de séparation à 15% (w/v). Les échantillons sont préparés en mélangeant l'enzyme purifiée avec 2.5% SDS, 10% glycérol, 5% β -mercaptoéthanol et 0.002% du bleu de bromophénol et sont ensuite chauffés à 95°C pendant 5min. L'électrophorèse (Bio-Rad Mini-Protean Tetra system) se déroule dans une solution de tampon d'électrophorèse composé de Glycine 14,25g, Tris 3g, SDS 1g, qsp H₂O MilliQ 1L.

Après migration, les gels sont placés sous agitation dans une solution de coloration au Bleu de Coomassie R250, (Bleu de Coomassie 0,25% (p/v) dans un mélange méthanol/acide acétique/eau en proportions 5/1/4 (v/v/v)) pendant une nuit. Les gels sont ensuite mis dans une solution de décoloration ayant la même constitution sauf le Bleu de Coomassie. Le poids moléculaire de la protéase est estimé à l'aide d'un marqueur de taille spécifique (fermentas PageRuler, prestained Protein Ladder).

L'électrophorèse en conditions non dénaturantes (zymographie) a été conduite de la même manière que la méthode décrite par Laemmli (1970) à l'exception que l'échantillon ne subi aucun traitement de dénaturation par chauffage et par l'ajout SDS et l'agent réducteur.

La zymographie est une méthode rapide et sensible qui permet de détecter l'activité protéasique. Brièvement, après l'électrophorèse dans les conditions non dénaturantes, le gel est immergé dans 1% de caséine dans du tampon 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, et incubé à 37° C pendant 90 min. Après le lavage, le gel a été coloré avec du bleu de Coomassie brillant R-250. Une zone claire sur le fond bleu indique la présence de la protéase.

1.7.5. Détermination de la concentration en protéines

La concentration en protéine a été déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) en utilisant le réactif de dosage Bio-Rad (Bio-Rad, Munich, Allemagne) et de sérum albumine bovin (BSA) comme étalon. Au cours de la purification, la concentration en protéine a été déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm.

1.7.6. Détermination du poids moléculaire

Pour déterminer la masse moléculaire de l'enzyme native, la protéase purifiée a été déposée sur la colonne d'exclusion de taille de Sephacryl G-100 (1,6 x 60 cm) équilibrée dans du tampon Tris-HCl 50 (pH 7,0). L'élution a été réalisée avec un tampon à même de 0,6 mL / min. Le poids moléculaire de l'enzyme a été estimé en utilisant un kit de calibrage de faible poids moléculaire (Sigma). Les marqueurs de masse moléculaire utilisés sont les suivants: albumine de sérum bovin (67 000 Da); l'ovalbumine (43 000 Da); ribonucléase (25000 Da) et chymotrypsinogène A (13 700 Da). Le poids moléculaire apparent de l'enzyme a été calculé par comparaison avec les volumes d'élution relatifs des étalons protéiques.

1.7.7. La caractérisation biochimique de la protéase purifiée

b. Effet du pH sur l'activité et la stabilité de l'enzyme

Le pH optimal de l'enzyme purifiée a été étudié sur une plage de pH de 3,0 à 11,0. Pour l'étude de la stabilité du pH, l'enzyme a été incubée pendant 1 h à 55 ° C dans différents tampons et l'activité protéolytique résiduelle a été déterminée dans des conditions d'essai normalisées. Les systèmes tampons suivants ont été utilisés: 100 mM de tampon glycine-HCl, pH 3; 100 mM de tampon d'acétate de sodium, pH 4,0 à 6,0; 100 mM de tampon phosphate, pH 7,0; Tampon 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM de glycine-NaOH, pH 9,0 à 11,0.

b. Effet de la température sur l'activité et la stabilité de l'enzyme

Pour étudier l'effet de la température, l'activité de la protéase a été testée à différentes températures allant de 20 à 70°C pendant 60 min à pH 7. Pour la stabilité thermique, l'enzyme a été incubée à différentes températures pendant 60 min et on le refroidit immédiatement dans l'eau glacée. Par la suite, l'activité résiduelle a été déterminée à pH 7 et 55°C pendant 60 min. L'enzyme non-chauffé a été considéré que la commande (100%).

e. Effets des inhibiteurs de l'enzyme

Les effets des inhibiteurs de l'enzyme sur l'activité de la protéase ont été étudiés en utilisant du fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF), l'aprotinine, phénanthroline, la pepstatine A, iodoacetamid, β -mercaptoéthanol et de l'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA). L'enzyme purifiée a été pré-incubée avec les inhibiteurs pendant 30 min à 25°C, puis l'activité enzymatique résiduelle a été estimée en utilisant l'azocaséine comme substrat dans les conditions optimales (pH 7,0 à 55°C). L'activité de l'enzyme testée en l'absence d'inhibiteurs a été prise à 100%.

f. Effet des ions métalliques

Les effets de divers ions métalliques (5 mM) sur l'activité enzymatique ont été étudiés par adjonction monovalents (Na^+ et K^+) et des ions de métaux di-trivalents (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} ou Al^{3+}) au mélange réactionnel. L'activité de l'enzyme sans ions métalliques a été considérée comme un contrôle à 100%.

1.8. Hydrolyse enzymatique de la caséine bovine

Afin de déterminer les meilleures conditions permettant l'obtention des peptides antimicrobiens par hydrolyse de caséine, l'hydrolyse a été menée sur une solution de caséine bovine à 5% (p/v) dans un tampon de 100 mM Tris-HCl à pH7 et maintenue à 55°C. Des prélèvements d'une partie aliquote d'hydrolysats sont effectués à des temps réguliers et l'activité antimicrobienne est recherchée.

Le rapport enzyme sur substrat (E/S) maintenu pour la cinétique d'hydrolyse enzymatique est déterminé en appliquant différents rapports (E/S) (1/5, p/p). Les hydrolysats de 20 heures obtenus ont été analysés par CLHP en phase inverse. Le rapport à maintenir correspond à la plus faible quantité en enzyme pour la quelle il y a disparition totale du substrat après 20 h d'hydrolyse.

1.9. Méthode d'analyses des peptides

L'ensemble des peptides issus de l'hydrolyse de la caséine a été analysé par chromatographie haute performance en phase inverse et par spectrométrie de masse.

1.9.1. Analyse des peptides par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse (PI)

Cette chromatographie est basée sur la différence d'affinité des molécules à séparer vis-à-vis de la phase stationnaire hydrophobe et de la phase mobile plus au moins hydrophile.

Un système HPLC automatisé composait d'un contrôleur de module de pompe et de gradient automatisé Waters 600E, un dispositif de collecteur automatique Waters Wisp 717 et un détecteur à réseau de photodiodes Waters 996. Les données spectrales et chromatographiques ont été stockées sur un ordinateur NEC466. Logiciel Millennium a été utilisé pour tracer, d'acquérir et d'analyser des données chromatographiques. Une analyse XBridge colonne C-18, (5 μm , 4,6 x 250 mm) (Waters, Irlande) a été utilisé avec un débit de 1 ml/min. Gradient d'éluion a été effectuée avec un mélange de solvant A (0,1% d'acide

trifluoroacétique (TFA), v / v) dans de l'eau déionisée et le solvant B (TFA 0,1% dans l'acétonitrile, v / v). Les protéines et les peptides ont été élués comme suit : 0-80 min, 40% de B; 80-85 min, 40 à 100% de B; 85-90 min, 100% de B; 90 à 100 min, 100-0% de B, le système de CLHP a été équilibré pendant 10 min avec 100% de A. L'élution a été effectuée à température ambiante.

1.9.2. Analyse des peptides par spectrométrie de masse

Les spectres de masse ont été réalisés dans le laboratoire. En règle générale, l'analyse par spectrométrie de masse d'un échantillon est constituée d'une série d'opérations successives : les molécules à analyser sont vaporisées puis ionisées dans la source de l'appareil, obtenant un mélange d'ions. Ces ions sont filtrés selon leur rapport masse/charge par un analyseur, et terminent leur course sur un détecteur. Le spectre de masse est obtenu par le traitement du signal émis par le détecteur.

Un spectromètre de masse est toujours composé de cinq parties :

Une chambre d'introduction dans laquelle l'introduction de l'échantillon peut se faire directement avec une seringue et pousse-seringue ou par couplage à la chromatographie liquide haute performance lorsque la technique utilisée le permet.

Une source, appelée aussi chambre d'ionisation et de volatilisation, permettant le passage en phase gazeuse (vaporisation/sublimation/désorption) de l'échantillon à analyser, l'ionisation des molécules, mais aussi la décomposition des ions. Plusieurs méthodes d'ionisation existent, le choix de celle-ci étant directement lié à la nature de l'échantillon et au type d'analyses souhaitées.

Les molécules ionisées se retrouvent ensuite dans la troisième partie de l'appareil correspondant à l'analyseur appelé également chambre de séparation. Il permet la séparation des ions en fonction du rapport masse/charge (m/z), par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique.

Les ions séparés par l'analyseur, arrivent au niveau du détecteur, constitué d'un collecteur d'ions et d'un ensemble électronique de mesure et l'amplification des signaux associés aux ions de différentes masses. Les ions viennent heurter un multiplicateur et l'énergie amplifiée est transcrite en un signal électrique, l'intensité du signal étant proportionnelle au nombre d'ions.

La dernière partie de l'appareil correspond à un enregistreur, permettant l'acquisition des données, qui est faite par un microprocesseur nécessitant une interface. Le rôle de celui-ci est de transcrire sous forme digitale les signaux analogiques. Les données issues de cette conversion sont stockées dans la mémoire de l'ordinateur pour le traitement.

Les sources, analyseurs et détecteurs existants peuvent être associés de manière différente et ainsi créer une grande variété d'appareil. Le choix d'un type de source ou d'un type d'analyseur dépend de la nature de l'échantillon à analyser et du type de donnée souhaitée (sensibilité, résolution et précision de mesure).

Pour étudier les peptides issus de l'hydrolyse enzymatique de la caséine bovine la technique de la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF).

1.9.2.1. Technique de la désorption laser assistée par matrice : MALDI-TOF

Le Maldi ou désorption /ionisation laser assistée par matrice, est une technique assez répandue permettant de travailler sur une grande gamme de masses (moins de 1 KDa à plusieurs centaines de KDa) avec une bonne précision de mesure de masse, une préparation et une mise en œuvre relativement simples, une grande rapidité d'analyse, ainsi qu'une relative tolérance vis-à-vis des tampons, des sels et de nombreux tensioactifs.

a- Principe

La technique MALDI utilise en général un faisceau laser pulsé émettant dans l'ultraviolet (UV) ou l'infrarouge (IR) pour désorber ou ioniser un mélange matrice/échantillon co-cristallisé sur une surface métallique (appelée cible) (Figure 01)

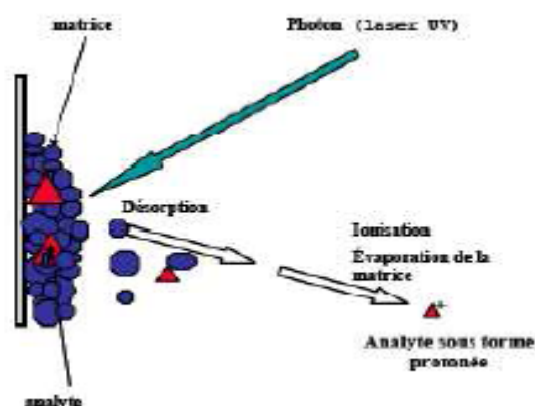


Figure 01 : Principe du MALDI

L'énergie est restituée en partie est transférée à l'échantillon qui sera alors volatilisé et ionisé par transfert de protons, soit avant désorption dans la phase solide, soit par collision après désorption avec la matrice excitée ou avec d'autres molécules du plasma pour former des ions mono ou di chargés de type $[M+nH]^+$. Les ions formés sont ensuite accélérés par application d'un champ électrique intense entre la cible et la première lentille électrostatique du spectromètre appelée lentilles d'extraction.

Il y a en général formation d'ions pseudo-moléculaires mono $(M+H)^+$ et doublement chargés $[M+2H]^+$, M correspondant à la masse de la molécule étudiée. Des ions de cationisation $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ et $[M+Na+K-H]^+$ sont également détectables.

La source MALDI utilisée, est couplée à un analyseur en temps de vol (TOF pour « Time of Flight ») en mode réflecteur, bien adapté à l'ionisation pulsée par désorption laser. L'analyseur en temps de vol (TOF) est un tube de vol qui sépare les ions en fonction de leur vitesse lorsqu'ils se déplacent dans un tube de vol. Le mode d'ionisation MALDI génère essentiellement des ions monochargés pour lesquels l'analyseur TOF offre une gamme de masses théoriquement illimitée.

Lors d'une analyse en MALDI, la première étape consiste à co-cristalliser une faible quantité d'échantillons avec une grande quantité de matrice, sur une surface métallique appelée cible, qui est généralement en métal inoxydable (souvent à base d'aluminium), conducteur et traite en surface de manière à être chimiquement inerte par rapport à l'échantillon.

La matrice possède plusieurs fonctions : isoler les molécules de l'échantillon les unes des autres pour éviter la formation de complexes de taille trop importante, minimiser la dégradation de l'échantillon par absorption de l'énergie du faisceau laser incident, améliorer le rendement d'ionisation. L'énergie transmise par laser est absorbée par matrice, et cet apport d'énergie provoque son expansion en phase gazeuse en entraînant les molécules d'échantillon.

Le choix de la matrice dépend de la nature des molécules à ioniser, et de plusieurs facteurs : elle doit former des cristaux incluant l'analyte : être soluble dans les solvants utilisés pour les macro-biomolécules ; absorber à la longueur d'onde du laser utilisé. Le solide obtenu par co-cristallisation de la matrice et de l'analyte, doit avoir une durée de vie dans le vide suffisamment longue pour permettre l'enregistrement du spectre.

Le dépôt de l'échantillon sur la cible peut se faire par de nombreuses méthodes décrites en détail par Beavis et Chait (1996) et Kussmann et *al.*, (1997). Le dépôt a été effectué en se servant de la méthode dite en couche mince : une goutte de solution saturée de matrice est déposée sur la cible (Xiang et Beavis, 1994, Vorn et *al.*, 1994). La matrice est solubilisée dans un solvant très volatil, conduisant à la formation d'une couche de cristaux de matrice très homogène appelée « couche mince ». La solution contenant l'échantillon, est déposée sur cette couche mince puis évaporée.

Un triple quadripôle (Figure 02), comme son nom l'indique, est composé de trois quadripôles appelés Q1, q2, Q3 disposés en série : le premier (Q1) et (Q3) sont des analyseurs de masse (m/z), alors que le deuxième (q_2) constitue une cellule de collision, dans laquelle les ions se brisent par collision (CID) à l'aide d'un gaz inerte comme l'azote N_2 (appelé gaz de collision) et d'une énergie de collision.

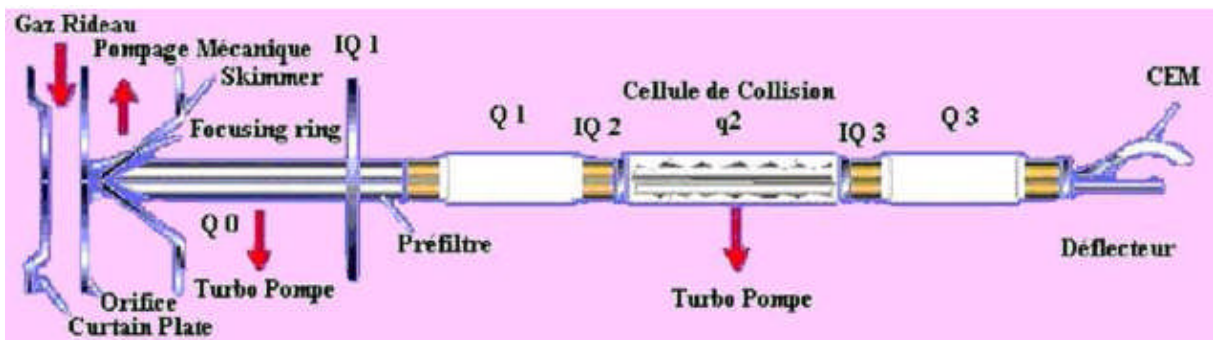


Figure 02 : Schéma en coupe d'un triple quadripôle

Un triple quadripôle (ou spectromètre de masse en tandem), permet lors de l'analyse d'un peptide, d'identifier sa séquence en acides aminés : un ion de masse appelé ion parent, correspondant au peptide analysé, est sélectionné dans le premier analyseur Q1. Cet ion parent est ensuite fragmenté dans la cellule de collision q_2 , permettant l'obtention d'ions fragments analysés dans Q3 (Figure 03).

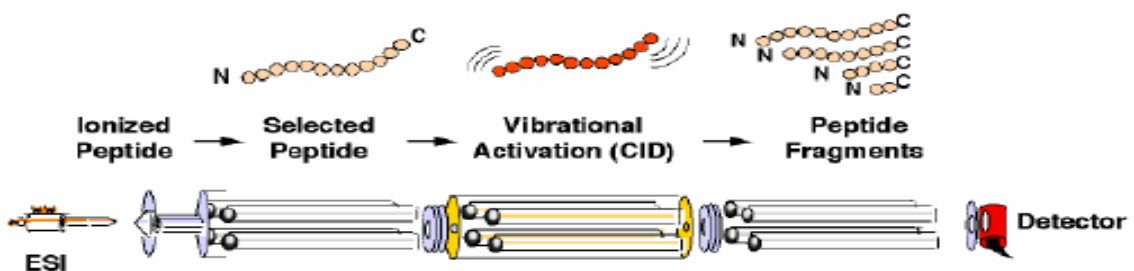


Figure 03 : principe d'un spectromètre de masse en tandem

Les peptides se fragmentent toujours de la même façon, essentiellement au niveau des liaisons peptidiques selon une nomenclature établie par Roepstorff et Fohlman, en 1984, et Biemann, en 1990. Plusieurs types de fragments existent : les fragments N-terminaux et C-terminaux, les fragments internes et les pertes de chaînes latérales.

Les fragments N-terminaux sont obtenus en rompant la liaison peptidique et en conservant la charge de l'ion sur la partie N-terminale du peptide : les fragments primaires obtenus à basse énergie sont de types a, b, c et les fragments secondaires obtenus à haute énergie de type d. Quant aux fragments C-terminaux, ils sont obtenus en rompant la liaison peptidique et en conservant la charge de l'ion sur la partie C-terminale du peptide : les fragments primaires obtenus à basse énergie sont de types x, y, z et les fragments secondaires obtenus à haute énergie de type v et w. ces fragments sont notés avec un indice qui précise le nombre de résidus portés par l'ion fragment (Figure 04).

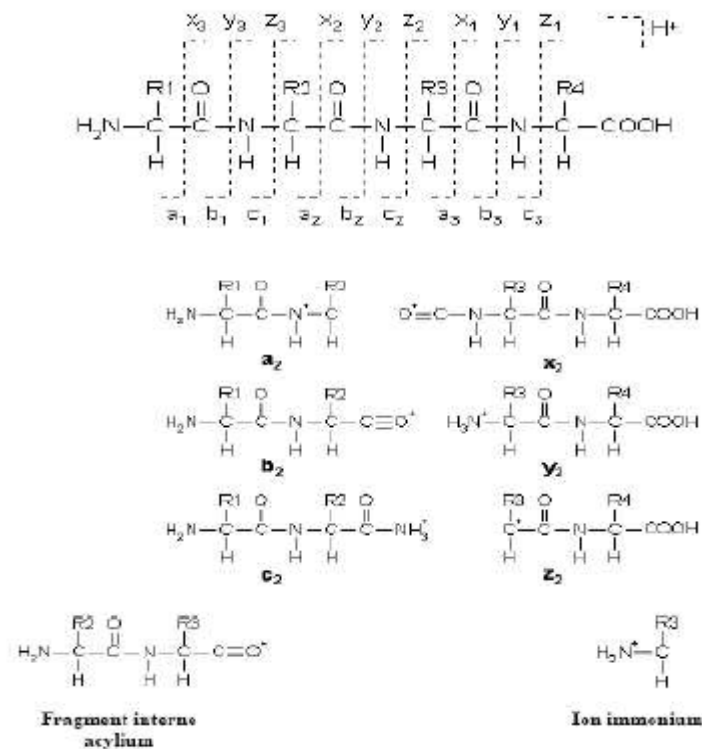


Figure 04 : Schéma théorique de la *fragmentation* d'un peptide

Les spectres de fragmentations peptidiques à basse énergie donnent majoritairement des ions de série y et b. La séquence partielle ou totale du peptide est déterminée par la succession de clivages consécutifs appartenant à une série (a ou b). Ainsi deux clivages consécutifs induisent la formation d'ions fragments dont la différence de masse équivaut à la

masse moléculaire caractéristique d'un acide aminé. Les ions obtenus par fragmentation des chaînes latérales (ions de série d, v, w) apparaissent essentiellement lors des fragmentations à haute énergie. Ils résultent de clivages homolytiques des liaisons carbone-carbone des chaînes latérales ou de mécanismes radicalaires avec réarrangement sur un site éloigné de la charge.

Il existe cependant des ambiguïtés lors de l'interprétation des spectres de fragmentation. Il est par exemple difficile de distinguer : les acides aminés isobares (Leucine et Isoleucine), les acides aminés de masses très proches comme la Lysine et la Glutamine, et certaines combinaisons de résidus de masse égale à celle d'un autre résidu. Les acides aminés isobares ou de masses proches peuvent être discriminés en générant des fragmentations de leurs chaînes latérales (ions de série d) par spectrométrie de masse en tandem à haute énergie.

1.10. L'activité antimicrobienne

1.10.1. La méthode de diffusion sur la gélose

La détection des activités antimicrobiennes des hydrolysats et des peptides a été réalisée selon la méthode de diffusion décrite par Hikey *et al.*, (2003).

Plusieurs souches bactériennes cibles ont été utilisées 4 souches à Gram-positif ; *Bacillus subtilis* **ATCC 6633** (the American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA), *Listeria innocua* **LMG 11387**, *Listeria monocytogenes* **ATCC 3512** (CM/NCTC, UK), *Staphylococcus aureus* **CIP 4.83**, *Bacillus cereus* et 3 souches à Gram-négatif : *Escherichia coli* **JM 109**, *Escherichia coli* **DH5a** et *E. coli* **CIP 54127**.

La détection de l'activité antimicrobienne sur milieu gélosé est basée sur la diffusion de l'agent antibactérien au sein de ce milieuensemencé avec une souche cible.

Le dépôt de l'agent antimicrobien se fait en puits confectionnés à l'aide d'un emporte-pièce. Le diamètre des puits est 5mm et le volume de l'échantillon déposé est de 20 µl.

Le volume de la culture de la souche cible est calculé de façon à avoir une concentration cellulaire de 10^7 UFC/ 12 mL de milieu Müller-Hinton. Après une brève homogénéisation par vortex, les 12 mL contenant les 10^7 UFC sont coulés rapidement dans une boîte de Petri. Après solidification, les puits sont confectionnés d'une façon aseptique et 20 µL de chaque échantillon à tester (hydrolysats ou peptides) sont déposés.

Après 3 heures de diffusion à 4°C, la souche est mise à incuber à la température appropriée selon le type de la souche cible et l'activité antimicrobienne est détectée par

l'apparition de zones d'inhibition de croissance autour des puits après 24 heures d'incubation (figure 05).

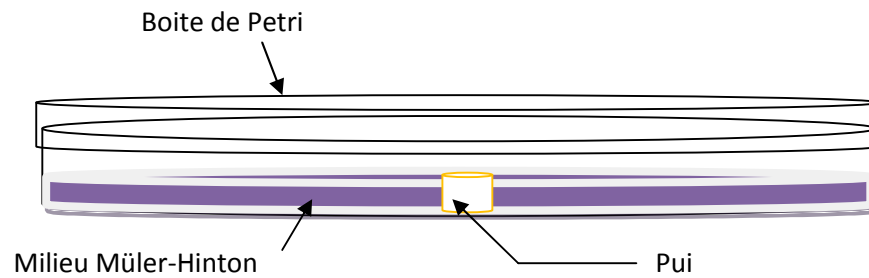


Figure 05 : Schéma représentant la méthode de diffusion sur gélose

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Elaboration du soucier

I.1. Caractéristiques des laits

Au total deux cent échantillons de laits ont été collectés à partir de différentes origines animales dont cent (100) échantillons d'origine bovine, cinquante (50) d'origine caprine et cinquante (50) autres d'origine ovine. Une caractérisation physicochimique et biochimique globale a été réalisée et les résultats trouvés sont consignés respectivement dans les tableaux 1 et 2 de la partie annexe.

Les laits retenus pour l'isolation microbiologique des espèces appartenant au genre *Lactococcus* sont des laits normaux sur le plan physico-chimique et biochimique. Toute modification à ce niveau serait signe de pathologie. La mesure des variations du potentiel électrique (ou de la conductivité) du lait des premiers jets peut révéler d'éventuelles mammites. Selon Biggadike et *al.* (2002), la conductivité électrique dans les premiers jets serait directement proportionnelle à la gravité de l'infection du pis. D'après Norberg et *al.*, (2004), la conductivité du lait d'un quartier sain est en général comprise entre 400 et 550 $\mu\text{S}/\text{cm}$ à 25°C.

En final, nous avons pu collecter vingt et quatre souches persistantes par isolation sur milieu M17 appartenant à l'espèce *Lactococcus lactis* à partir des laits normaux de brebis, de vaches et de chèvres dans le bassin laitier du moyen Chélif et dont les tentatives d'identification montrent la distribution suivante :

- 16 isolats de souches de *Lactococcus lactis subsp lactis* ; représentent 66,66 %
- 04 isolats de souches de *Lactococcus lactis subsp cremoris* ; représentent 14,30 %
- 04 isolats de souches de *Lactococcus lactis subsp diacetylactis*. représentent 19,04 %

I.2. Caractéristiques phénotypiques des isolats

Sur le plan morpho-culturelle et microscopique toutes les colonies prélevées à partir du milieu M17 sont rondes ou lenticulaires, à contour régulier, d'un blanc opaque. Les cellules sont sous forme de coques isolées, en paires ou en chaînettes à Gram⁺ et catalase négatif. Selon Petranxiene et Lapiéd (1981), ces souches peuvent être des lactocoques. Les critères utilisés pour déterminer l'espèce et la sous espèce et les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux 03, 04, 05, 06, 07 et 08 (voir annexe). Les souches des isolats ont été identifiées en se basant sur leurs caractéristiques physiologiques et biochimiques données par Dellaglio et *al.*, (1994) ; Stiles et Holzapfel (1997), Schleifer et *al.*, (1985) et Guiraud

(1998). Les individus d'isolation sélective à partir de colonies lenticulaires et à contour régulier par culture sur milieu M17 sont des cocci en paire ou en chaînette, Gram positives, catalase-négatives, non motiles et asporulés, anaérobies facultatives. Tous sont capables de croître à 10°C et 30 °C et à 2% et 6% de NaCl faiblement à 45°C.

Le caractère homofermentaire du glucose est confirmé par l'absence de production de CO₂ et exclusivement de l'isomère lactate L+. A ce stade, nous les avons confondus avec les espèces du genre *Enterococcus* habituellement décrites dans la littérature. L'utilisation des galeries API 50CHL (Bio Mérieux) nous a permis la confirmation de leur appartenance au genre *Lactococcus*. Ces caractères de résistance à 6% de NaCl, et de capacité de cultiver en présence de 40% de sels biliaires d'hydrolyse de l'esculine et de croître à 45°C (faiblement) font la particularité de ces souches et déterminent leur atypicité. Ce phénomène a été également décrit par Karam et Karam (2006) dans leurs travaux sur la microflore des laits de chamelles du sud algérien. Ces auteurs expliquent ce comportement par l'adaptation physiologique de ces souches à un environnement riche en NaCl. Le bassin laitier du moyen Chellif, comme il a été décrit précédemment est un écosystème de climat aride et de sols plus ou moins fortement salinisés, la biocénose subit ces contraintes et fini par s'adapter. Doui et al., (2009) rapportent également que certaines souches du genre *Lactococcus* isolées à partir du beurre de brebis présentaient les mêmes caractéristiques. Ce comportement particulier d'halo-résistance au NaCl et de thermotolérance peut présenter un intérêt technologique car elles pourraient en effet être testées dans l'élaboration de produits lactofermentés salés (fromages, viandes, végétaux, ...). Par ailleurs, Schleifer (1987) signale que les sous espèces lactis et diacetylactis résistent à 40% de sels biliaires par contre ce comportement est variable chez la sous espèce cremoris. Les souches qui se cultivent sur lait bleu de Sherman (réductase +) et fermentent le maltose, possédant une arginase et produisent de l'acétoïne, possèdent une citratase sont présumés être des *Lactococcus lactis biovar diacetylactis*. Celles qui sont incapables de produire de l'acétoïne sont des *Lactococcus lactis subsp lactis*. Les sous espèces de *Lactococcus lactis subsp cremoris* par contre ne peuvent fermenter le maltose et ne produisent pas d'arginase. Habituellement, les lactocoques croissent dans 0,5 à 4% de NaCl, voire 6,5% de NaCl pour certaines espèces telle que *L. lactis subsp. lactis* (Hamasaki et al., 2003). Leur croissance est inhibée à des pH inférieurs à 4,4. La plupart des espèces sont mésophiles leur température optimale étant voisine de 30°C, mais elles se développent généralement à 10°C.

I.2. Etude de l'activité protéolytique des souches isolées

I.2.1. Criblage de l'activité protéolytique

Afin de mettre en évidence l'activité protéolytique dans le milieu de culture, l'activité protéolytique a été recherchée dans le surnageant de culture sur la collection de 24 souches de *Lactococcus* préalablement identifiées. L'activité a été mise en évidence après 48 heures d'incubation à 30°C sur gélose au lait après élimination des cellules par centrifugation et filtration sur 45µm. L'activité se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des puits. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 05.

Tableau 05: Résultat du criblage de l'activité protéolytique des cultures pures de *Lactococcus lactis*.

Souches	Activité protéolytique	Souches	Activité protéolytique
<i>Lc.L1</i>	-	<i>Lc.L13</i>	+
<i>Lc.L2</i>	-	<i>Lc.L14</i>	-
<i>Lc.L3</i>	-	<i>Lc.C1</i>	+
<i>Lc.L4</i>	-	<i>Lc.C2</i>	+
<i>Lc.L5</i>	-	<i>Lc.C3</i>	+
<i>Lc.L6</i>	+++	<i>Lc.C4</i>	+
<i>Lc.L7</i>	-	<i>Lc.D1</i>	-
<i>Lc.L8</i>	-	<i>Lc.D2</i>	-
<i>Lc.L9</i>	-	<i>Lc.D3</i>	+
<i>Lc.L10</i>	-	<i>Lc.D4</i>	-
<i>Lc.L11</i>	-		
<i>Lc.L12</i>	+		

(-) Absence de protéolyse

(+) Présence de protéolyse

Parmi les vingt et quatre souches testées, uniquement huit souches ayant exprimées une activité protéolytique, trois souches d'origine lait de vache (*Lc.L12*, *Lc.L13*, *Lc.L6*), quatre souches d'origine (*Lc.C1*, *Lc.C2*, *Lc.C3*, *Lc.C4*) lait de brebis et une souche d'origine le lait de chèvre (*Lc.D3*). La comparaison des diamètres de clarification montre que la souche *Lc.L6*

a exprimée une activité protéolytique plus importante par rapport aux autres souches, se traduisant par un diamètre de clarification le plus large (Figure 25). Par ailleurs, ce type d'activité est spécifique aux souches présentant un système enzymatique sécrété à l'extérieur de la cellule et qui la capacité d'hydrolyser les protéines. Cette activité protéolytique a été rapportée par Nissen-Meyer et Sletten (1991) pour la souche *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO 1201.

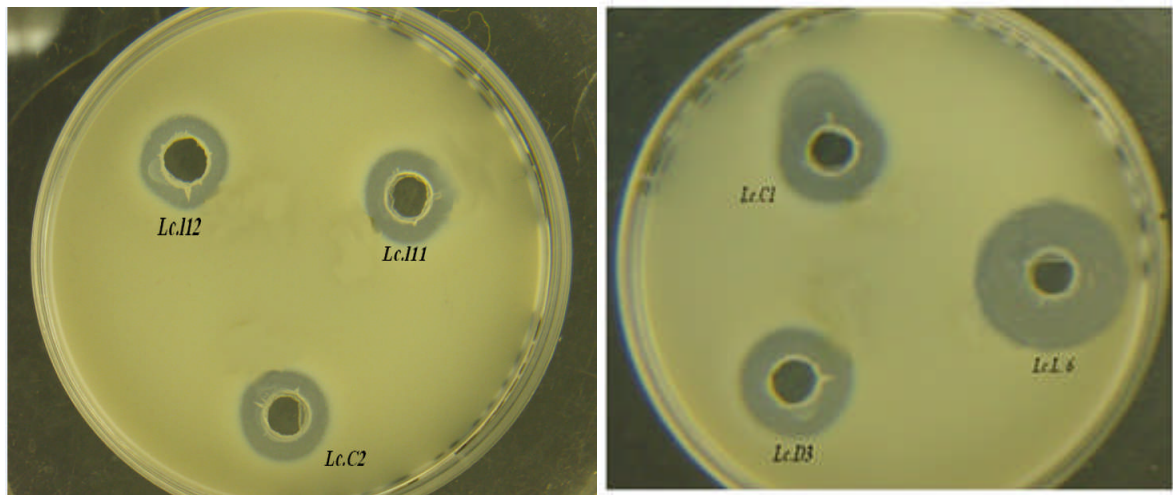


Figure 25 : Exemple d'un résultat de la mise en évidence de l'activité protéolytique de trois souches de *Lactococcus* Lc.C1, Lc.C2, Lc.D3, Lc.111, Lc.112 et Lc.l6 après 48h d'incubation sur gélose au lait.

I.2.2. Détermination du pouvoir protéolytique

Afin de valider le résultat précédant et d'évaluer la capacité des souches à hydrolyser la caséine du lait, la détermination du pouvoir protéolytique des souches sélectionnées s'est avérée nécessaire.

Le dosage de l'activité protéolytique a été évalué après 48 heures d'incubation à 30°C dans le surnageant de culture. Les cellules bactériennes sont éliminées par centrifugation à 10⁴ rpm/ 10 min à 4°C et filtration sur 45µm, afin d'éliminer toute activité contaminante.

Pour croître dans le lait, *Lactococcus lactis* assimile les acides aminés et les oligopeptides contenus dans le lait ou issus de l'hydrolyse des protéines du lait, notamment des caséines. Généralement, le système protéolytique caractérisé à ce jour chez les lactocoques est complexe constitué de protéase fixé sur la paroi cellulaire, un système de transport d'oligopeptide et des peptidases intracellulaires (Liu et *al.*, 2010). Cependant, ce système est inhabituel chez les bactéries lactiques en particulier chez les lactocoques. Peu d'études qui ont pu mettre en évidence des protéases extracellulaires libres chez cette espèce, c'est le cas de l'étude réalisée par Nissen-Meyer et Sletten (1991).

Il en ressort clairement à travers la figure 26 que la souche Lc.L6 se distinguait par une activité protéolytique la plus prononcée comparée aux autres souches. Cette activité a été estimée à 4,561 U/mL par contre pour les autres souches elle varie entre 1,2 et 0,11 U/mL.

La souche Lc.L6 a été retenue pour le reste du travail éventuellement pour une identification génotypique et l'extraction et la purification de la protéase faisant partie de son système protéolytique.

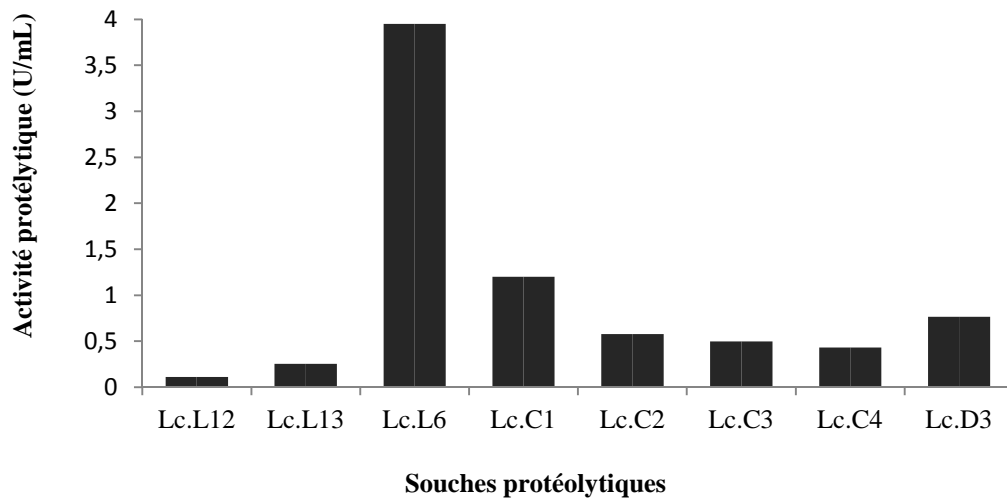


Figure 26: Pouvoir protéolytique des souches de *Lactococcus* testées

I.2.3. Identification génotypique de la souche Lc.L6

La souche Lc.L6 a été identifiée génétiquement Tunisie en tant que *Lactococcus lactis subsp lactis* avec un numéro d'accèsion **AB618806.1** au niveau du laboratoire de Génie Enzymatique et de Microbiologie à Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax,.

II. Extraction et purification de la protéase exogène de Lc.L6

II.1. Cinétique de production de la protéase par la souche Lc.L6

Une cinétique de production de la protéase exogène de la souche sélectionnée a été étudiée au cours des différentes phases de croissance, dans le but déterminer la durée d'incubation qui permet meilleur une production de protéase.

Le résultat présenté dans la figure 27, illustre l'évolution de l'activité protéolytique, la biomasse et le pH du milieu en fonction de la durée d'incubation. En effet, la figure 27 montre également que la synthèse de la protéase est principalement associée à la croissance cellulaire

durant la phase exponentielle. La quantité maximale de protéase est produite durant 18 heures d'incubation pour atteindre 3,93 U/mL correspondant à la fin de la phase exponentielle. En suite, la production de protéase reste plus au moins stable durant toute la phase stationnaire où elle atteint une valeur de 3,7 U/ml. Durant la phase de déclin, nous avons constaté une faible diminution de production de la protéase pour atteindre après 48 heures d'incubation 3,34 U/mL. Ceci est dû principalement au phénomène d'autolyse cellulaire et à l'auto-protéolyse de l'enzyme. Selon Laan et Konings, (1991), le phénomène d'autolyse devient de plus en plus important parallèlement à l'épuisement du milieu de culture.

En effet, selon Juillard et Richard, (1994), la durée d'incubation a une influence directe sur la production des protéases. Cependant, de nombreuses études ont signalé que la production maximale de la protéase se situe à la fin de la phase exponentielle et le début de la phase stationnaire (Nissen-Meyer et Sletten, 1991; Meijer *et al.*, 1996).

Par ailleurs, une légère diminution du pH de milieu a été constatée après 8 heures d'incubation en passant de 6,67 à 6,1 ; ensuite une stabilité a été notée jusqu'à la fin de la période d'incubation arrivé à une valeur de 5,63. Cette stabilité de pH observé chez la souche Lc.L6 au cours toute la période de fermentation constitue un facteur très intéressant en favorisant la croissance des cellules ainsi la production et la stabilité de la protéase.

Selon plusieurs études (Juillard et Richard, 1990 ; Bouhallab *et al.*, 1992 ; Favrot et Maubois, 1994 et 1996 ; Picon et Nuñez, 2007) réalisées sur des souches protéolytiques appartenant à l'espèce *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, la diminution du pH se déroule d'une manière progressive après 10 h d'incubation ensuite une chute rapide a été observée après 24 h d'incubation pour atteindre des valeurs de pH au alentour de 4.

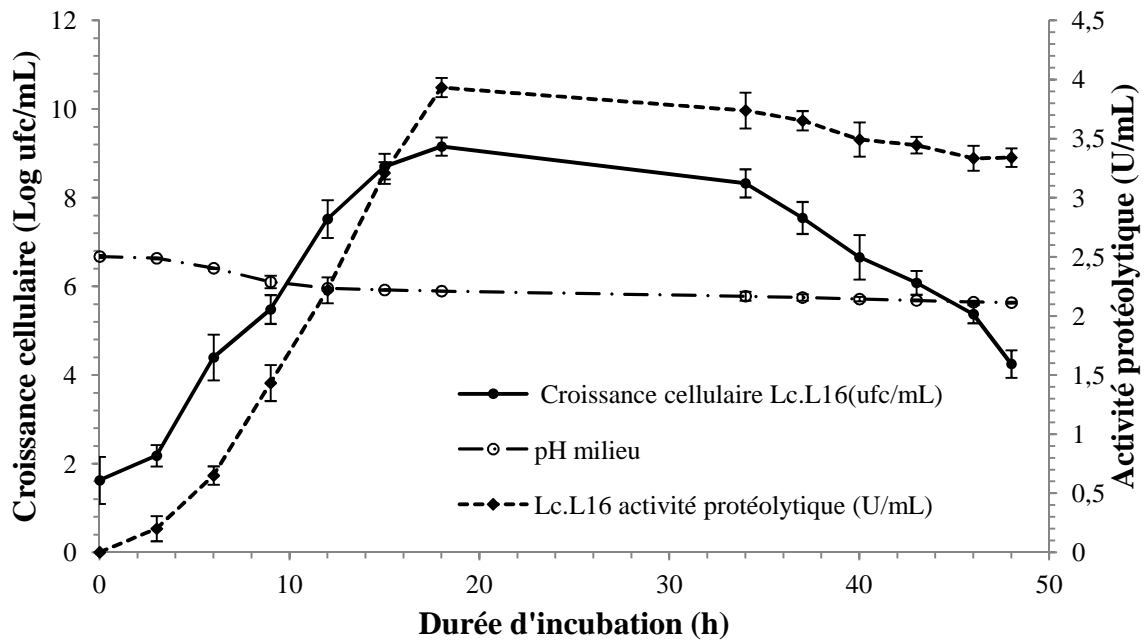


Figure 27 : Cinétique de croissance et de production de la protéase de *Lactococcus lactis subsp. lactis* Lc.L6. Les échantillons ont été prélevés à 3 heures d'intervalle pour la détermination de la croissance cellulaire (Log CFU / ml) et de l'activité de la protéase.

II. 2. Purification de la protéase de Lc.L6

La mesure de l'activité protéolytique et la détermination du profil protéique par électrophorèse SDS-PAGE avant chaque étape de purification sont nécessaires à fin de déterminer le rendement de purification de la protéase,

La purification de la protéase de Lc.L6 a été effectuée en trois étapes. Durant la première étape, l'extrait enzymatique (900 mL) de la souche Lc.L6 a été concentré jusqu'à environ 50 mL par ultrafiltration en utilisant une membrane avec un seuil de coupure de 10kDa. Ceci nous a permis de récupérer des protéines ayant un poids moléculaire supérieur à 10kDa. L'activité spécifique passe de 86,96 à 153,54 U/mg pour un rendement de purification de 96%.

A noter, que lors de cette opération une perte d'activité a été détectée, qui est due au phénomène d'auto-protéolyse puisque l'opération a été conduite à température ambiante, ainsi la possibilité de fuite de l'enzyme à travers la membrane d'ultrafiltration.

L'examen du profil électrophorétique SDS-PAGE (Figure 30-a-) réalisé sur le rétentat récupéré lors de l'étape d'ultrafiltration, montre la présence de plusieurs molécules protéiques de différents poids moléculaires, ceci se traduit par l'apparition de plusieurs bandes sur le

gel. Afin d'éliminer les protéines contaminantes, une deuxième étape de purification c'est avérée nécessaire. Deux méthodes chromatographiques ont été testées, le tamisage moléculaire couramment appelée gel filtration et l'échange ionique.

La chromatographie échangeuse d'ions a donnée le meilleur résultat en employant le support SP-Sepharose comme échangeur de cations.

Cependant, au cours de cette étape, le rétentat d'environ 50 mL récupéré après concentration par ultrafiltration a été soumis à une chromatographie sur la colonne garnit de la phase SP-Sepharose. Les protéines adsorbées ont été éluées avec un gradient linéaire de NaCl de 0 à 1 M. L'activité de la protéase est détectée dans le second pic (Figure 28). Les fractions contenant la protéase ont été rassemblées, concentrées par ultrafiltration (10 KDa) jusqu'à un volume de 25 mL. L'activité spécifique de cette extrait a été évaluée à 352,69 U/mg et le rendement de purification de cette étape est de 68%.

L'extrait enzymatique récupéré après la deuxième étape a été analysé par électrophorèse PAGE afin de déterminer sa pureté. Le profil électrophorétique du puit n°1 (Figure 30-a-) montre la présence de la protéase recherchée et de quelques de protéines contaminantes. Une autre étape de purification a été nécessaire afin d'éliminer les protéines contaminantes. L'emploi de la chromatographie gel filtration sur Sephadex G-50 permet l'élimination des protéines de faibles poids moléculaires.

L'extrait enzymatique (25 mL) récupéré de l'étape précédente a été percolé sur une colonne Sephadex G-50 préalablement équilibrée avec du tampon Tris-HCl 50Mm à pH 7. Le profil d'éluion montre une meilleure séparation de la protéase recherchée en un seul pic (Figure 29). Les fractions actives ont été rassemblées, concentrées par ultrafiltration (10 KDa) jusqu'à un volume de 10 mL. L'activité spécifique de cette a été estimée à 2054,95 U/ mg avec un rendement d'extraction de 47%.

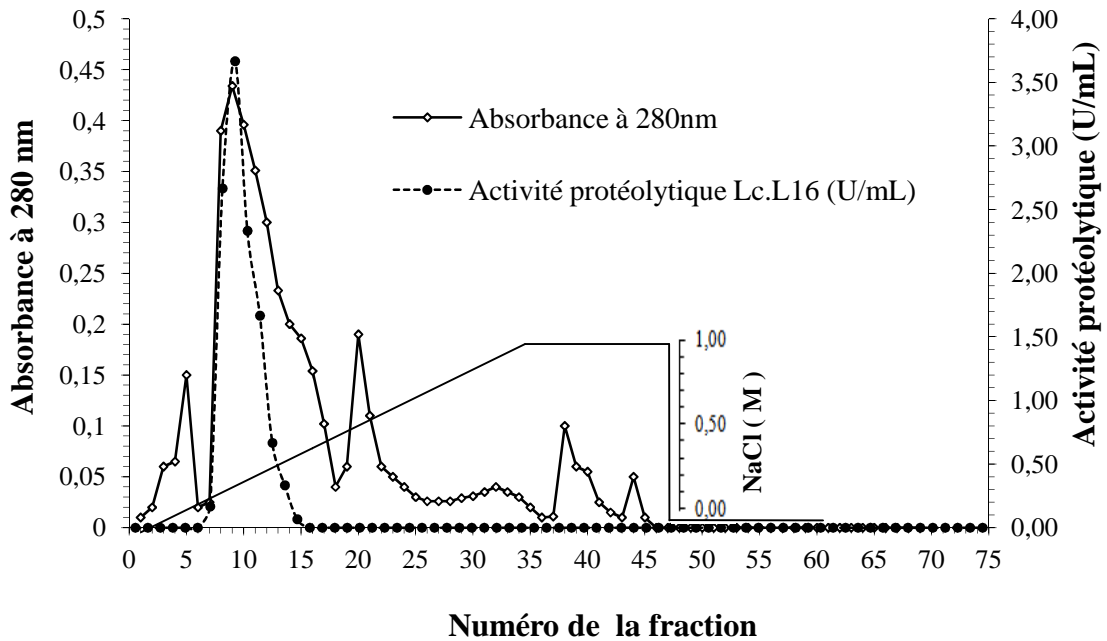


Figure 28 : Profil d'élution de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Lc.L6 protéase à partir d'une colonne de SP-Sepharose. L'enzyme a été éluée avec un gradient linéaire de NaCl (0-1 M) dans 50 mM de tampon Tris-HCl (pH 8,0) à un débit de 120 mL/ h.

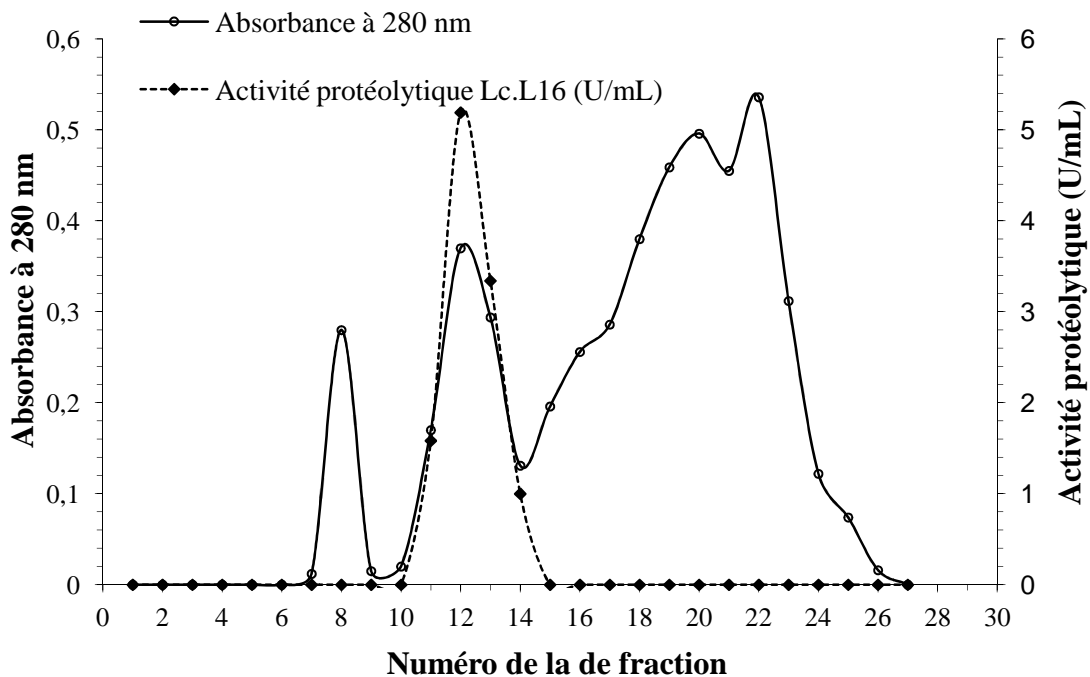


Figure 29 : Profil de purification de la protéase de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Lc.L6 par gel filtration sur une colonne de Sephadex G-50. Les fractions actives ont été déposées sur une colonne de 120 cm X 1,2 cm équilibrée et éluée avec 50Mm Tris-HCl, NaCl à 0,15M. Débit = 30 mL / h.

Tableau 06 : Résultats des étapes de purification de la protéase de Lc.l6

Etape de purification	Volume (mL)	Activité totale (U)	Protéine totale (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Extrait brut	900	6100	70,15	86,96	100	1
Ultrafiltration	50	5853	38,12	153,54	96	1,77
SP-Sepharose	25	3996	11,33	352,69	68	2,3
Sephadex G-50	10	1870	0,91	2054,95	47	5,83

La protéase purifiée présente un poids moléculaire égal à 38 kDa estimé par électrophorèse SDS-PAGE (Figure 30-a), correspondant à celle déterminée par gel filtration (Figure 30-c). L'homogénéité de l'enzyme a été également vérifiée par zymographie. Comme le montre la Figure 30-b, deux bandes claires correspondant à l'activité caséinolytique de la protéase à l'état native. L'appariation de deux bandes est due probablement au phénomène d'auto-protéolyse au niveau un seul site. Ce phénomène a été décrit par Laan et Konings (1991).

En général, le poids moléculaire des protéases appartenant aux lactocoques se situe entre 12 et 180 kDa. En effet, le poids moléculaire de la protéase purifiée de Lc.L6 est plus grand par rapport à celui de *Lc. lactis* subsp. *lactis* IAM 1198 (**12 kDa**) rapporté par Akuzawa et Okitani, (1995). Par contre, ce poids est faible comparé avec ceux des protéases signalés dans d'autres travaux pour d'autres souches appartenant à la même espèce : **93 kDa** pour *Lc.lactis* subsp. *lactis* NCDO 763 (Muset *et al.*, 1989) ; **140 kDa** pour *Lc. lactis* ssp. *Cremoris* H61 (Ohmiya et Sato, 1975) ; **165 kDa** pour *Lc. lactis* subsp. *cremoris* Wg2 (Laan et Konings, 1991) et **180 kDa** de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* H2 (Coolebear *et al.*, 1992).

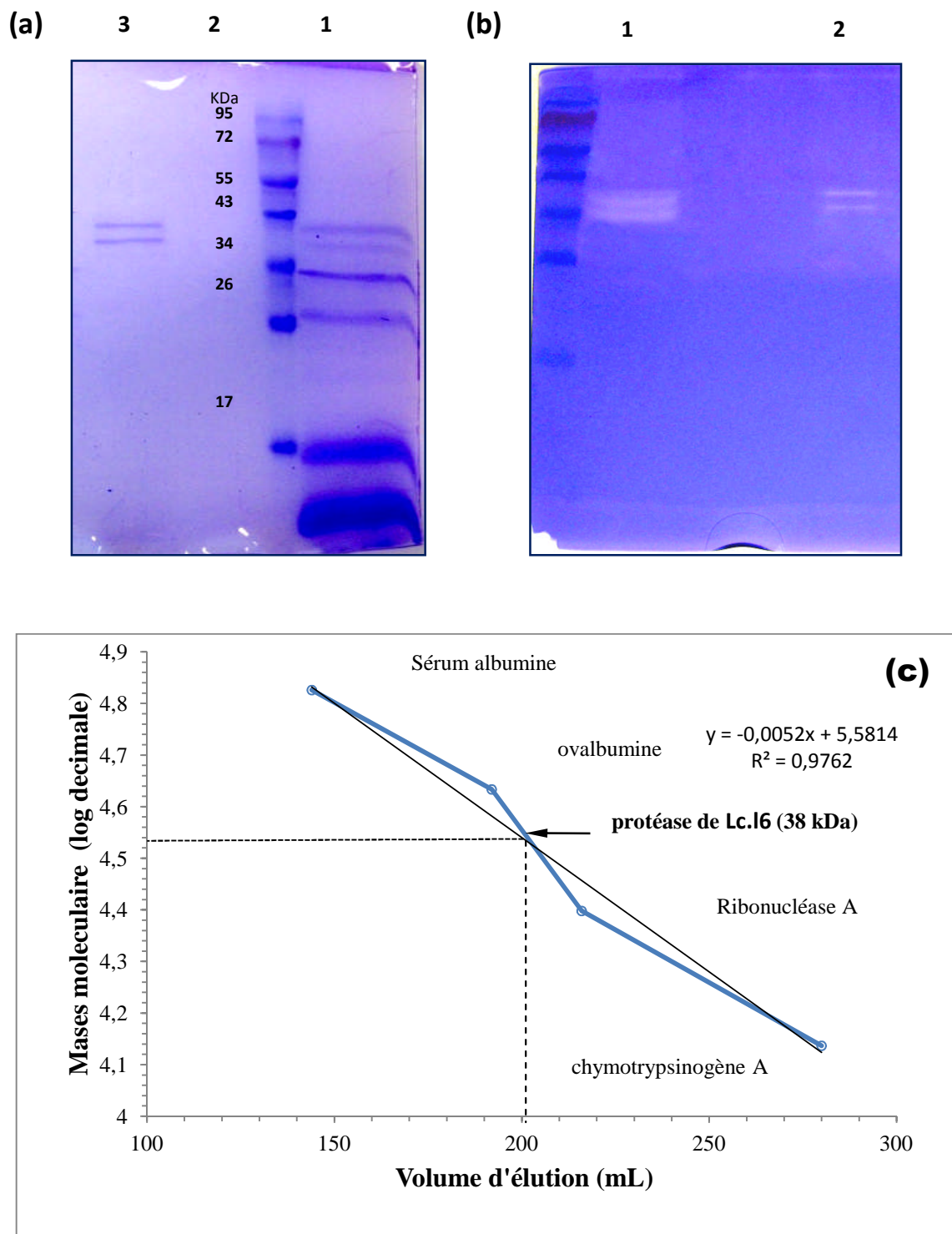


Figure 30 : a) SDS-PAGE de la protéase purifiée à partir de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Lc.L6. **Piste 1:** extrait enzymatique brut; **piste 2 :** marqueurs de masse moléculaire; **piste 3:** enzyme purifiée. **b)** Zymogramme du surnageant brut de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (**piste 1**) et l'enzyme purifiée (**piste 2**). **c)** Estimation de la masse moléculaire de la protéase Lc.L6.

II.3. La caractérisation biochimique de la protéase purifiée

II.3.1. Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la protéase purifiée

Le profil d'activité du pH de la protéase Lc.L6 purifiée a été déterminé en utilisant différents tampons de différentes valeurs de pH. La protéase Lc.L6 est très active dans l'intervalle de pH de 6,0 à 7,5, avec un optimum autour de pH 7 (figure 31-a). Les activités relatives à pH 6,0 et pH 7,5 étaient d'environ 90%, par rapport à celle mesurée à pH 7. Cependant, l'activité de la protéase Lc.L6 diminue de manière significative au-dessus de pH 9,0.

Ces résultats sont en accord avec plusieurs études, le pH optimal de plusieurs protéases appartenant à l'espèce *Lactococcus lactis* varie entre 5,5 et 7,5. L'optimum est entre 5,5-6,0 pour la protéase de *Lc. lactis* subsp. *lactis* IAM 1198 (Akuzawa et Okitani, 1995), entre 6,0-6,5 pour la protéase de *Lc. lactis* subsp. *lactis* IAM 1198 (Akuzawa et al., 1994) et entre 7-7,5 pour la protéase de *Lc. lactis* subsp. *lactis* MG 1363 (Stepaniak et al., 1996).

En revanche, la figure 31-b représente la stabilité de la protéase Lc.L6 au pH. La figure montre que la protéase est très stable dans une large gamme de pH de 6,0 à 8,0 en conservant plus de 90% de l'activité initiale après 1 h d'incubation à 55 ° C.

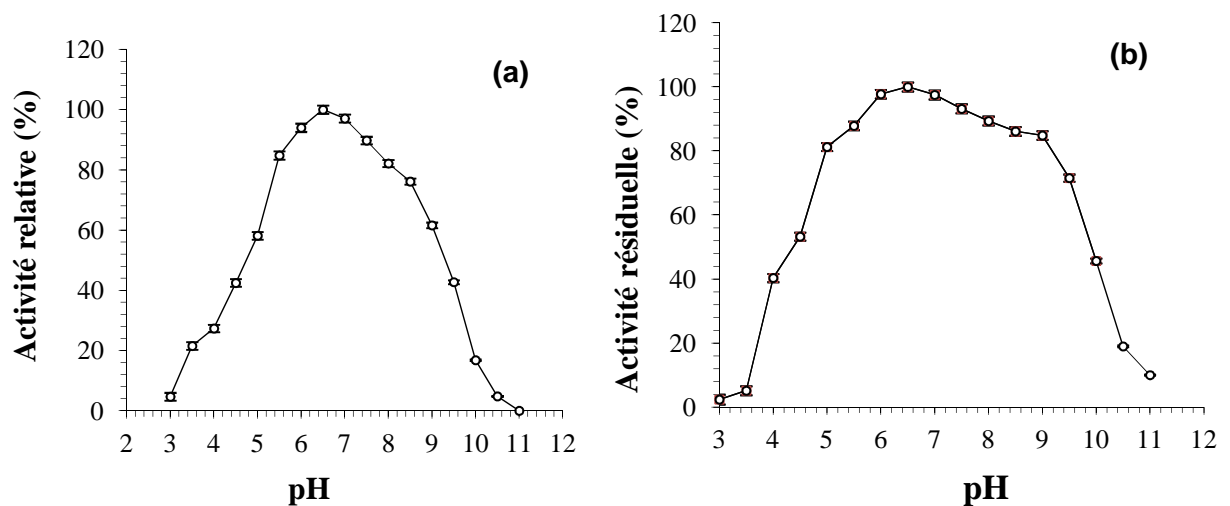


Figure 31 : Effet du pH sur l'activité (a) et la stabilité (b) de la Lc.L6 protéase purifiée. L'activité de la protéase a été dosée dans une gamme de pH de 5,0 à 11,0 à l'aide de tampons de différentes valeurs de pH à 55 ° C. L'activité maximale obtenue à un pH de 7,0 a été considérée comme 100% d'activité. La stabilité au pH de l'enzyme a été déterminée par incubation de l'enzyme dans différents tampons pendant 1 h à 55°C et l'activité résiduelle a été mesurée à pH 7,0 et 55 °C.

II.3.2. Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la protéase

L'effet de la température sur l'activité de protéase de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Lc.L6 a été examiné à différentes températures. L'enzyme était active entre 30 et 70°C avec un optimum à 55 ° C (Figure 32-a). Les activités protéasiques relatives à 45, 50 et 60°C était d'environ 81, 94 et 80%, respectivement. La température optimale de protéase du Lc.L6 est plus élevée que les protéases de lactocoques signalées dans la littérature, à titre d'exemple la protéase de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* H61, de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* Wg2 et de *Lc. lactis* subsp. *lactis* IAM 1198 (30°C) étudiées respectivement par Ohmiya et Sato, (1975), Laan et Konings, (1991) et Akuzawa et Okitani, (1995) leurs températures optimales été égale de 30°C, par contre, celle de *Lc. lactis* subsp. *lactis* NCDO été à 45°C signalée par Muset *et al.*, (1989) ; et enfin, celle de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* H2, la température optimale d'activité été de 37°C étudiée par Coolebear *et al.*, 1992.

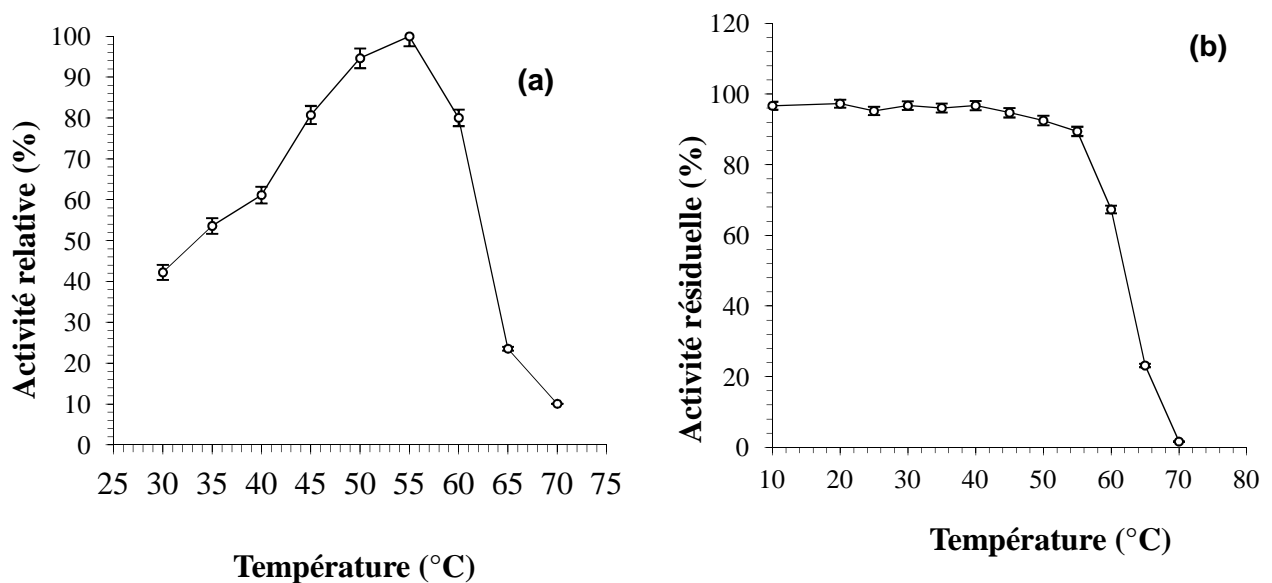


Figure 32 : Effet de la température sur l'activité (a) et la stabilité (b) de la protéase purifiée Lc.L6. Le profil de température a été déterminé par dosage de l'activité de la protéase à des températures entre 20 et 70°C. L'activité enzymatique à 55°C a été prise comme 100%. La stabilité thermique a été déterminée par incubation de l'enzyme purifiée à des températures différentes pendant 60 min.

Pour la stabilité thermique, une activité résiduelle de la protease *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Lc.L6 a été évaluée après un traitement thermique pendant 60 min à différentes températures et les résultats sont indiqués sur la Figure 32-b. Le profil de stabilité thermique de la protéase purifiée a montré que l'enzyme est très stable à des températures inférieures à

60°C, mais à des températures plus élevées l'enzyme perd totalement son activité. L'enzyme retienne plus de 96,7%, 94,7% et 92,5% de son activité initiale à 40, 45 et 50°C respectivement. La stabilité thermique de la protéase Lc.L6 est supérieure à celle de *Lactococcus lactis subsp. lactis* IAM 1198 signalé par Akuzawa et Okitani (1995).

III.3.3. Effet de divers inhibiteurs sur l'activité de la protéase purifiée

Les protéases peuvent être classées selon leur sensibilité à différents inhibiteurs (Nord, 1982). Les effets de divers inhibiteurs de classe spécifique de protéases sur la protéase purifiée ont été étudiés (tableau 07). L'enzyme a été complètement inhibée par l'inhibiteur de la phénanthroline spécifique au métalloenzyme à 1 mM, ce qui signifie que l'enzyme purifiée est une métalloprotéase. L'enzyme n'a pas été affectée par des inhibiteurs de sérine-protéase (PMSF et aprotinine), l'inhibiteur d'aspartique-protéase (pepstatine) et inhibiteur de la cystéine-protéase (iodoacetamide).

L'enzyme a été légèrement inhibée par l'agent chélatant EDTA (5 mM), avec une perte d'activité de 47%, ce qui indique l'importance des ions métalliques dans la stabilisation de l'enzyme. Ces résultats sont en accord avec plusieurs travaux montrant que la structure de certains protéases contient Ca^{+2} au niveau du site (s) active (s) et son retrait à partir de se site conduit à une réduction significative de la stabilité thermique (Vieille et Zeikus, 2001).

Tableau 07 : Effet des inhibiteurs sur l'activité de la protéase Lc.L6

Inhibiteurs	Concentration (mM)	Activité résiduelle (%)
Témoin	-	100
EDTA	5	53 ± 1,6
β-mercaptoethanol	5	100
Aprotinine	5	100
Phénantroline	1	0
Pepstatine	5	100
PMSF	5	97 ± 1,3
Iodoacetamide	5	100

L'enzyme purifiée a été pré-incubée avec divers inhibiteurs de l'enzyme pendant 30 min à 25°C et l'activité résiduelle a été déterminée à pH 7 et 55 ° C. L'activité enzymatique mesurée en l'absence de tout inhibiteur a été prise comme 100%.

III.3.4. Effet des ions métalliques sur la protéase

Les effets de quelques ions métalliques, à une concentration de 5 mM, sur l'activité de la protéase Lc.L16 ont été étudiés à pH 7,0 et à 55 °C en ajoutant des ions monovalents (Na^+ , K^+ et Cs^+) et des ions divalents (Ca^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2}) et de l'ion trivalent (Al^{+3}) au mélange réactionnel (tableau 08). L'activité enzymatique n'a pas été affectée par les ions (Al^{+3} , Mg^{+2} , Na^+ , K^+) et légèrement affectée par les ions monovalents (Ca^{+2} et Cs^+). Cependant, l'enzyme purifiée a été partiellement inhibée par Mn^{+2} , Fe^{+2} et Zn^{+2} et fortement influencée par le Cu^{+2} , ce qui suggère l'effet dénaturant d'ions de métaux lourds sur la protéase purifiée.

Tableau 08 : Effet de différents ions métalliques (5 mM) sur l'activité de la protéase Lc.L6

Ions Métalliques (5 mM)	Activité relative (%)
Témoin	100
Na^+	100
K^+	99,10 ± 2.5
Cs^+	96,12 ± 2.9
Ca^{+2}	96,00 ± 1.6
Zn^{+2}	65,00 ± 0.6
Cu^{+2}	55,00 ± 1.1
Mg^{+2}	100
Fe^{+2}	76,00 ± 2.9
Mn^{+2}	86,99 ± 1.2
Al^{+3}	100

L'activité de la protéase a été déterminée en incubant l'enzyme en présence de divers ions métalliques (5 mM) pendant 1 h à 55 °C et à pH 7.

Ces résultats sont en accords avec les travaux réalisés par Ohmiya et Sato, (1975) sur *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* et Shin *et al.*, (2004) sur *Lactobacillus casei* subsp. *casei* LLG.

III. Obtention et caractérisation des peptides antimicrobiens

L'hydrolyse enzymatique est l'un des techniques la plus rapide, la plus sûre et la plus facile à contrôler pour la production de peptides bioactifs (Singh *et al.*, 2014 ; Zarei *et al.*, 2014 ; Korhonen, 2009). Un grand nombre d'études ont démontré que l'hydrolyse des protéines du lait par les enzymes digestives peut produire des peptides biologiquement actifs (Korhonen et Pihlanto, 2006).

Les enzymes les plus importantes sont la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine qui ont montré leurs capacités de libérer un certain nombre des peptides antihypertensives, des opioïdes, immunomodulateurs et antibactériens à la fois à partir des protéines de lactosérum, α -lactalbumine, β -lactoglobuline et glycomacropeptide (GMP) et de différents types de caséines (α_s , β et κ caséine) (Meisel et FitzGerald, 2003 ; Yamamoto *et al.*, 2003; FitzGerald *et al.*, 2004 ; Gobbetti *et al.*, 2004, 2007).

L'aptitude des bactéries lactiques à produire des enzymes protéolytiques, les rendent des producteurs potentiels de peptides bioactifs, qui peuvent être libérés lors de la fabrication des produits fermentés. Plusieurs bactéries lactiques ont été largement rapportées dans la littérature comme ayant un système protéolytique efficace pour hydrolyser des protéines et la libération des peptides bioactifs, y compris *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* and *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011 ; Gobbetti *et al.*, 2004 ; Korhonen et Pihlanto-Leppälä, 2004 ; Matar *et al.*, 2003 ; Gobbetti *et al.*, 2002).

III.1. Comportement de la caséine bovine à la protéolyse

III.1.1. Hydrolyse pepsique (protéase de référence)

L'hydrolyse a été menée sur une solution de caséine bovine à 5% (p/v), ajustée à pH 2,5 et maintenue à 37°C, afin de déterminer les meilleures conditions permettant l'obtention des peptides antimicrobiens par hydrolyse pepsique. Des prélèvements d'une partie d'hydrolysats sont effectués à des temps réguliers et l'activité antimicrobienne est recherchée.

Le rapport enzyme sur substrat (E/S) appliqué pour la cinétique d'hydrolyse pepsique est choisi suite à l'examen des profils HPLC des hydrolysats obtenus en appliquant différents rapports E/S. Le rapport à maintenir correspond à la plus faible quantité en enzyme pour laquelle il y a disparition de la quasi totalité du substrat au bout de 24 h d'hydrolyse (figure

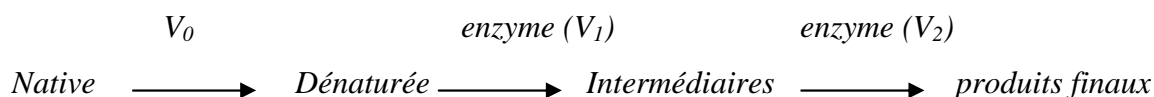
33). Au delà du rapport E/S= 1/100, pour des rapports plus grands (1/50, 1/20, 1/10), la quantité de substrat résiduelle est presque identique. Ainsi, le rapport maintenu était de E/S = 1/100.

En outre, afin de suivre l'évolution de l'hydrolyse et étudier le mécanisme d'action de la pepsine sur la caséine bovine, les échantillons d'hydrolysats prélevés sont analysés en RP-HPLC selon les conditions décrites précédemment. La figure 34 montre les chromatogrammes de l'hydrolyse pepsique de la caséine bovine en fonction du temps d'hydrolyse obtenu pour un rapport E/S de 1/100.

L'examen des profils obtenus indique l'apparition dès le début de l'hydrolyse (2,5min) de plusieurs fragments de grande taille, avec des temps d'éluion proches de ceux du substrat initial. Au fur et à mesure de l'évolution de l'hydrolyse, le taux de ces fragments diminue en faveur de celui des peptides de faible taille, qui apparaissent en faible quantité au début des chromatogrammes et continuent d'augmenter de concentration au cours de l'hydrolyse. Cela suggère que la pepsine agit sur la caséine selon un mécanisme dit «one by one» et qui caractérise les réactions enzymatiques où la protéine est dégradée immédiatement en peptides de grandes tailles.

Ce mécanisme a été proposé pour la première fois par Linderstrom-lang, en 1952, pour décrire l'action de la pepsine sur l'hémoglobine à son état globulaire native.

Lors de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine native, la réaction de dénaturation constitue l'étape limitante. La protéolyse procède donc à une vitesse déterminée par une vitesse initiale V_0 . Aucune quantité appréciable d'intermédiaires n'est présente et le mélange se compose essentiellement de la protéine native et des produits finaux. La pepsine hydrolyserait donc l'hémoglobine native par un mécanisme appelé « one by one ».



Par contre, lorsque la structure globulaire de l'hémoglobine bovine est préalablement dénaturée, l'action de la pepsine suit un mécanisme appelé « zipper » par Linderstrom-lang.

Les vitesses V_1 et V_2 constituent alors, au moins initialement, l'étape limitante. En début de protéolyse, la pepsine coupe l'hémoglobine bovine dénaturée en très gros peptides qui sont par la suite progressivement transformés en des peptides de plus petite taille. Mécanisme qui suppose une conversion rapide de la protéine en des produits de dégradation intermédiaires et consiste en un clivage progressif (par étapes) des intermédiaires.

Ce mécanisme suppose une conversion rapide de la protéine en produits de dégradation intermédiaires suivie par un clivage progressif (par étapes) des intermédiaires formés en peptides de plus petite taille.

Cependant, dans le cas de l'action de la pepsine sur la caséine, la disparition progressive du substrat et l'apparition également de peptides intermédiaires dès le début de l'hydrolyse est caractéristique du mécanisme one by one. En outre, l'apparition de peptides intermédiaires au début de l'hydrolyse, en parallèle à la dégradation progressive du substrat, est montrée sur le gel d'électrophorèse en SDS-PAGE (à 15% de polyacrylamide) (figure 34). Ce mécanisme peut être expliqué, pour la caséine, par sa structure native non globulaire et ouverte due principalement à la présence de plusieurs résidus prolines qui interrompent la structure secondaire et entraîne ainsi la formation d'une structure tertiaire ouverte avec une flexibilité conformationnelle plus grande que celle des protéines globulaires (Guo *et al.*, 1995). Cela offre une abondance des liaisons accessibles à l'enzyme qui favorise une action plus rapide de la pepsine.

Toutefois, la présence de certaines zones hydrophobes dans les chaînes peptidiques induit des interactions entre ces dernières qui sont à l'origine d'obstacle stérique à l'action de la protéase et l'inaccessibilité de certains sites d'action. Cet effet est connu par le masquage des sites d'action et qui représente un facteur limitant de la protéolyse. En effet, certains auteurs ont étudié la possibilité de la présence d'une étape de démasquage de ces sites, qui précède l'étape d'hydrolyse et qui est initiée par la scission de certaines chaînes peptidiques principales dont la conformation compacte est initialement stabilisée par des interactions entre les régions hydrophobes des chaînes peptidiques (Vorobev *et al.*, 2009 ; 2011).

En outre, selon Qi *et al.*, (2007) la caséine en solution se présente dans un état d'équilibre entre monomères et agrégats avec un ratio de 2,5 : 2,0. Lors de l'hydrolyse pepsique à pH 2,0, notamment au début de l'hydrolyse (les premières 30 minutes), ces auteurs ont remarqué une diminution de la concentration de ces agrégats mais une augmentation de

leur taille et une réduction dans la répulsion intermoléculaire. Ce qui suggère la formation de nouvelles interactions hydrophobes suite à une hydrolyse limitée.

Comme indiqué ci-dessus, le mécanisme réactionnel, pour le même couple enzyme-substrat, peut passer du mécanisme « one by one » au mécanisme « zipper » en modifiant la structure native de la protéine par l'emploi d'agents dissociant et dont le choix dépend de la nature des interactions intervenants dans la structure tertiaire de la protéine (l'urée pour les liaisons hydrogènes, SDS pour les interactions hydrophobes...). Cela permet d'orienter l'hydrolyse dans un sens favorable pour l'obtention de peptides d'intérêt qui peuvent être des peptides intermédiaires ou bien des produits finaux. Le mécanisme zipper est favorable pour l'obtention de peptides intermédiaires alors que le mécanisme « one by one » donne directement des peptides finaux. En outre la production d'un peptide donné peut être plus importante par un mécanisme par rapport à l'autre (Choisnard *et al.*, 2002 ; Daoud *et al.*, 2005).

Par ailleurs, l'évolution de l'hydrolyse pepsique de la caséine a été suivie par mesure du degré d'hydrolyse (DH) par la méthode OPA et qui exprime le taux de liaisons peptidiques rompues par rapport au nombre total des liaisons. La figure 35 montre l'évolution du DH au bout de 6H d'hydrolyse.

Le suivie de l'évolution du DH renseigne sur la vitesse avec laquelle l'enzyme dégrade le substrat. En effet, le DH passe de 1,64 % à 2,5 min d'hydrolyse à 5,79 % à 6 h d'hydrolyse. Toutefois, nous avons noté une vitesse moyenne d'hydrolyse (exprimée par la variation du DH en fonction du temps) de 0,15 % par minute durant la première heure d'hydrolyse. A partir de ce point, la vitesse d'hydrolyse tend à s'annuler et le DH atteint un taux maximal qui tend vers une valeur constante. En effet, jusqu'à 6 h d'hydrolyse, la mesure du DH donne des valeurs très rapprochées avec des différences non significatives (valeurs comprises dans la même intervalle d'écart type).

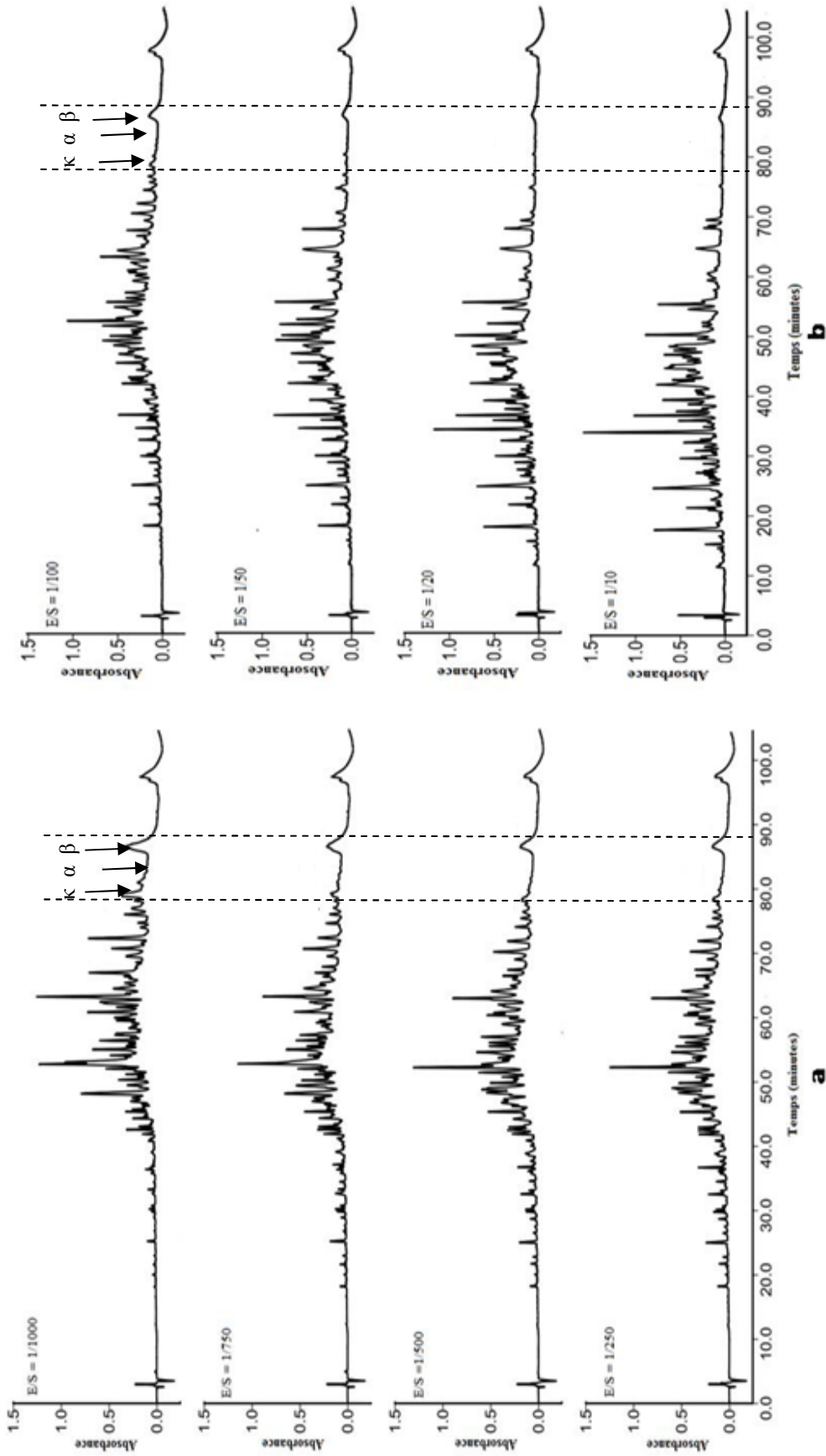
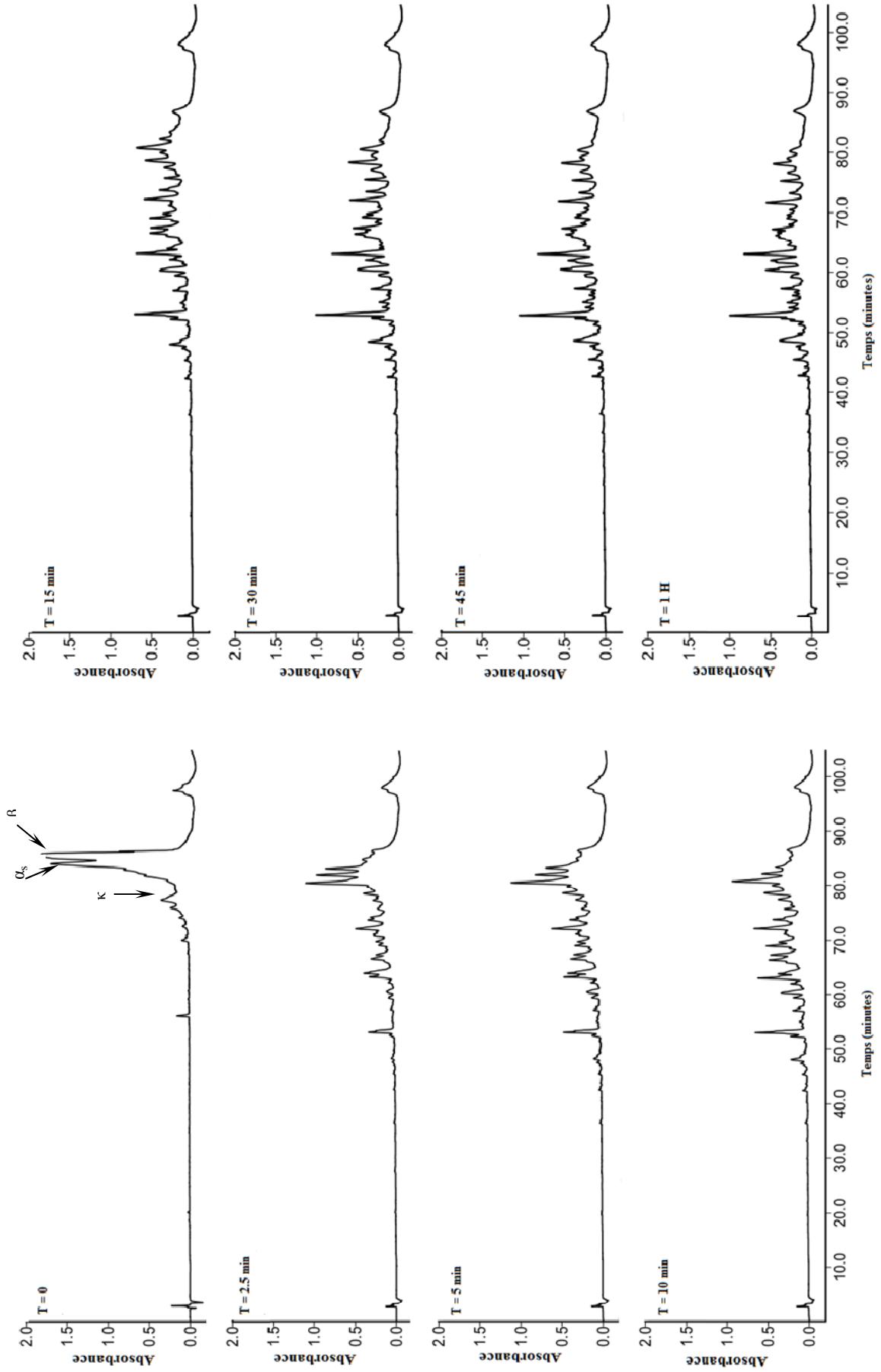


Figure 32. Profils HPLC (a et b) des hydrolysats de 24 H de la caséine bovine obtenus à différents rapports (E/S) par la pepsine à pH 2,5 et à 37°C.



b

a

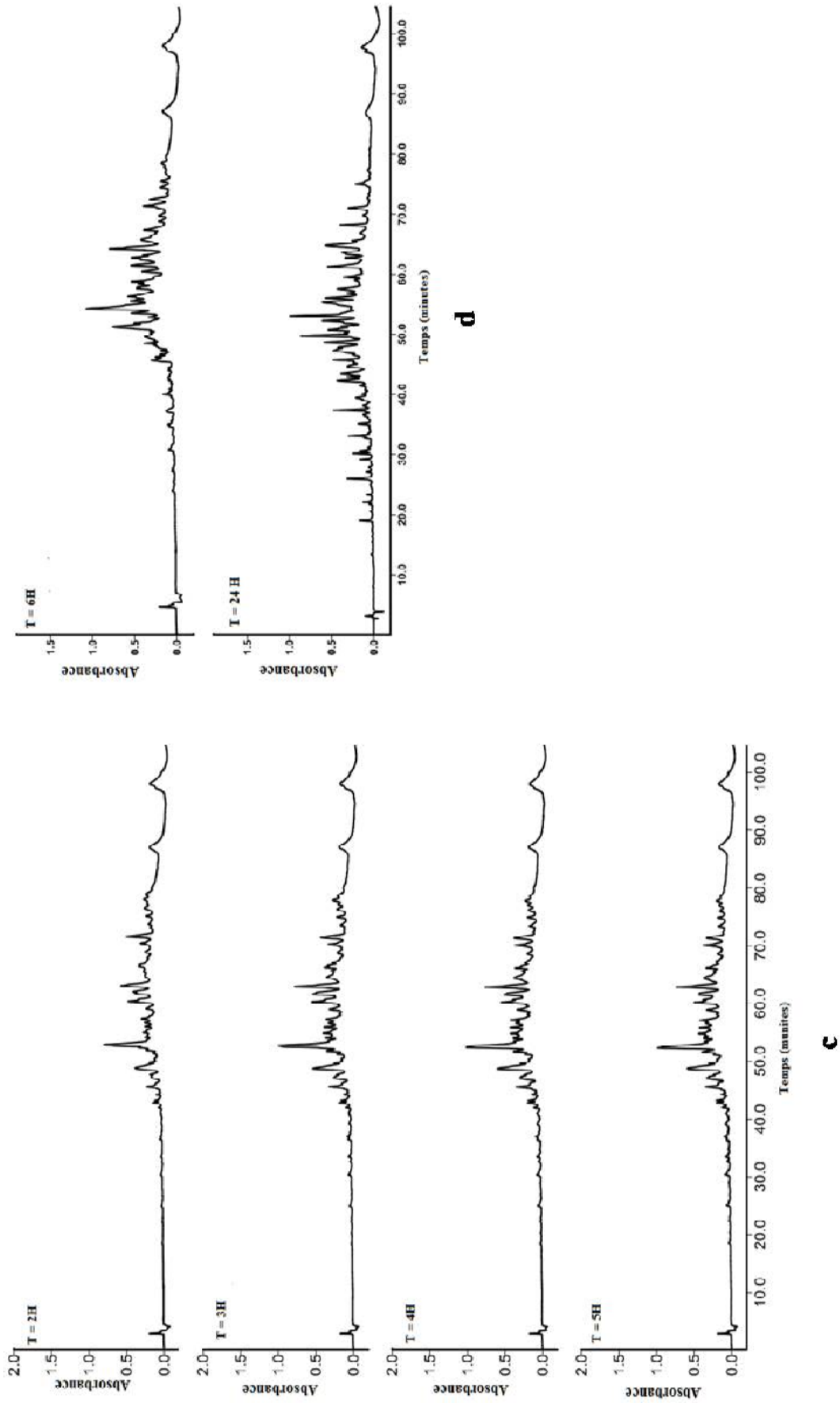


Figure 33. Profil HPLC à 215 nm (a, b, c et d) de la cinétique d'hydrolyse pepsique de la caséine bovine à 5 % (p/v), à pH 2,5 et à 37°C, E/S = 1/100.

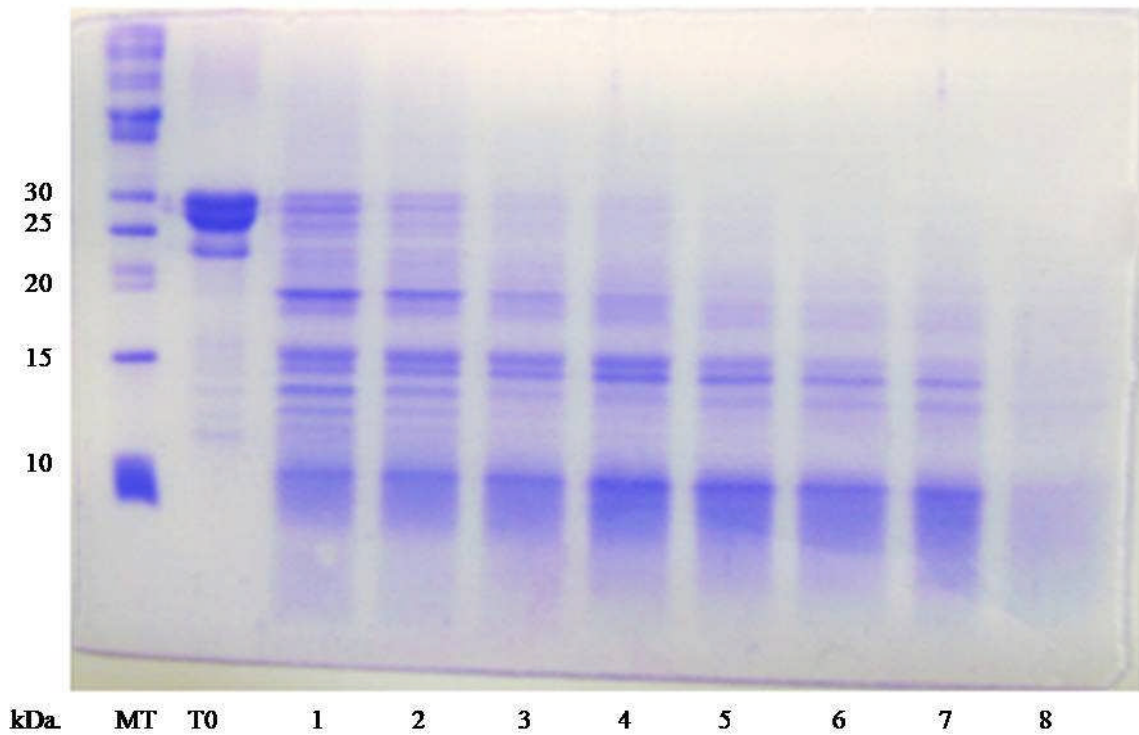


Figure 34 : Profil électrophorétique sur SDS-PAGE à 15% de la cinétique d'hydrolyse pepsique de la caséine bovine (E/S =1/100). (MT : marqueur de taille, T0 : 0 min, 1 : 2,5min, 2 : 5 min, 3 : 10 min, 4 : 15 min, 5 : 30 min, 6 : 45 min, 7 :1 H, 8 :2 H).

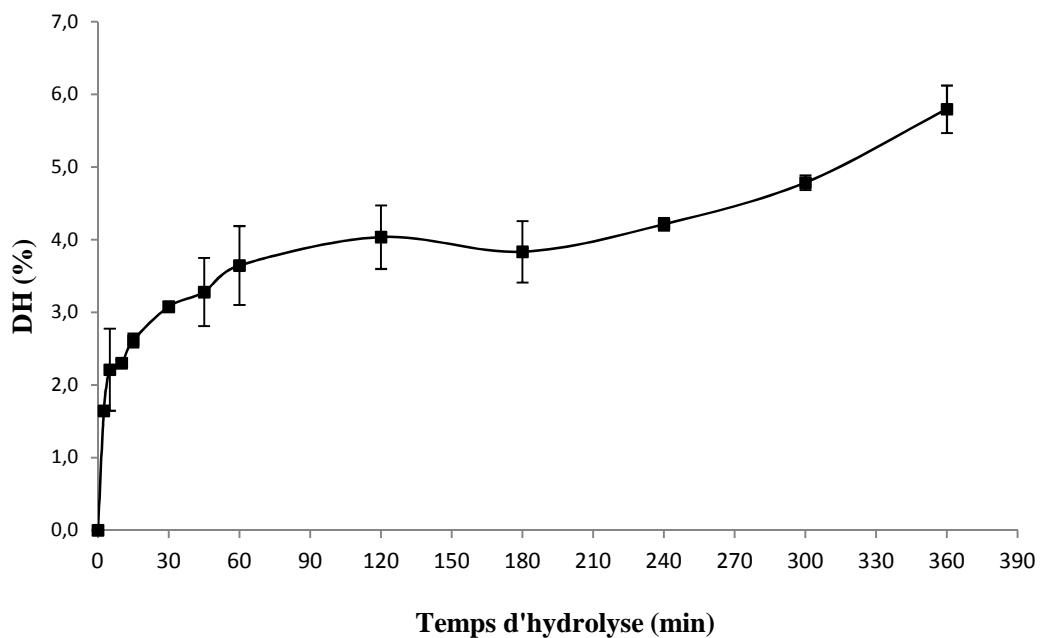


Figure 35 : Evolution, en fonction du temps, du degré d'hydrolyse (DH) de la caséine bovine sous l'action de la pepsine (E/S=1/100).

III.1.2. Hydrolyse par la protéase purifiée de Lc.L6

L'hydrolyse a été réalisée dans les conditions optimales d'activité de la protéase purifiée Lc.L6, dans une solution de caséine bovine à 5% (p/v) à pH 7 et une température de 55°C. Des prélèvements de 50 mL d'hydrolysats ont été collectés à des temps réguliers.

Comme indiqué précédemment, le choix du rapport est basé sur la disparition totale du substrat au bout de 20 h (figure 36). Pour cela, nous avons appliqué différents rapports (E/S) 1/20, 1/10, 1/5 (p/p). Ainsi, le rapport choisi était de $E/S = 1/5$.

Généralement, les peptides antimicrobiens sont constitués d'un nombre plus au moins important d'acides aminés, ce qui leur permet d'adopter une structure linéaire en hélice α ou une structure circulaire organisée en feuillets β (Epanand et Vogel, 1999).

Dans le but de déterminer les conditions idéales permettant l'obtention de peptides antimicrobiens, de suivre l'évolution de l'hydrolyse et d'analyser le mécanisme d'action de la protéase purifiée sur la caséine bovine, chaque échantillon d'hydrolysats prélevé (dans les conditions précédemment décrites) à des temps réguliers a été analysé par CLHP-PI.

La figure 37 illustre les chromatogrammes de l'hydrolyse protéasique de la caséine bovine en fonction du temps d'hydrolyse obtenu pour un rapport E/S égale à 1/5. L'hydrolyse de la caséine se déroule bien selon un mécanisme du type « one by one » identique à celui de la pepsine. C'est-à-dire que la protéase de Lc.L6 libère des peptides intermédiaires au début de l'hydrolyse en parallèle à la dégradation progressive du substrat, qui donnent à leur tour des peptides finaux ceci entre 1h et 6 h du temps d'éluion. La quantité relative des peptides finaux augmente au fur et à mesure du temps d'incubation pour atteindre son maximum après 24h d'hydrolyse. La dégradation progressive de la caséine bovine par la protéase purifiée est observée, également, sur les profils électrophorétiques sur SDS-PAGE obtenus pour la même cinétique (figure 38).

Sous l'action de la protéase purifiée, le DH passe de 0,5 % à 2,5 min d'hydrolyse à 4,30 % à 5 h d'hydrolyse (figure 39) avec une vitesse moyenne (exprimée par la variation du DH en fonction du temps) de 0,06 % par minute durant les 30 premières minutes d'hydrolyse. Par la suite la vitesse moyenne diminue pour atteindre une valeur de 0,005 %/min entre 60 min et 3 h d'hydrolyse. A partir de ce point, la vitesse d'hydrolyse tend à augmenter de nouveau pour atteindre 0,015%.

En outre, par comparaison aux travaux réalisés par Dubois-Delval *et al.*, (2006) sur le modèle pepsine/l'hémoglobine pour l'obtention des peptides antimicrobiens, la vitesse d'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine est beaucoup plus importante comparée à celle de la caséine bovine. La disparition totale du substrat dans le cas de l'hémoglobine a été observée après 10 min d'incubation pour un degré d'hydrolyse de 5%. Par contre, pour la caséine bovine l'hydrolyse totale s'effectue après 24 h d'incubation avec la pepsine et la protéase purifiée.

Par ailleurs, la nature des peptides issus de la protéolyse est différente pour la protéase purifiée comparée à celle de la pepsine. Les peptides hydrophobes se concentrent plus entre le temps d'éluion 40 et 70 min dans le cas de la pepsine. Par contre, pour la protéase purifiée, en plus des peptides hydrophobes. On note l'apparition des peptides hydrophiles qui est de plus en plus remarquable dès 20 min d'hydrolyse jusqu'à la disparition totale du substrat. Ce résultat a été rapporté par Morales *et al.*, (2001) et Ki Chang *et al.*, (2014).

En effet, les protéases de la paroi cellulaire des lactocoques (PrtP_I et PrtP_{III}) sont classées selon leurs capacités d'hydrolyser les différents types de caséines (Visser *et al.*, 1986 ; Reid *et al.*, 1991 ; Reid *et al.*, 1994) . La Prt P_I clive préférentiellement la caséine β ensuite la caséine κ et caséine α 1, par contre pour la Prt P_{III} le clivage des différents types de caséines s'effectue d'une façon identique (Flambard *et al.*, 1998). Ainsi, des études par CLHP ont montré que le clivage de β caséine s'effectue sur des sites complètement différents pour les deux types de protéases (Reid *et al.*, 1994). Le profil peptidique dans ce cas différent selon le type de protéase. En effet, les protéases de la paroi cellulaire des lactocoques (PrtP_I et PrtP_{III}) sont classées selon leurs capacités d'hydrolyser les différents types de caséines (Visser *et al.*, 1986 ; Reid *et al.*, 1991 ; Reid *et al.*, 1994) . La Prt P_I clive préférentiellement la caséine β ensuite la caséine κ et caséine α 1, par contre pour la Prt P_{III} le clivage des différents types de caséines s'effectue d'une façon identique (Flambard *et al.*, 1998). Ainsi, des études par CLHP ont montré que pour les deux types de protéases le clivage de β caséine s'effectue sur des sites complètement différents (Reid *et al.*, 1994). Donc, en se basant sur ces résultats le profil peptidique peut être différent selon le type de protéase.

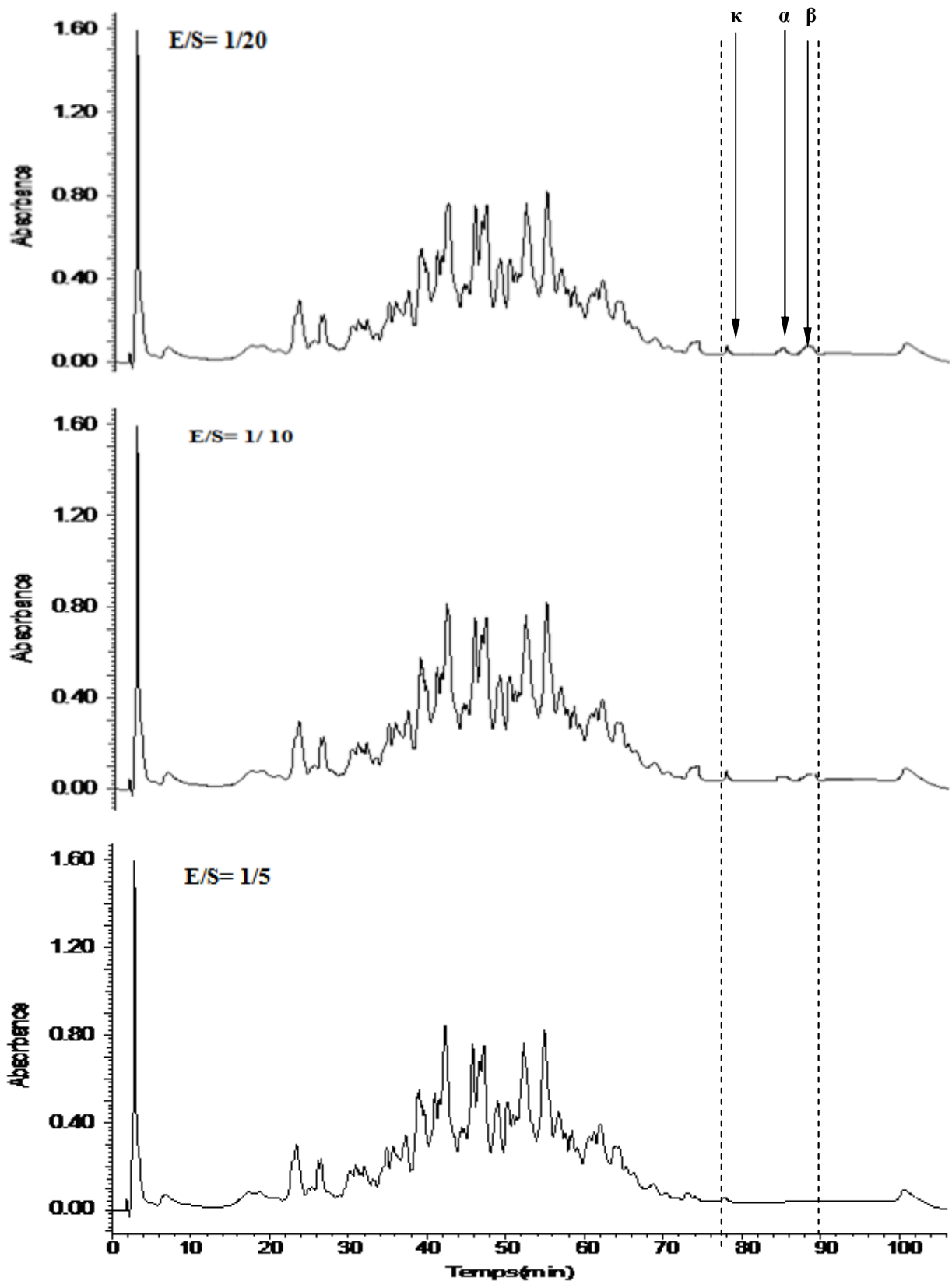
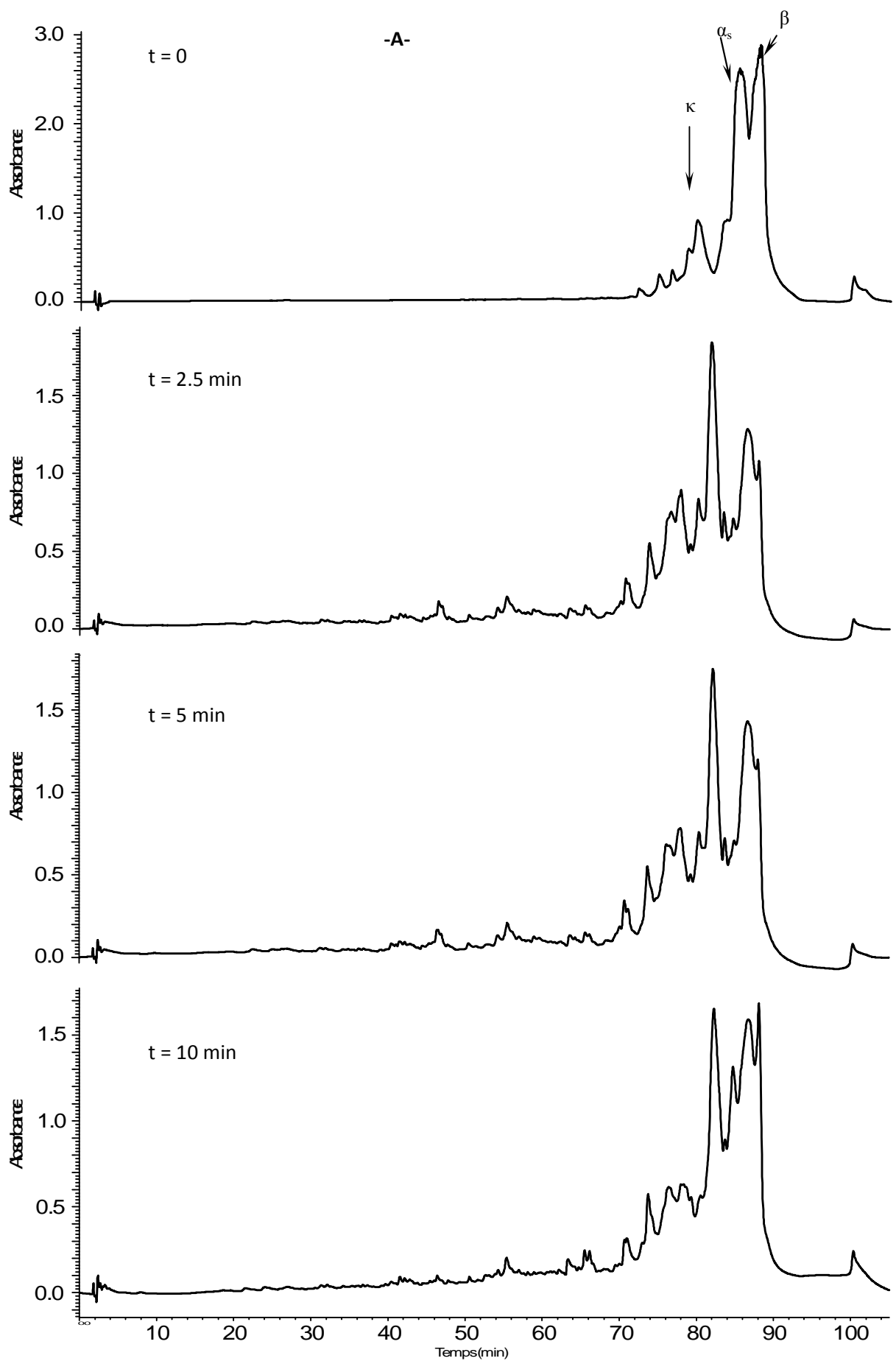
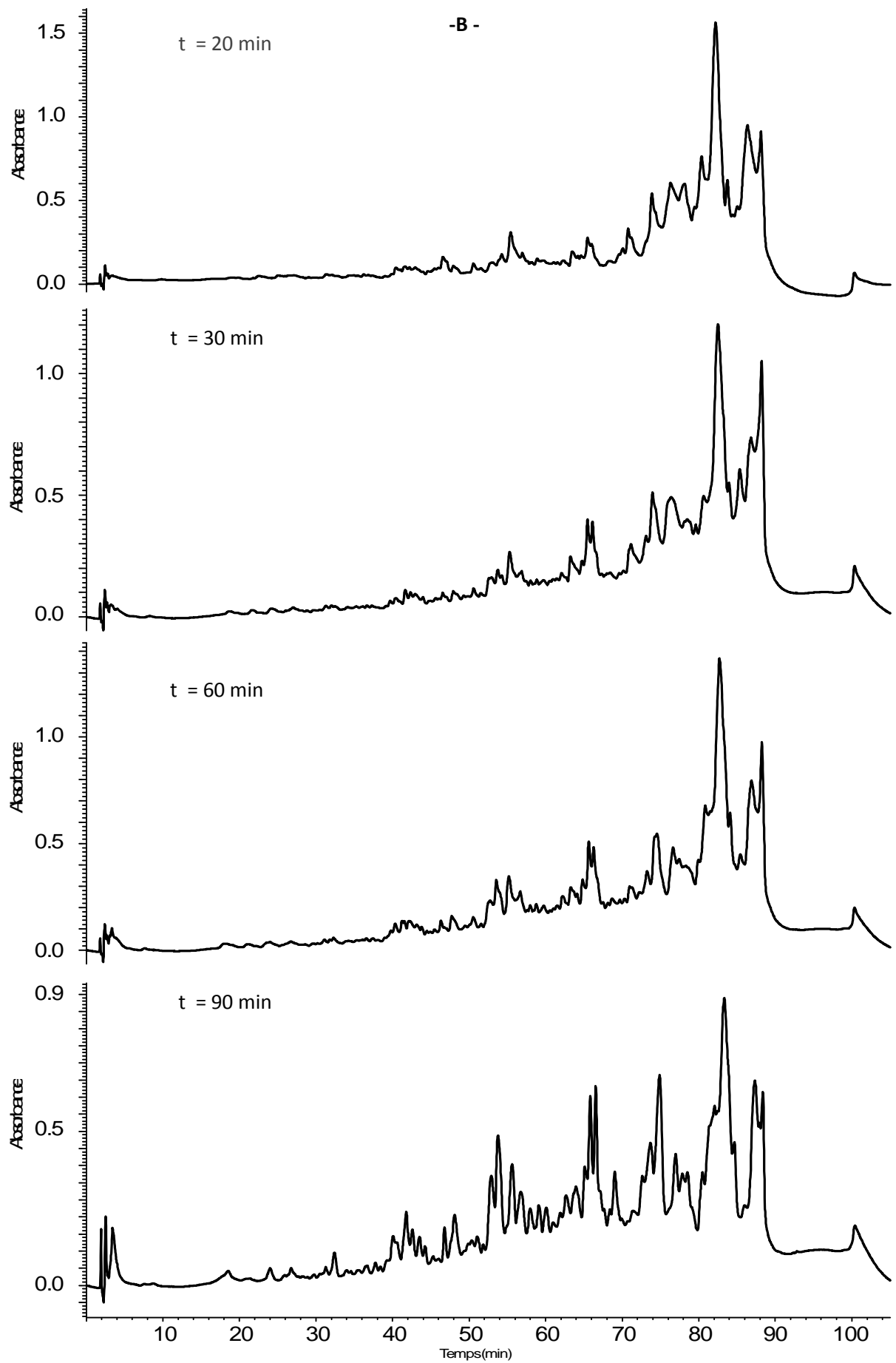
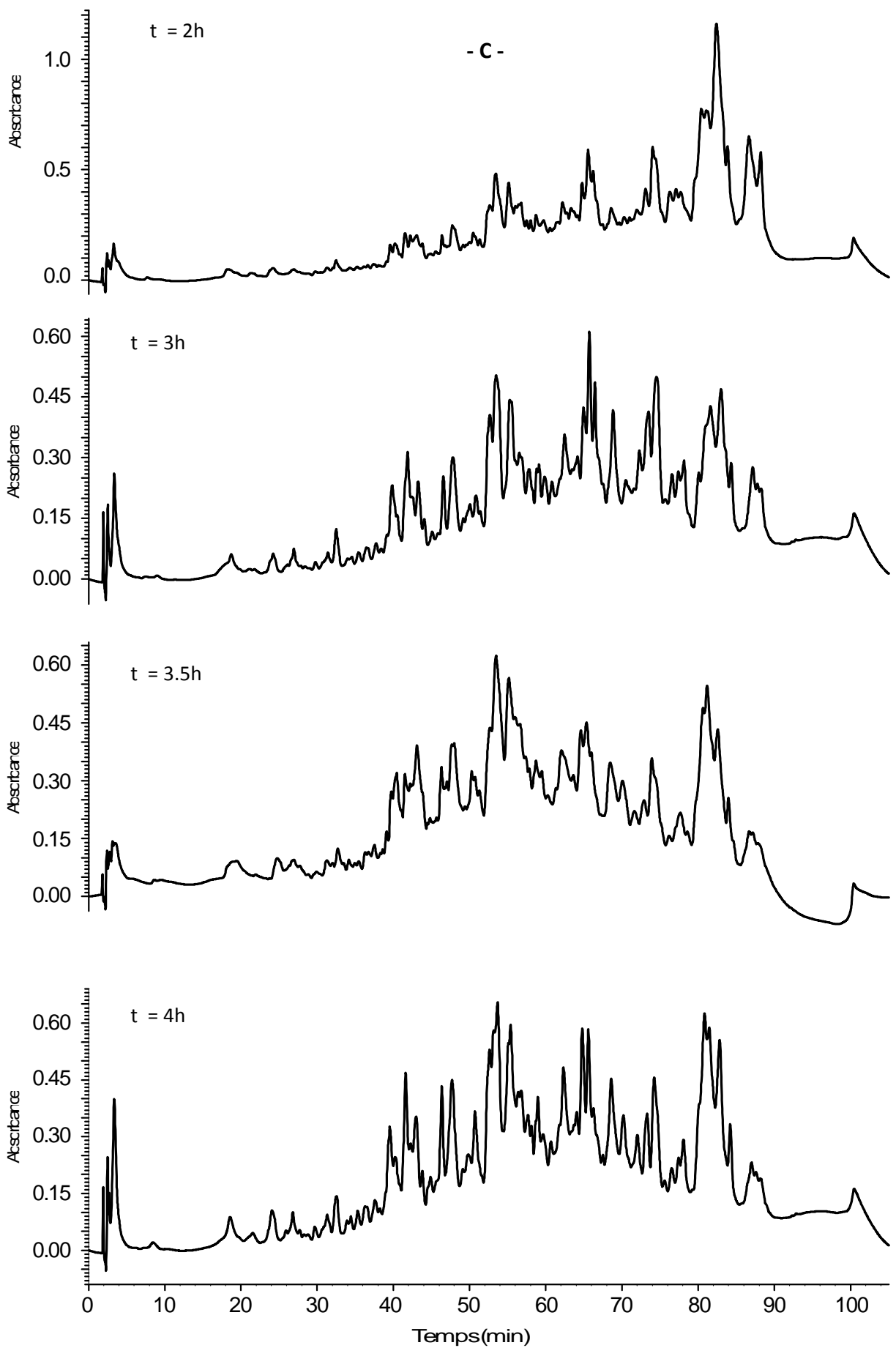
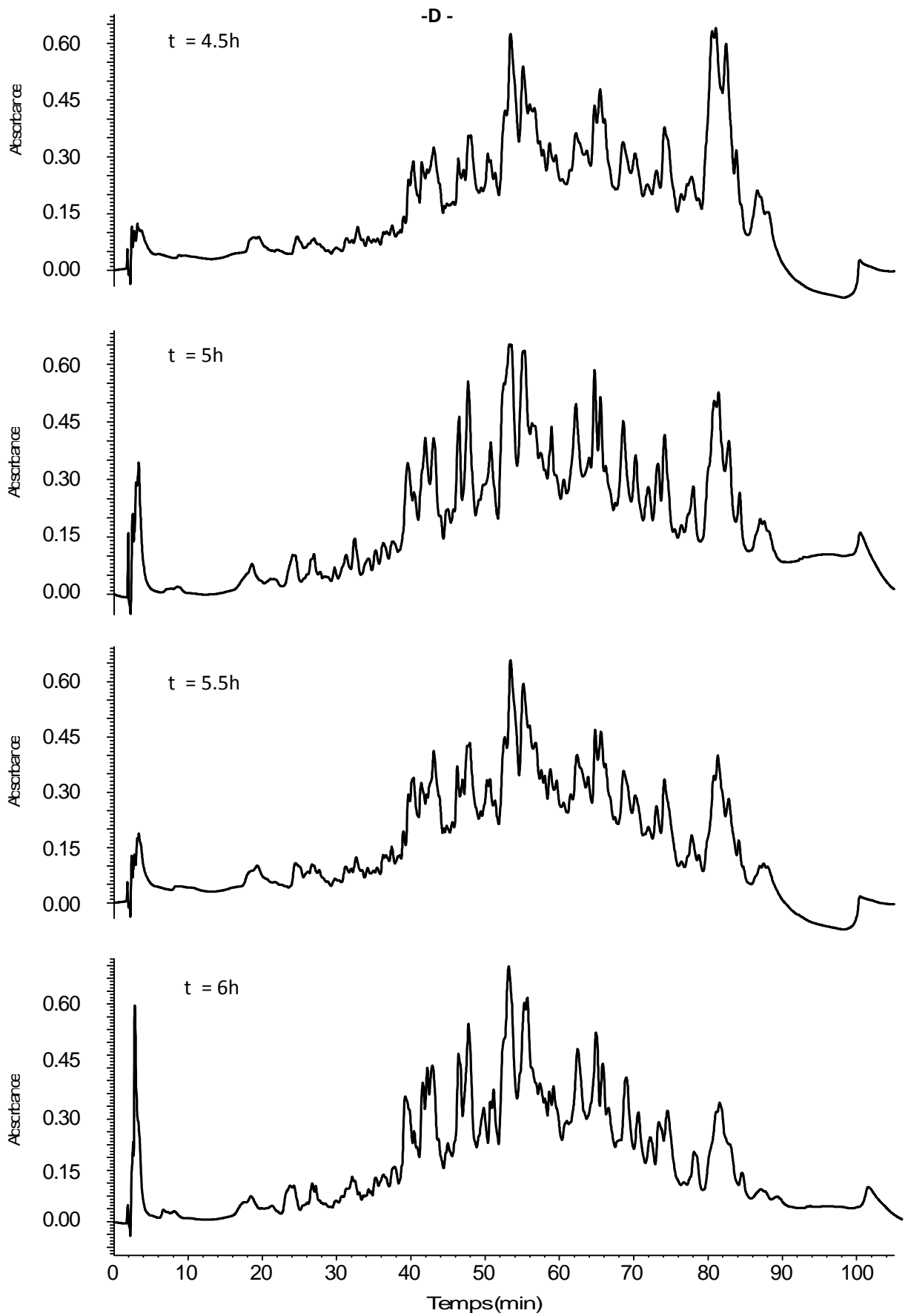


Figure 36 : Profil CLHP-PI des hydrolysats de 20 h de la caséine bovine obtenus à différents rapports (E/S) par la protéase purifiée de **Lc.L6** à pH 7 et à 55°C.









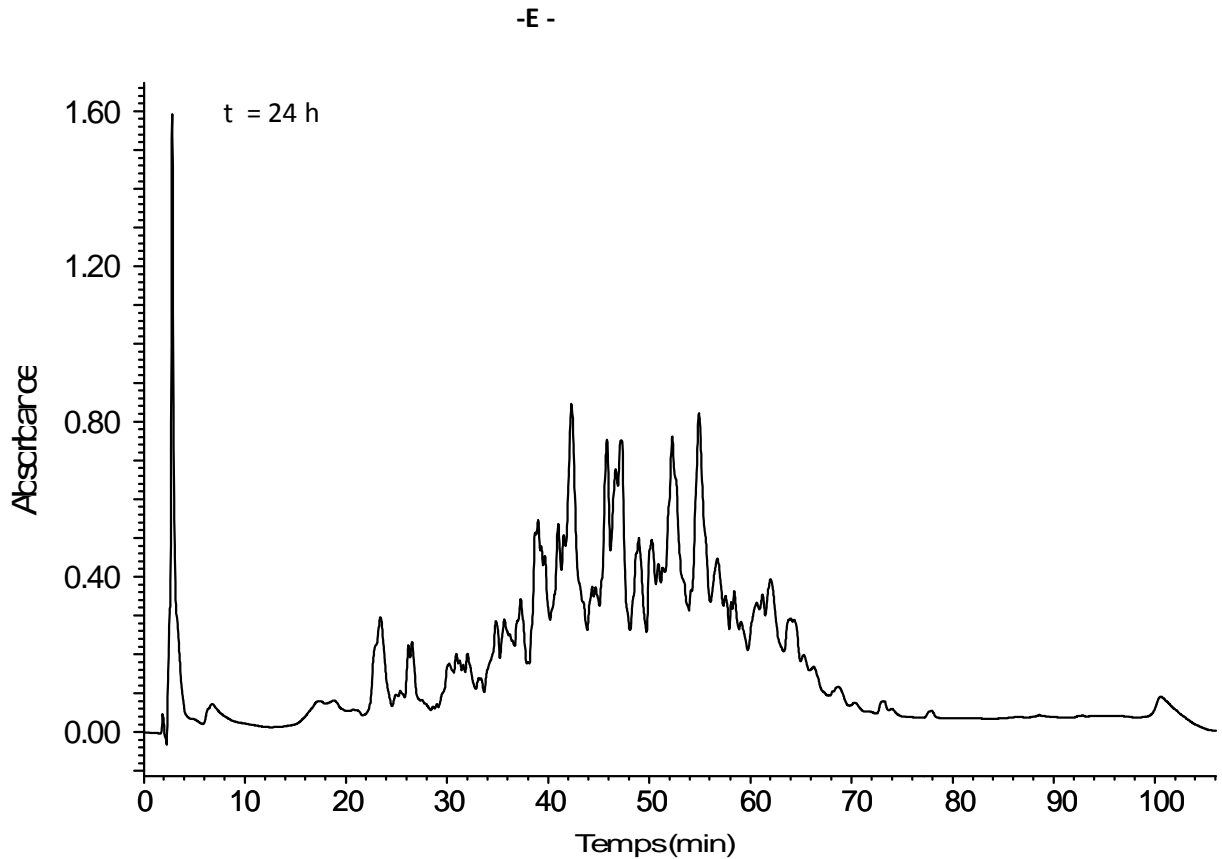


Figure 37 : Profil CLHP-PI (A, B, C, D et E) de la cinétique d'hydrolyse par protéase purifiée de **Lc.L6** de la caséine bovine à 5 % (p/v), à pH 7 et à 55°C, rapport E/S = 1/5 à 215nm.

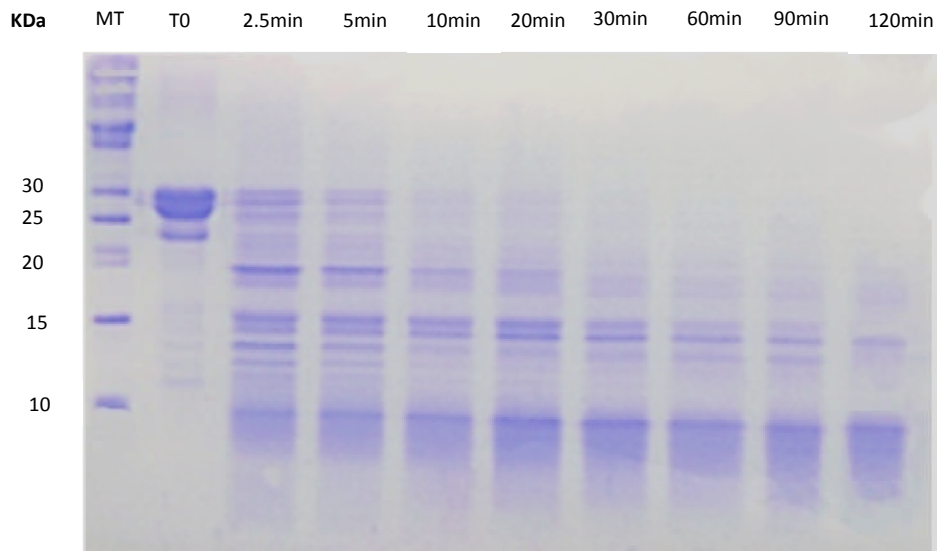


Figure 38: Profil électrophorétique sur SDS-PAGE à 15% de la cinétique d'hydrolyse de la caséine bovine par la protéase purifiée de **Lc.L6** (1/5 de rapport E/S).

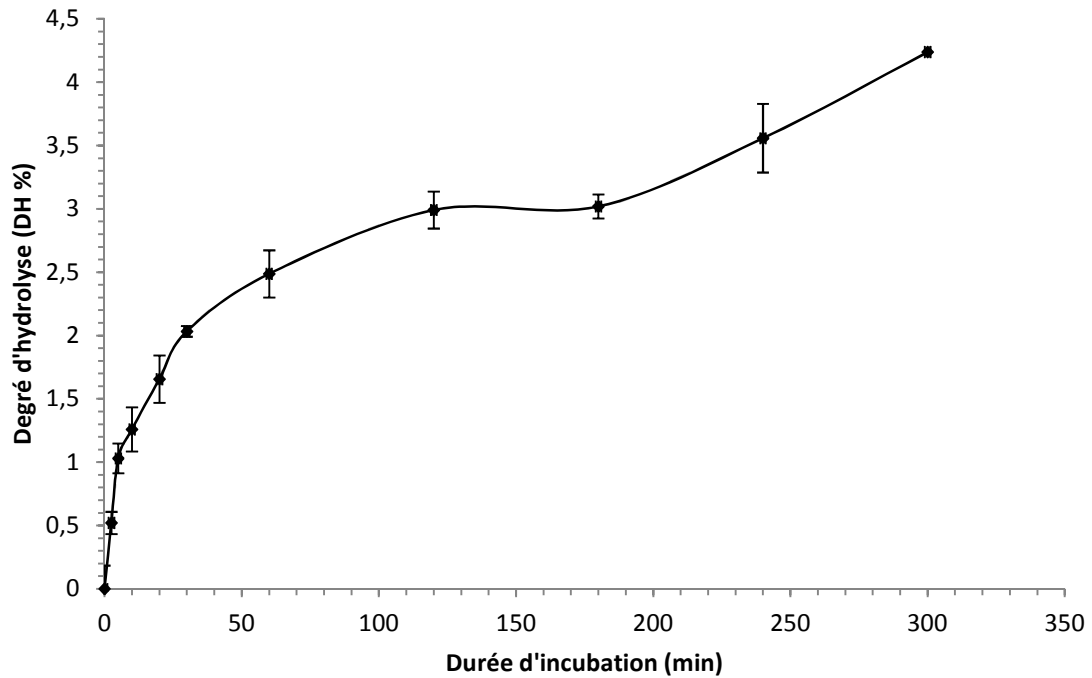


Figure 39: Evolution du degré d'hydrolyse (DH) de la caséine bovine sous l'action de la protéase purifiée de **Lc.L6** (1/5 de rapport E/S) en fonction du temps.

IV. Mise en évidence des peptides antimicrobiens à partir des hydrolysats de caséine bovine

IV.1. Cas de la protéase de référence (la pepsine)

L'activité antimicrobienne est recherchée dans les différents hydrolysats de caséine bovine préparés sous l'action de la pepsine. L'activité est mise en évidence selon la méthode de diffusion sur milieu gélosé. Les hydrolysats sont testés contre 5 souches à Gram-positif ; *Bacillus subtilis* **ATCC 6633**, *Listeria innocua* **LMG 11387**, *Listeria monocytogenes* **ATCC 3512**, *Staphylococcus aureus* **CIP 4.83**, *Bacillus cereus* et 3 souches à Gram-négatif : *Escherichia coli* **JM 109**, *Escherichia coli* **DH5 α** et *Escherichia coli* **CIP 54127**.

L'activité antimicrobienne a été observée pour les hydrolysats pepsiques de la caséine bovine. Les hydrolysats prélevés à différents intervalles de temps sont testés contre les souches cibles.

Plusieurs études indiquent la possibilité de générer des peptides antimicrobiens par hydrolyse pepsique de caséines bovines (Recio et Visser, 1999 ; Mc Cann *et al.*, 2006). Des zones d'inhibition nettes sont observées pour les hydrolysats obtenus à partir de 15 min d'hydrolyses. Ainsi, afin de pouvoir isoler les peptides actifs et ses précurseurs, l'analyse a été réalisée sur l'hydrolysats de 30 min qui a montré une activité antimicrobienne plus prononcée contre cinq souches testées (Figure 40). La séparation des peptides actifs a été effectuée par fractionnement de l'hydrolysats de 30 min sur CLHP-PI en colonne C18 préparative. Les fractions de 1 min d'intervalle ont été collectées et séchées afin de rechercher l'activité antimicrobienne. Trois fractions ont montré une activité contre *L. innocua*. et correspondent à des temps d'élution de 61, 66, et 69 min (Figure 41).

Tableau 09. Activité antibactérienne des hydrolysats peptiques de la caséine bovine, test d'activité antibactérienne réalisé selon la méthode de diffusion sur milieu solide

Hydrolysats	Souches cibles						
	<i>L. innocua</i> LMG 11387	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>L. monocytogène</i> ATCC 3512	<i>S. aureus</i> CIP 4.83	<i>E. coli</i> CIP 54127	<i>E. coli</i> JM109	<i>E. coli</i> DH5 α
T0	-	-	-	-	-	-	-
2.5 min	-	-	-	-	-	-	-
5 min	-	-	-	-	-	-	-
10 min	-	-	-	-	+	-	-
15 min	+	-	+	-	+	+	-
30 min	++	+	++	-	++	++	-
45 min	+	+	+	-	+	+	-
1 h	+	+	+	-	+	+	+
2 h	+	+	+	-	+	+	+
3 h	+	+	+	-	+	+	+
4 h	+	-	+	-	+	+	+
5 h	+	-	+	-	+	+	+
6 h	+	-	+	-	+	+	+
24 h	+	-	+	-	+	+	+

Note : ++ inhibition importante ; + : présence de zone d'inhibition ; - : absence de zone d'inhibition.

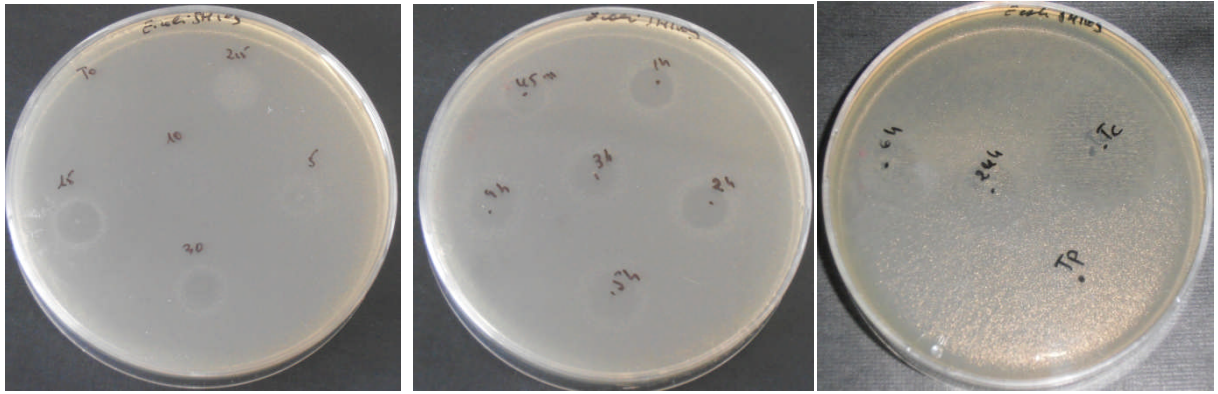


Figure 40. Zones d'inhibition obtenues sur la souche *E.coli* JM109 des hydrolysats pepsiques de la caséine bovine.

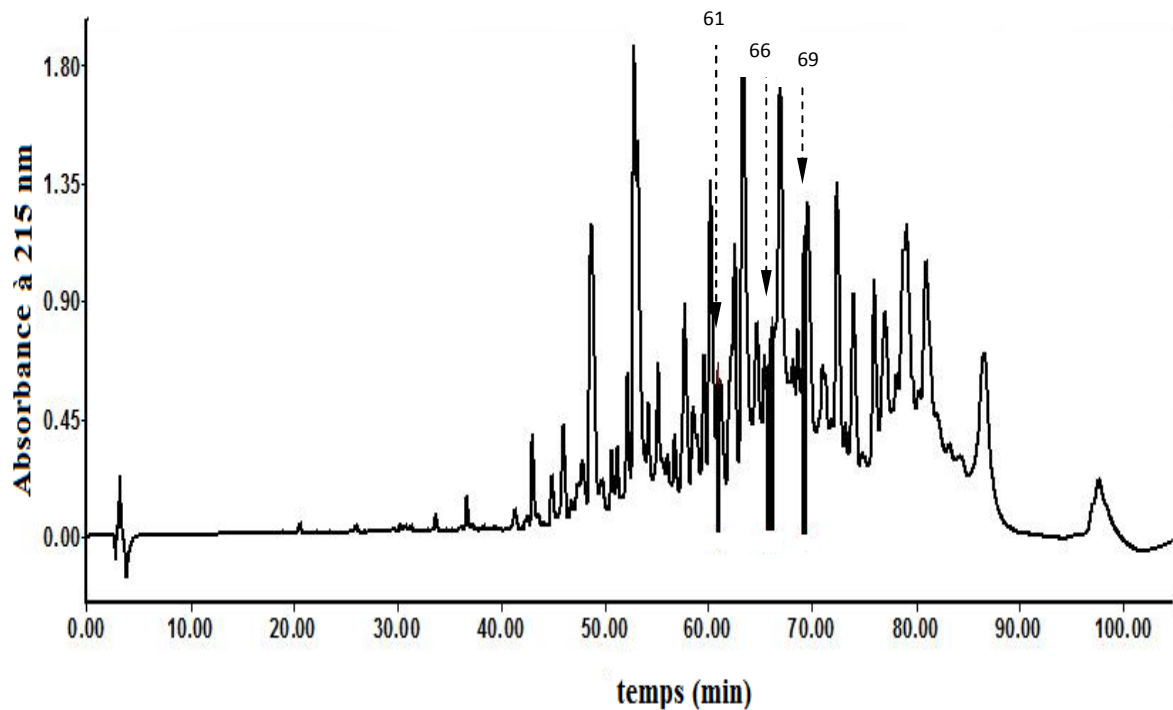


Figure 41. Profil HPLC de l'hydrolysate de caséine bovine obtenu à 30 min d'hydrolyse pepsique, (les fractions actives sont indiquées en noire).

IV.1.1 Séparation des peptides antimicrobiens à partir d'hydrolysate de la caséine bovine par précipitation sous l'effet de la force ionique et du pH

L'hydrolysate total renferme à côté des peptides actifs un grand nombre de peptides sans activité antimicrobienne. Ainsi, dans le but de séparer les peptides actifs de cet hydrolysate hétérogène, ces derniers sont précipités sous l'effet de la force ionique par addition de sel (NaCl) tout en maintenant le pH de l'hydrolysate traité dans la zone de neutralité. Cependant,

sous ces conditions différents peptides inactifs sont également précipités. De ce fait, une autre étape de resolubilisation à pH bas était nécessaire pour séparer les peptides actifs. Ces derniers sont récupérés après 1H d'agitation à 4°C par centrifugation à 10000 rpm. L'étude a été réalisée pour des taux en sel allant de 0,5 à 2 M. Les profils HPLC des préparations obtenues sont donnés par la figure 42. Les profils chromatographiques des solutions obtenues à différents taux de sel indiquent la présence de pics montrant des temps d'élution qui coïncident avec ceux des fractions actives déjà séparés et collectés sur l'hydrolysate total entre 60 et 69 min d'élution. Ces profils montrent la présence de trois fractions majoritaires avec des temps de d'élution de 61, 66 et 69 min respectivement. Toutefois, le taux de ces fractions varie en fonction de la force ionique appliquée notamment pour les fractions de 66 min et 69 min de temps d'élution. Afin d'identifier les peptides précipités, les différentes fractions d'un extrait obtenu à 2M de sel (numérotées de 1 à 18 sur le chromatogramme, figure 43) ont été collectées par CLHP-PI sur une C₁₈ préparative. L'activité antimicrobienne des fractions collectées a été déterminée en premier lieu sur *L. innocua*. Par la suite d'autres souches ont été testées sur les fractions qui ont montré des zones d'inhibition claires sur *L. innocua*. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 10. Toutes les fractions collectées ont été par la suite analysées par spectrométrie de masse.

La précipitation des peptides présents dans ces fractions est influencée également par le pH. En comparant les profils chromatographiques obtenus à différents pH (5 ; 3,5 ; 4,5 ; 5,5 ; 6,5 ; 7,5) de précipitation pour un taux de sel maintenu à 2 M, nous pouvons remarquer l'apparition progressive de ces derniers au fur et à mesure de l'augmentation du pH (Figure 44).

L'activité antimicrobienne des solutions obtenus est déterminée sur deux souches ; *L. innocua* et *E.coli JM109*. L'activité n'a pas été observée pour les solutions obtenues à pH 3,5 et 4,5. Alors qu'elle semble apparaitre progressivement à partir du pH 5,5 à pH 7,5 (Figure 45). Cela indique que la précipitation des peptides actifs se produit sous l'effet de la force ionique et à pH neutre alors qu'à des pH plus bas se sont d'autres peptides non actifs qui précipitent.

En outre, la récupération des peptides actifs après précipitation, selon la méthode appliquée, se fait par abaissement du pH à des valeurs inférieures à 2,0. Cela confirme que ces derniers sont plus solubles à pH bas qu'à des pH proches de la neutralité. Notamment, pour la fraction de 61 min et de 66 min d'élution pour lesquelles nous observons une apparition

progressive des fractions correspondantes, sur les profils HPLC, au fur et à mesure de l'augmentation du pH de précipitation. Cette apparition est accompagnée par une détection de l'activité antimicrobienne qui se traduit par des zones d'inhibition plus nette pour ces préparations (figure 45). Par ailleurs, que la solubilité de ces peptides antimicrobiens à des valeurs de pH bas est évoquée par Mc Cann *et al.*, (2005). Ces derniers indiquent que la centrifugation de l'hydrolysate brut de caséines à pH 3,0 permet d'obtenir une solution plus claire tout en maintenant l'activité antimicrobienne.

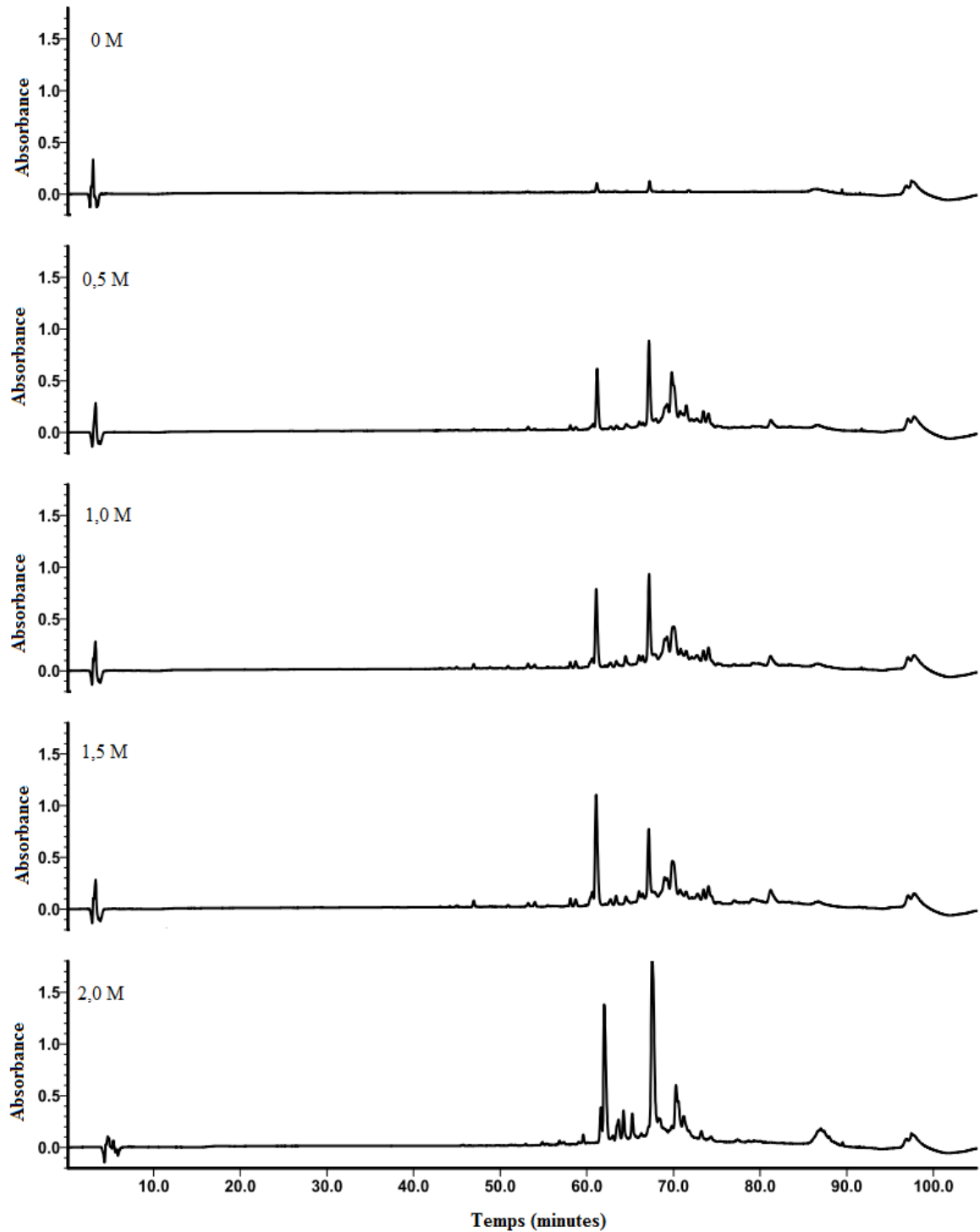


Figure 42. Profil HPLC des peptides antimicrobiens précipités à différentes forces ioniques exprimées en molarité de NaCl ajouté à l'hydrolysat, pH maintenu à 7,5.

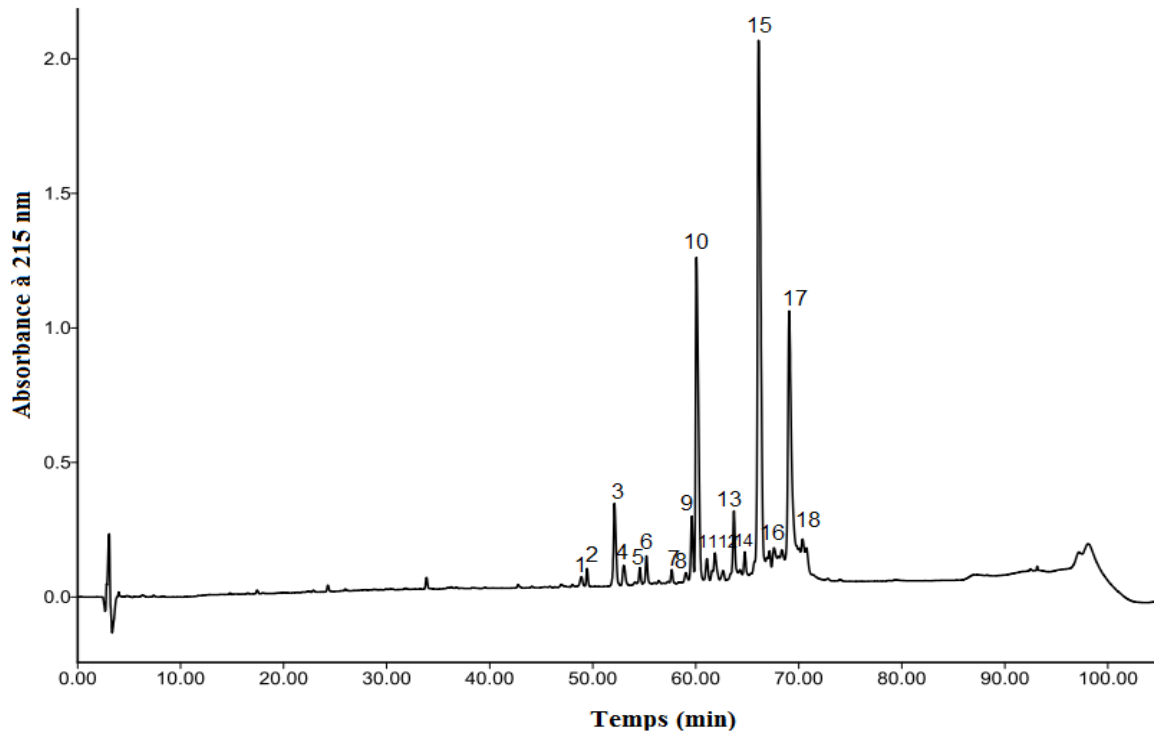


Figure 43. Profil CLHP de l'extrait peptidique issu de l'hydrolysate pepsique à 30min de la caséine bovine par précipitation à 2M de NaCl et à pH 7,5.

Tableau10. Activité antibactérienne des fractions peptidiques collectées par CLHP à partir de l'extrait peptidique

Fraction ^a	Diamètre d'inhibition (mm)			
	<i>L. innocua</i> LMG1138	<i>E.coli</i> JM109	<i>S.aureus</i> CIP 4,83	<i>B.subtilis</i> ATCC6633
Fraction 4	5	-	-	-
Fraction 10	5	5	-	-
Fraction 13	8	8	-	7
Fraction 14	10	8	-	7
Fraction 15	11	11	8	11
Fraction 17	11	11	8	11

Note : ^a fait référence aux fractions du profil HPLC dans la Figure. 21, - : absence de zone d'inhibition.

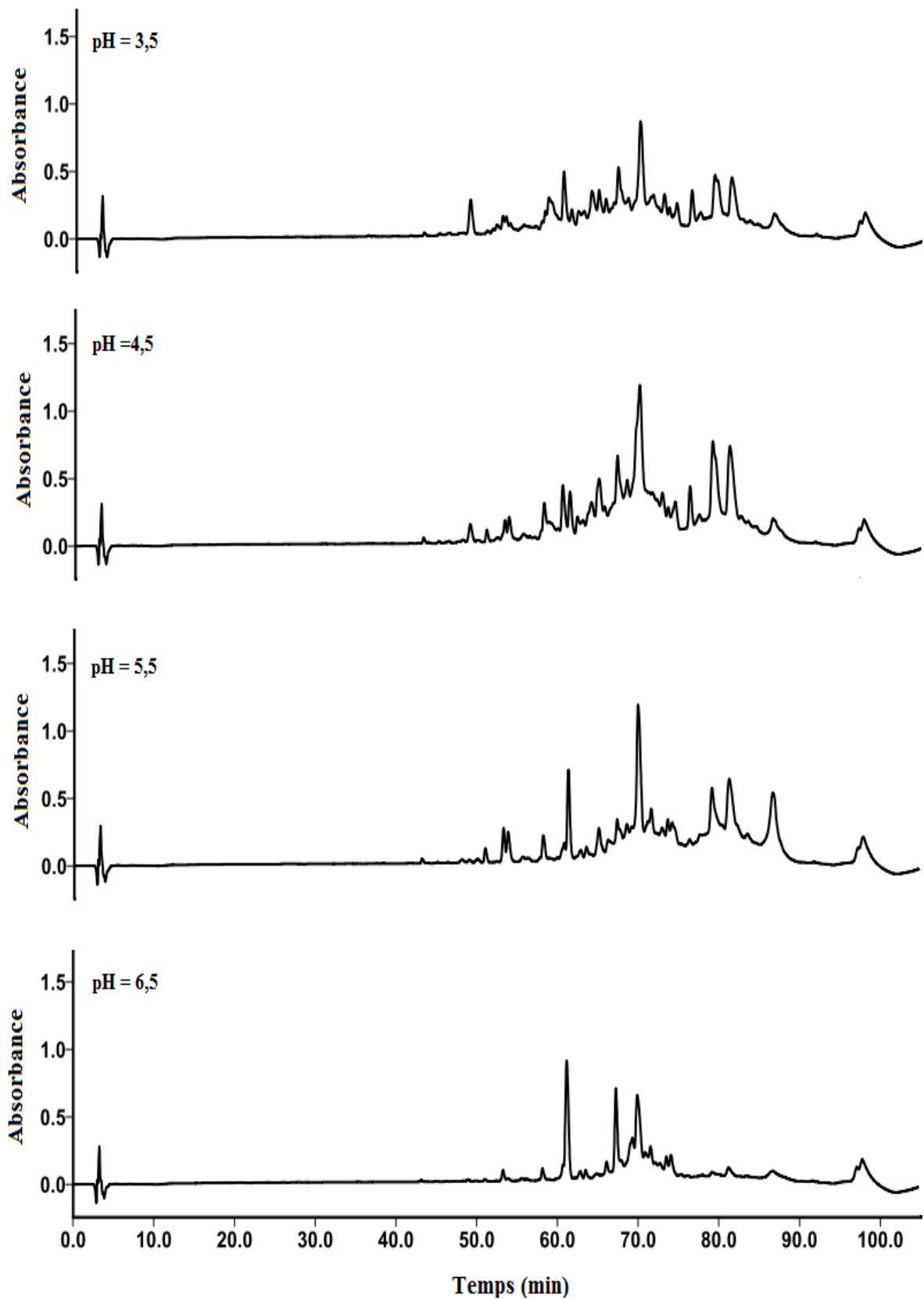


Figure 44. Profil CLHP des peptides antimicrobiens précipités à différents pH de l'hydrolysats peptique de la caséine bovine.

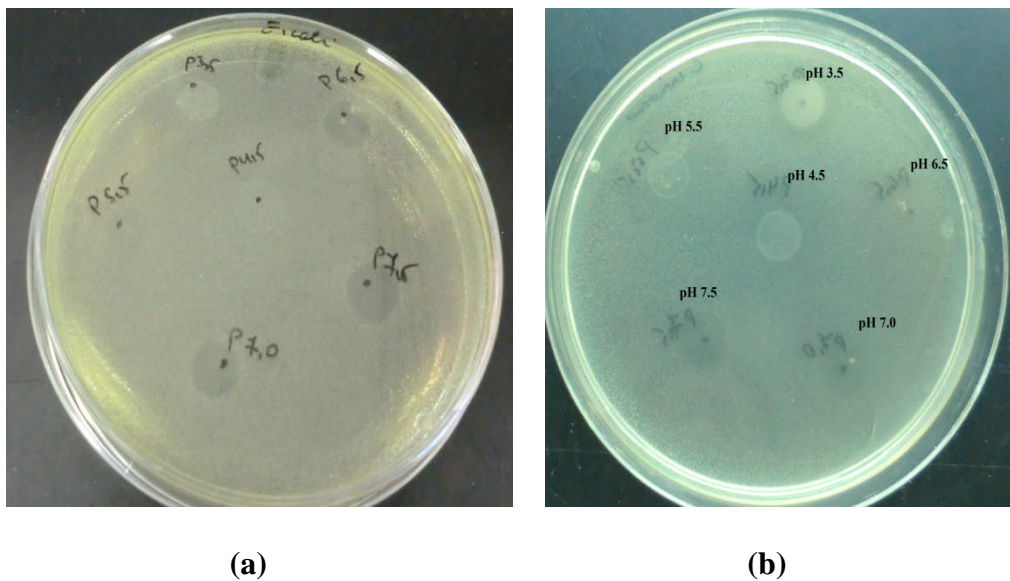


Figure 45. Photos montrant les zones d'inhibition observées sur *E.coli* **JM109** (a) et *L. innocua* (b) des solutions obtenues par précipitation à différents pH de l'hydrolysate peptique de la caséine bovine.

IV.1.2 Identification et caractérisation des peptides actifs issus de la caséine bovine par spectrométrie de masse

Les fractions peptidiques collectées sur l'extrait peptidique obtenu par précipitation ont été analysées en LC/MS et en MALDI-TOF. Les résultats obtenus, indiquent la présence de plusieurs peptides dans chaque fraction, excepté la fraction 15 qui contenait un seul peptide. Ainsi, ces fractions ont subi une purification supplémentaire sur CLHP-PI. Les sous fractions obtenues sont testées à nouveau afin d'identifier celles responsables de l'activité antimicrobienne et analysées en LC/MS et en MALDI-TOF.

L'identification des peptides est réalisée en comparant les masses obtenues en spectrométrie de masse à celles des peptides théoriquement générés sous l'action de la pepsine sur les différentes fractions de la caséine bovine. Cela est effectué en traitant les données sur le serveur **ExpASY** (de l'anglais Expert Protein Analysis System) de l'Institut suisse de bioinformatique (**SIB**) (www.expasy.org). Ce serveur donne accès à des bases de données scientifiques et des logiciels dans les différents domaines des sciences de la vie.

La recherche a été réalisée sur les différentes fractions de la caséine bovine en précisant les conditions de l'hydrolyse ($\text{pH} > 2,5$), le type de protéase utilisée (pepsine A) et que les masses traitées sont des mono-isotopiques. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 11.

L'ensemble des peptides actifs identifiés correspondent principalement à des fragments générés de l'hydrolyse de la caséine- α_{s2} et de la caséine- α_{s1} . L'analyse de masse en LC/MS indique que la fraction 15 est pure et renferme un seul peptide de masse moléculaire égale à 5254 Da (figure 46). La pureté de cette fraction est confirmée par l'analyse en MALDI-TOF (Figure 47 E). Ce peptide est identifié comme étant le fragment α_{s2} (164-207).

La fraction 4 renferme deux fragments majoritaires de masse moléculaire égale à 2012 et 2348 Da (Figure 47 A). Le premier correspond au peptide α_{s2} (164-179) reporté par Recio et Visser (1999). Le second correspond au résidu α_{s2} (148-166). L'activité antimicrobienne de la fraction 10-1 est due à la présence de deux peptides de masse égale à 3459 et 3115 Da., correspondant, respectivement, aux résidus (180-207) et (183-207) de la caséine α_{s2} bovine (figure 47 B). La fraction 13-1 inclue quatre fragments majoritaires de masses ; 5430, 4921, 4463,5 et 4080,8 Da., correspondant, respectivement, aux peptides (131-174), (153-196), (99-137) de la caséine α_{s2} et au peptide (20-55) de la caséine α_{s1} (Figure 47 C). L'activité antimicrobienne de ces peptides n'est pas reportée dans la littérature, à notre connaissance. Trois fragments majoritaires sont présents dans la fraction 14-1, celles avec les masses égales à 5470 et 3793 correspondent aux peptides α_{s1} (141-147) et α_{s1} (161-195) alors que celui possédant une masse moléculaire de 3957 Da correspond au fragment α_{s2} (176-207) (Figure 47 D).

La fraction 17-1 est caractérisée par la présence de peptides présentant des poids moléculaires élevés. Ces fragments de masse égale à 7562, 7415, 7185, 5714 Da sont identifiés comme étant des peptides (99-163/100-164), (114-176) (115-174), (126-184), (28-90) et (138-184) de la caséine α_{s2} (figure 47 F). Le peptide de masse égale à 6714 correspond aux fragments (9-68/70-126) de la caséine α_{s1} . Ces fractions ont montré une activité antimicrobienne vis-à-vis de bactéries à Gram-positive et Gram-négative (Tableau 10).

Les peptides contenus dans les différentes fractions de l'extrait peptidiques sont données dans le tableau 11. La figure 48 montre une représentation de ces peptides sur la séquence de la caséine α_{s1} et celle de la caséine α_{s2} .

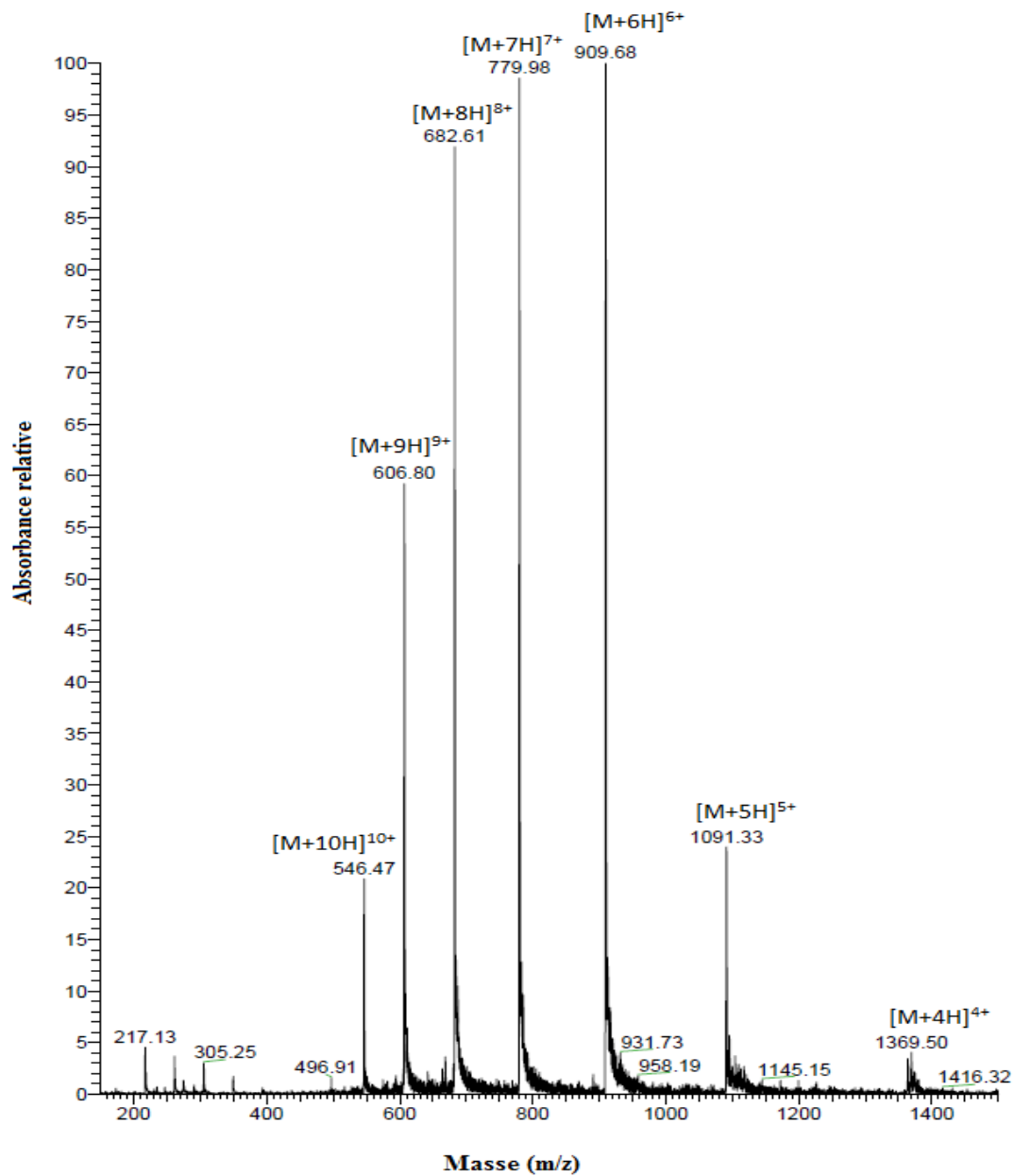
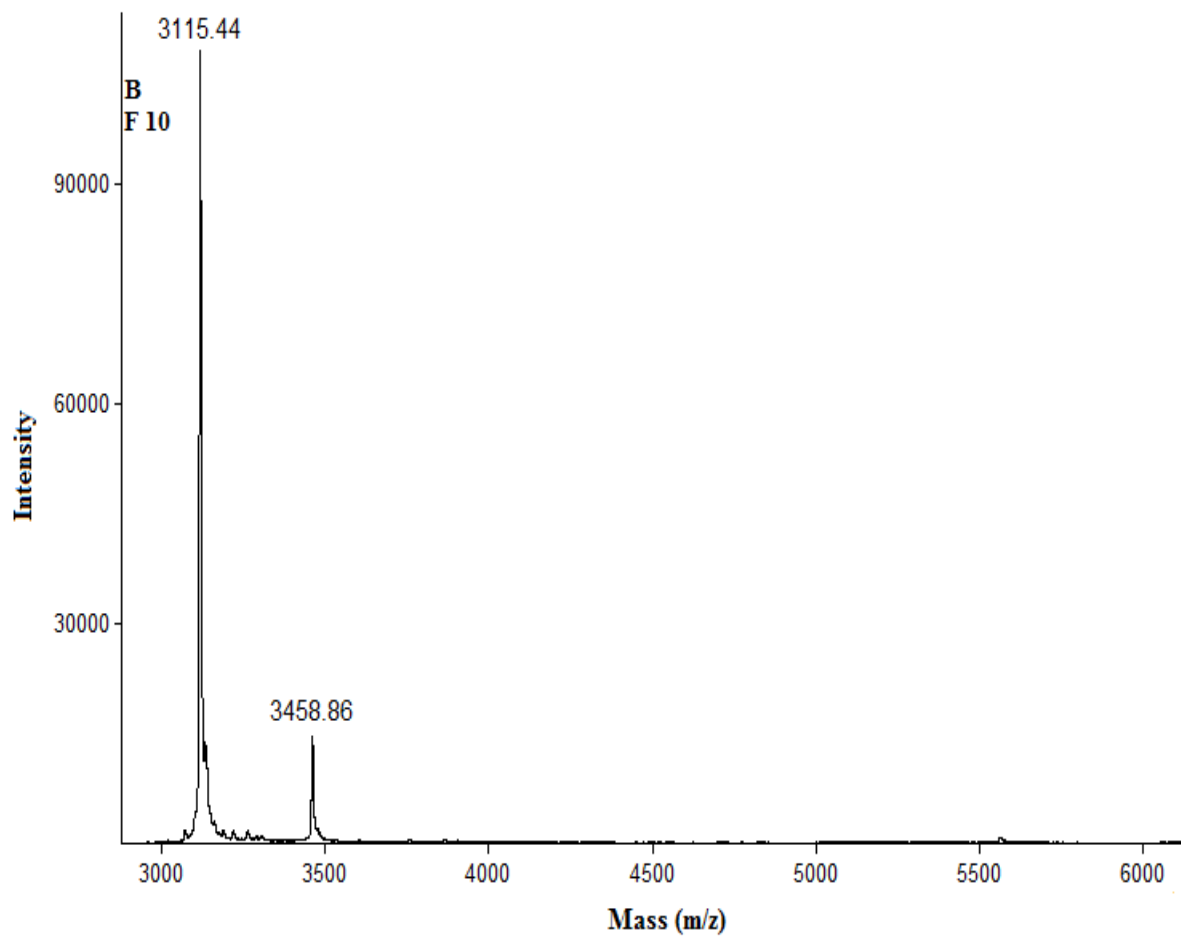
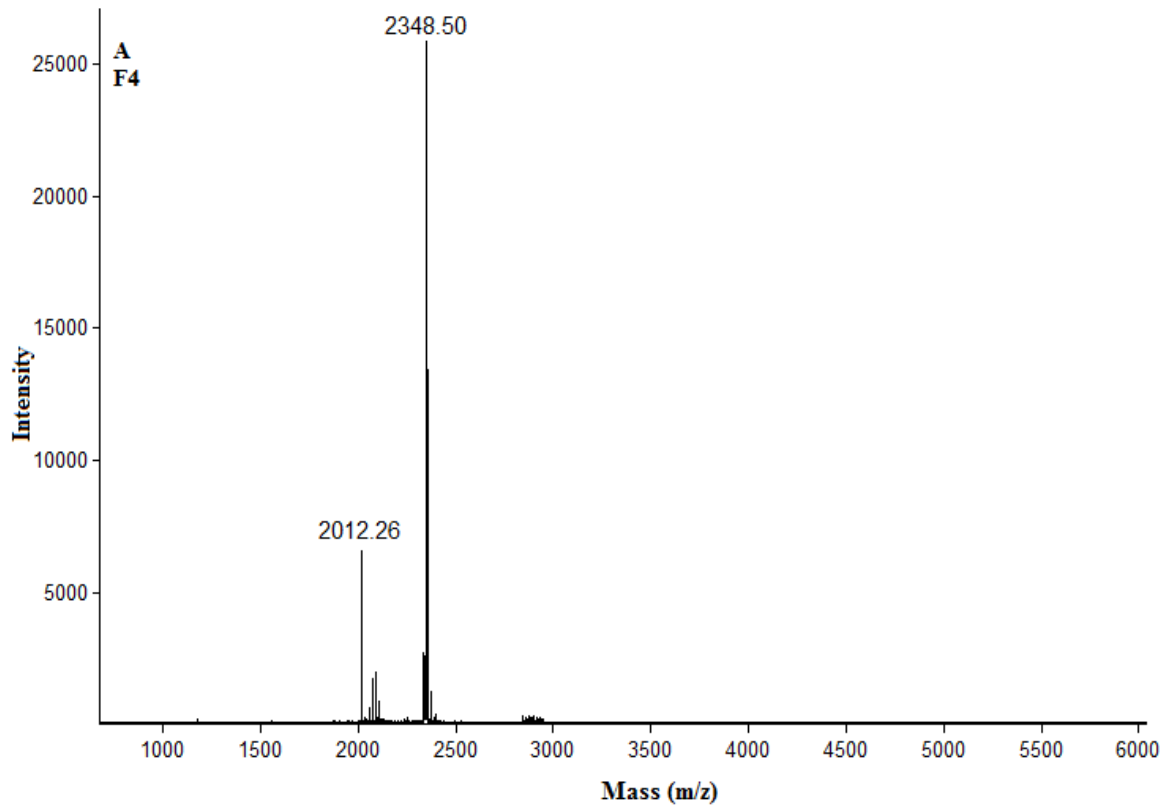
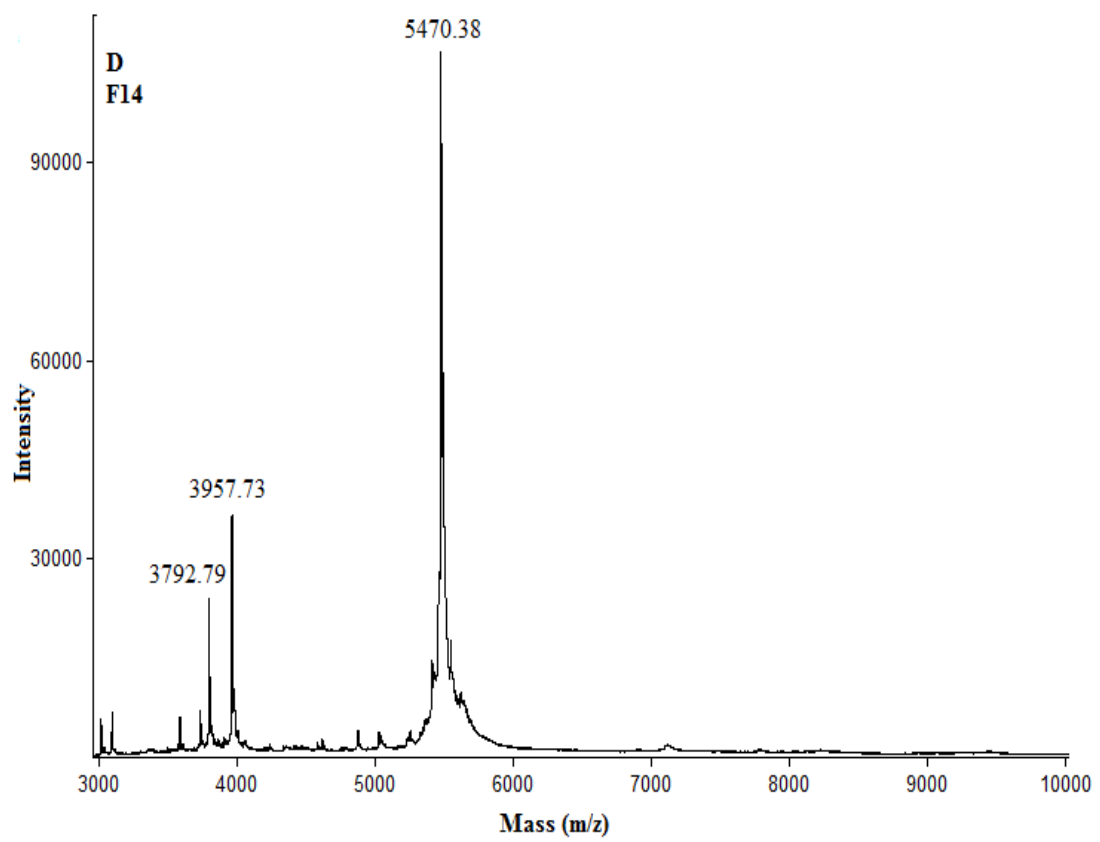
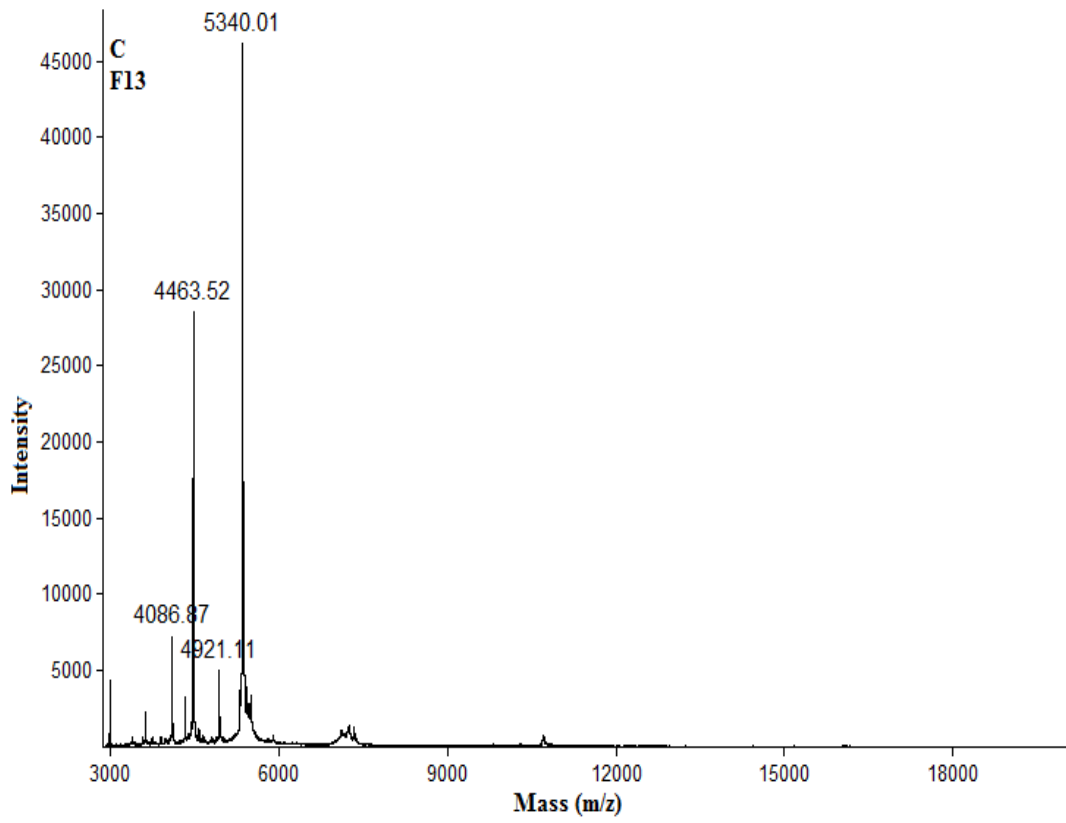


Figure 46. Spectre de masse du peptide α_{s2} (164-207) analysé en LC/MS, (ESI/Q).





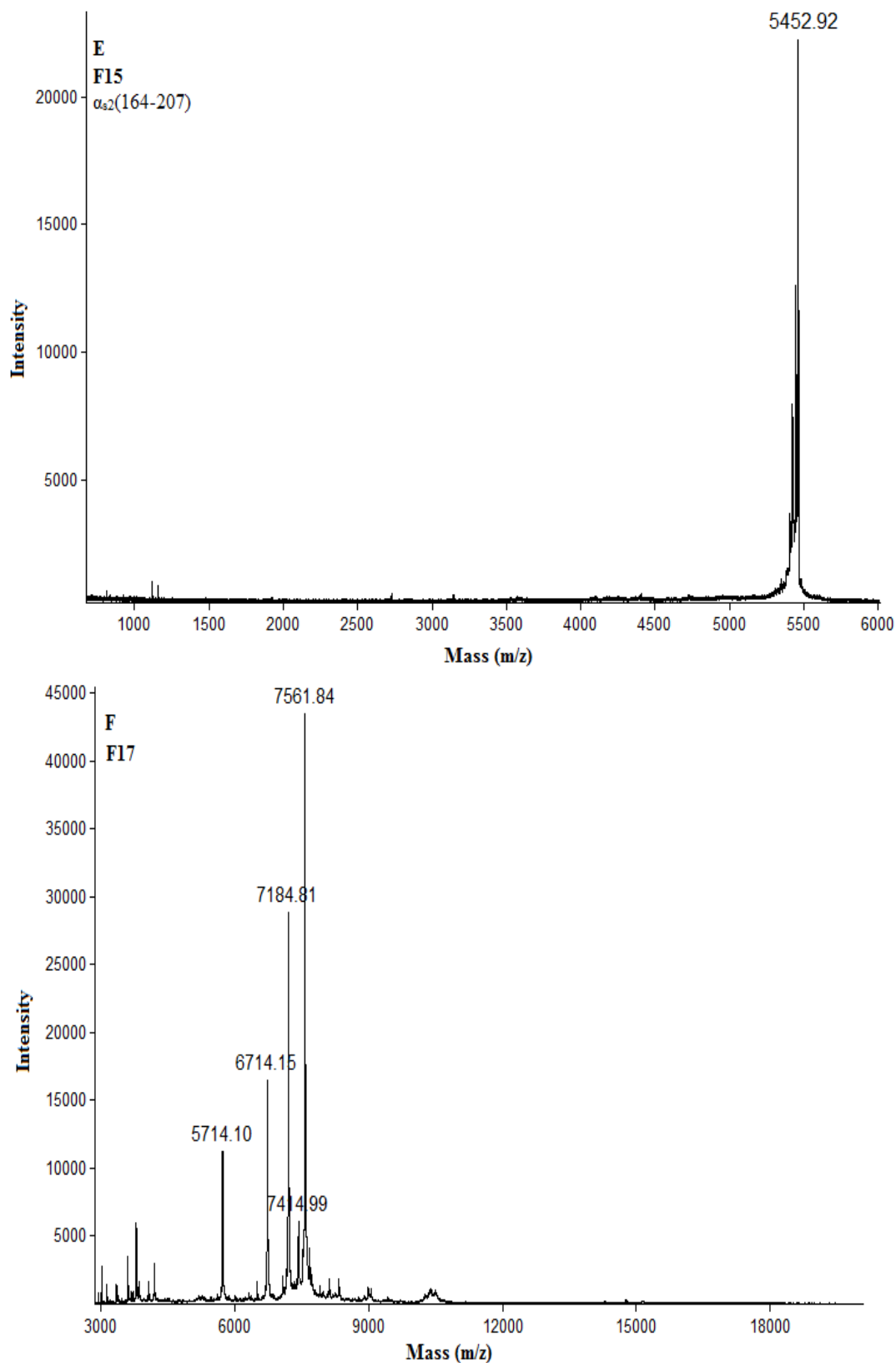


Figure 47. Spectres de masse des fractions 4, 10, 13, 14, 15 et 17 collectées sur CLHP à partir de l'extrait peptidique et analysées par MALDI-TOF.

Tableau 11. Masse moléculaire et séquence en acides aminés des peptides contenus dans l'extrait peptidique de l'hydrolysate pepsique de la caséine bovine

Fraction ^a	masse (Da)	Position de la séquence ^b	Séquence
Fraction 1	1878,043	α_{s1} 1-16	RPKHPIKHQGLPQEVN
		α_{s2} 149-163	KKTKLTEEEKNRLNF
	1219,59	//	//
	2348,88	α_{s1} 27-47	PFPEVFGKEKVNELSKDIGSE
		α_{s2} 82-99	LNEINQFYQKFPQYLQYL
		β 172-193	FPPQSVLSLSQSKVLPVPQKAV
		κ 47-67	PVALINNQFLPYYPYAKPAAV
Fraction 2	1198,02	α_{s1} 60-70	MEAESISSSEE
		α_{s2} 12-21	ESIISQETYSK
		α_{s2} 166-174	KISQRYQKF
		β 93-103	TQTPVVVPPFL
		κ 67-76	VRSPAQLQW
	2124,24	α_{s1} 21-38	LRFFVAPFPEVFGKEKVN
		α_{s1} 91-107	YLGYLEQLRLKVKVP
		α_{s2} 164-180	LKKISQRYQKFPALPQYL
	β 32-49	SSSEESITRINKKIEKFK	
Fraction 3	1386,48	α_{s2} 137-148	KTVDMESTEVEFT
Fraction 4	2012,20	α_{s2} 164-179	LNFLKISQRYQKFPALPQY
	2348,58	α_{s2} 148-166	TKTKLTEEEKNRLNFKK
Fraction 5	8264	α_{s1} 123-194	MKEGIHAQQKEPMIGVNLQELAYFYPELFRQFYQLDAYPSGAWYVPLGTQY TDAPSFSDIPNPIGSENSEKT
		α_{s1} 17-89	NENLLRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQAMEDIKQMEAESISSSEE IVPNSVEQKHIQKEDVPSE
		α_{s2} 119-187	ITPTLNREQLSTSEENSKKTVDMESTEVFTKTKLTEEEKNRLNFKKISQRYQK FALPQYLKTVYQHQ
	1177,39	α_{s2} 123-132	LNREQLSTSE
	3004,8	α_{s1} 91-115	YLGYLEQLRLKVKVPQLEIVPNS
		α_{s2} 162-185	NFLKISQRYQKFPALPQYLKTVYQ
Fraction 6	2354,88	α_{s1} 99-118	LRLKVKVPQLEIVPNSAEE
		α_{s2} 145-163	EVFTKTKLTEEEKNRLNF
	1499,74	α_{s2} 135-147	SEENSKKTVDMESTEVF
Fraction 7	1499,997	α_{s2} 135-147	SEENSKKTVDMESTEVF
Fraction 8	3131,71	α_{s1} 5-31	PIKHQGLPQEVNENLLRFFVAPFPEV
		α_{s2} 115-142	NAVPIPTLNREQLSTSEENSKKTVDM
		β 89-117	IPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVKEAM
		κ 58-85	YPYAKPAAVRSPAQLQWQVLSNTVPA
	3024,97	α_{s1} 36-62	KVNELSKDIGSESTEDQAMEDIKQMEA
		α_{s2} 180-204	LKTVYQHQKAMKPWIQPKTKVIPYV
		α_{s2} 158-181	KNRLNFKKISQRYQKFPALPQYLK
		β 179-205	SLSQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAF
	κ 16-40	RFSDKIAKYIPIQYVLSRPSYGL	
	6221,59	//	//
Fraction 9	3345	α_{s1} 101-129	LKKYKVPQLEIVPNSAEERLHSMKEGIHA
	2124,32	α_{s2} 164-180	LKKISQRYQKFPALPQYL
	3115	α_{s2} 183-207	VYQHQAAMKPWIQPKTKVIPYVRYL
	3074,56	α_{s1} 90-114	NQELAYFYPELFRQFYQLDAYPSGAW
	3130	α_{s2} 139-164	VDMESTEVFTKTKLTEEEKNRLNLF
Fraction 10-1	3458,86	α_{s2} 180-207	LKTVYQHQKAMKPWIQPKTKVIPYVRYL
	3115,44	α_{s2} 183-207	VYQHQAAMKPWIQPKTKVIPYVRYL
Fraction 11	3622,992	//	//
	3230,608	//	//
Fraction 12	3848,72	α_{s2} 53-87	SIGSSSESAEVATEEVKITVDDKH
		α_{s1} 114-146	NSAEERLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNLQELAYFY

	4220,81	α_{s1} 115-150	SAEERLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELF
Fraction 13-1	5340.01	α_{s2} 131-174	SEENSKKTVDMESTEVFTKTKLTEEEKNRLNFKKISQRYQKF
	4921.11	α_{s1} 153-196	FYQLDAYPSGAWYVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTM
	4463.52	α_{s2} 99-137	LYQGPIVLNPWDQVKRNAVPITPTLNREQLSTSEENSKK
	4086.87	α_{s2} 62-95	AEVATEEVKITVDDKHQKALNEINQFYQKFPQYL
		α_{s1} 20-55	LLRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQAME
Fraction 13-2	2763	//	//
	2575	α_{s1} 121-143	HSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELA
		α_{s2} 18-39	ETYKQEKMAINPSKENLCSTF
	1881	α_{s1} 88-102	SERYLGYLEQLLRK
	2734	α_{s1} 100-122	LKKYKVPQLEIVPNSAEERLHS
	1725	/	/
	2154	α_{s1} 54-72	MEDIKQMEAEISSSEEIV
		α_{s2} 159-175	NRLNFKKISQRYQKFA
	2521	/	/
	2265,33	α_{s1} 128-146	HAQQKEPMIGVNQELAYFY
		α_{s2} 17-35	QETYKQEKMAINPSKENL
	1530,9	α_{s1} 95-106	LEQLLRKKYKV
		α_{s2} 78-89	YQKALNEINQFY
Fraction 14-1	5470.38	α_{s1} 141-187	LRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQAMESFS DIPNPIG
	3957.73	α_{s2} 176-207	LPQYLKTVYQHQAAMKWPQPKTKVIPYVRYL
	3792.79	α_{s1} 161-195	SKDIGSESTEDQAMESFS DIPNPIGSENSEKTT
Fraction 14-2	568,27	α_{s1} 178-182	SFS DI
		α_{s1} 22-25	RFFV
		α_{s2} 51-55	EYSIG
		β 87-91	QNIPP
		β 187-191	PVPQK
		κ 103-107	LSFMA
	1060,29	//	//
	524,28	//	//
Fraction 15	5452.92	α_{s2} 164-207	LKKISQRYQKFALPQYLKTVYQHQAAMKWPQPKTKVIPYVRYL
Fraction 16	656	α_{s2} 171-175	YQKFA
	1919	α_{s1} 168-185	PLGTQYTDAPSFSDIPNP
	4770	α_{s2} 77-114	HYQKALNEINQFYQKFPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVKR
	4757.74	α_{s1} 88-127	SERYLGYLEQLLRKLYKVPQLEIVPNSAEERLHSMKEGI
	5086.0	α_{s1} 119-160	RLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFRQFYQLDAYP
	5604,0	α_{s1} 90-136	RYLGYLEQLLRKLYKVPQLEIVPNSAEERLHSMKEGIHAQQKEPMI
Fraction 17-1	7561.84	α_{s2} 99-163	LYQGPIVLNPWDQVKRNAVPITPTLNREQLSTSEENSKKTVDMESTEVFTK
			KKLTEEEKNRLNF
	7414.99	α_{s2} 114-176	RNAVPITPTLNREQLSTSEENSKKTVDMESTEVFTKTKLTEEEKNRLNFKKISQRYQKFAL
	7184.81	α_{s2} 28-90	INPSKENLCSTFCKEVVRNANEEEYSIGSSSEESA EVATEEVKITVDDKHQKALNEINQFY
		α_{s1} 9-72	QGLPQEVLNENLLRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQAMEDIKQMEAEISSSEEIV
	6714.15	α_{s1} 9-68	SSEESIISQETYKQEKMAINPSKENLCSTFCKEVVRNANEEEYSIGSSSEESA EVATEE
		α_{s1} 70-126	EIVPNSVEQKHIQKEDVPSERYLGYLEQLLRKLYKVPQLE
	5714.10	α_{s2} 138-184	TVDMESTEVFTKTKLTEEEKNRLNFKKISQRYQKFALPQYLKTVY
		α_{s1} 26-77	MAINPSKENLCSTFCKEVVRNANEEEYSIGSSSEESA EVATEEVKITVDDKH
Fraction 17-2	10511,86	α_{s1} 35-125	EKNELSKDIGSESTEDQAMEDIKQMEAEISSSEEIVPNSVEQKHIQKEDVPSERYLGY LEQLLRKLYKVPQLEIVPNSAEERLHSMKE
		α_{s1} 70-157	EIVPNSVEQKHIQKEDVPSERYLGYLEQLLRKLYKVPQLEIVPNSAEERLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFRQFYQLD
		β 106-198	EVMGVSKVKEAMAPKHKEMPPKYPVEPFTESQSLTLTDVENLHPLPLLOS WMHQPHQP LPPTVMFPPQSVLSLSQSKVLPVPQKAVPYPQR
	7579,07	α_{s1} 21-87	LRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQAMEDIKQMEAEISSSEEIVPNSVEQKHIQKEDV
		α_{s1} 46-110	SESTEDQAMEDIKQMEAEISSSEEIVPNSVEQKHIQKEDVPSERYLGYLEQLLRKLYKVPQLE

		α_{s1} 60-124	MEAESISSSEEIVPNSVEQKHIQKEDVPSERYLGYLEQLLRLKKYKVPQLEIVPN SAEERLHSMK
		β 119-184	PKHKEMPFKYPVEPFTESSQLTLTDVENLHLLPLLLQSWMHQPHQLPPTV MFPPQSVLSLSQSK
7431,39		//	//
7202,41		α_{s1} 114-174	NSAEERLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFRQFYQLDAYPSGAW YYVPLGTQYT
		α_{s1} 98-157	LLRLKKYKVPQLEIVPNSAEERLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFR QFYQLD
		α_{s2} 86-146	NQFYQKFPQYLQYLYQGPIVLPWDQVKRNAVPITPTLNREQLSTSEENSKK TVDMESTEV
		α_{s2} 126-185	EQLSTSEENSKKTVDMESTEVFTKTKLTEEEKNRLNFLKISQRYQKFALPQYL KTVYQ
4196,04		β 123-158	EMFPKYPVEPFTESSQLTLTDVENLHLLPLLLQSW
4435,28		//	//
Fraction 18-1	7074,45	α_{s2} 100-160	YQGPIVLPWDQVKRNAVPITPTLNREQLSTSEENSKKTVDMESTEVFTKTKK LTEEENR
		α_{s2} 126-184	EQLSTSEENSKKTVDMESTEVFTKTKLTEEENRNFLKISQRYQKFALPQYL KTVYQ
		α_{s2} 115-174	NAVPIPTLNREQLSTSEENSKKTVDMESTEVFTKTKLTEEENRNFLKISQR YQKF
		β 15-75	ARELEELNVPGEIVESLSSEESITRINKKIEKFQSEEQQQTEDELQDKIHFAQT QSLVY
		κ 34-95	RYPYGLNYYQKPVALLINQFLPYPPYAKPAAVRSPAQLQWQVLSNTVPA KSCQAQPTTM
6844,42		α_{s1} 10-70	GLPQEVLENLLRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQAMEDIKQMEA ESISSEE
		κ 32-91	LSRYPYGLNYYQKPVALLINQFLPYPPYAKPAAVRSPAQLQWQVLSNTVP AKSCQAQ
7580,04		α_{s1} 56-120	DIKQMEAESISSSEEIVPNSVEQKHIQKEDVPSERYLGYLEQLLRLKKYKVPQLEI VPNSAEERL
		β 154-220	LLQSWMHQPHQLPPTVMFPPQSVLSLSQSKVLPVPQAVPYPQRDMPIQ AFLLYQEPVLPVGRGPF
		κ 53-119	NQFLPYPPYAKPAAVRSPAQLQWQVLSNTVPAKSCQAQPTTMARHHPHPL SFMAIPPKNQDKTEI
3065,41		α_{s1} 167-195	VPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTT
		α_{s2} 5-31	EHVSSSEESIISQETKQEKMAINPS
		β 198-224	RDMPIQAFLLYQEPVLPVGRGPFPIV
5185,87		α_{s1} 8-53	HQGLPQEVLENLLRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQA
		β 61-107	QDKIHFAQTQSLVYPPFGPIPNLQNIPLTQTPVVVPPFLQPEV
		β 74-121	VYPPFGPIPNLQNIPLTQTPVVVPPFLQPEV/MGVSKVKEAMAPKH
		κ 48-94	VALINQFLPYPPYAKPAAVRSPAQLQWQVLSNTVPAKSCQAQPTT
7979,33		α_{s1} 107-174	PQLEIVPNSAEERLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFRQFYQLDAY PSGAWYYVPLGTQYT
		α_{s1} 74-141	NSVEQKHIQKEDVPSERYLGYLEQLLRLKKYKVPQLEIVPNSAEERLHSMKEGI HAQQKEPMIGVNQE
		β 95-164	TPVVVPPFLQPEV/MGVSKVKEAMAPKHKEMFPKYPVEPFTESSQLTLTDVE NLHLLPLLLQSWMHQPHQ
Fraction 18-2	7058,37	α_{s1} 15-77	VLNENLLRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQAMEDIKQMEAESISS EEIVPNSVE
		α_{s2} 18-79	ETYKQEKMAINPSKENLCSTFCKEVVRNANEEYSIGSSSESAEVATEEVKIT VDDKHQY
		β 124-185	MFPKYPVEPFTESSQLTLTDVENLHLLPLLLQSWMHQPHQLPPTVMFPP QSVLSLSQSKV
6828,56		//	//
5600,83		//	//
7563,89		α_{s2} 85-148	INQFYQKFPQYLQYLYQGPIVLPWDQVKRNAVPITPTLNREQLSTSEENSKK TVDMESTEVFT
		α_{s2} 132-193	EENSKKTVDMESTEVFTKTKLTEEENRNFLKISQRYQKFALPQYLKTVYQ HQAAMKPW
		β 126-192	FPKYPVEPFTESSQLTLTDVENLHLLPLLLQSWMHQPHQLPPTVMFPPQSV LSLSQSKVLPVPQKA

	β 156-222	QSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAF LLYQEPVLGVPVRGPFPI
7962,78	β 18-87	LEELNVPGEIVESLSSSEESITRINKKIEKFQSEEQQTEDELQDKIHPPFAQTQSL VYPF PGPIPNLSPQ
3064,98	α_{s1} 14-39	EVLNENLLRFFVAPFPEVFGKEKVNE
	α_{s2} 5-31	EHVSSSEESIISQETYSQEKKNMAINPS

^a: fait référence au numéro de la fraction dans la figure 21 ;

^b: position des peptides dans les différentes fractions de la caséines.

// : séquence non déterminée.

IV.1.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et du mode d'action des peptides actifs

Le pouvoir antimicrobien d'une molécule est, généralement, exprimé par sa concentration minimale inhibitrice (CMI). Cette dernière correspond à la plus faible concentration de l'agent antimicrobien capable d'inhiber la croissance de la souche bactérienne testée, après un temps d'incubation de 24 heures à 37°C. La CMI est déterminée en milieu liquide sur microplaques dans du milieu Müller-Hinton (MH) contenant des concentrations décroissantes de peptide. L'activité antimicrobienne est détectée par l'absence de croissance dans des puits contenant la souche bactérienne et le peptide à la concentration testée. Des dilutions successives au 1/2 du peptide ont été testées vis-à-vis de sept souches cibles. La concentration initiale des peptides a été évaluée par la méthode OPA en utilisant la peptone pancréatique de caséine comme étalon. La CMI a été déterminée pour le peptide α_{s2} (164-207) que nous avons pu séparer à l'état pur. La concentration de départ de ce peptide est de $0,624 \pm 0,00192$ mg/mL. La CMI est également déterminée pour l'extrait peptidique, obtenu par précipitation au sel, renfermant $1,929 \pm 0,03684$ mg/mL de peptide. La nisine ainsi qu'un antibiotique ; la tétracycline ont été prises comme témoin positif. Le tableau 12 présente les valeurs de la CMI obtenues.

Le peptide α_{s2} (164-207) ainsi que l'extrait peptidique ont présenté des valeurs de CMI plus faibles sur les souches à Gram-positif comparées à celles déterminées sur les souches à Gram-négatif testées. Le peptide α_{s2} (164-207) a montré une activité plus élevée que la nisine vis-à-vis de *L. innocua* **LMG 1138** avec une CMI égale à $9,754 \mu\text{g/mL}$ contre $31,25 \mu\text{g/mL}$ pour la nisine. Et une CMI de $19,5 \mu\text{g/mL}$ vis-à-vis de *B. subtilis* **ATCC 6633** contre $15,625 \mu\text{g/mL}$ pour la nisine. Mc Cann *et al.*, (2005) ont déterminé, pour le peptide α_{s2} (164-207) une CMI de $0,9 \mu\text{M}$ vis-à-vis de ces mêmes souches.

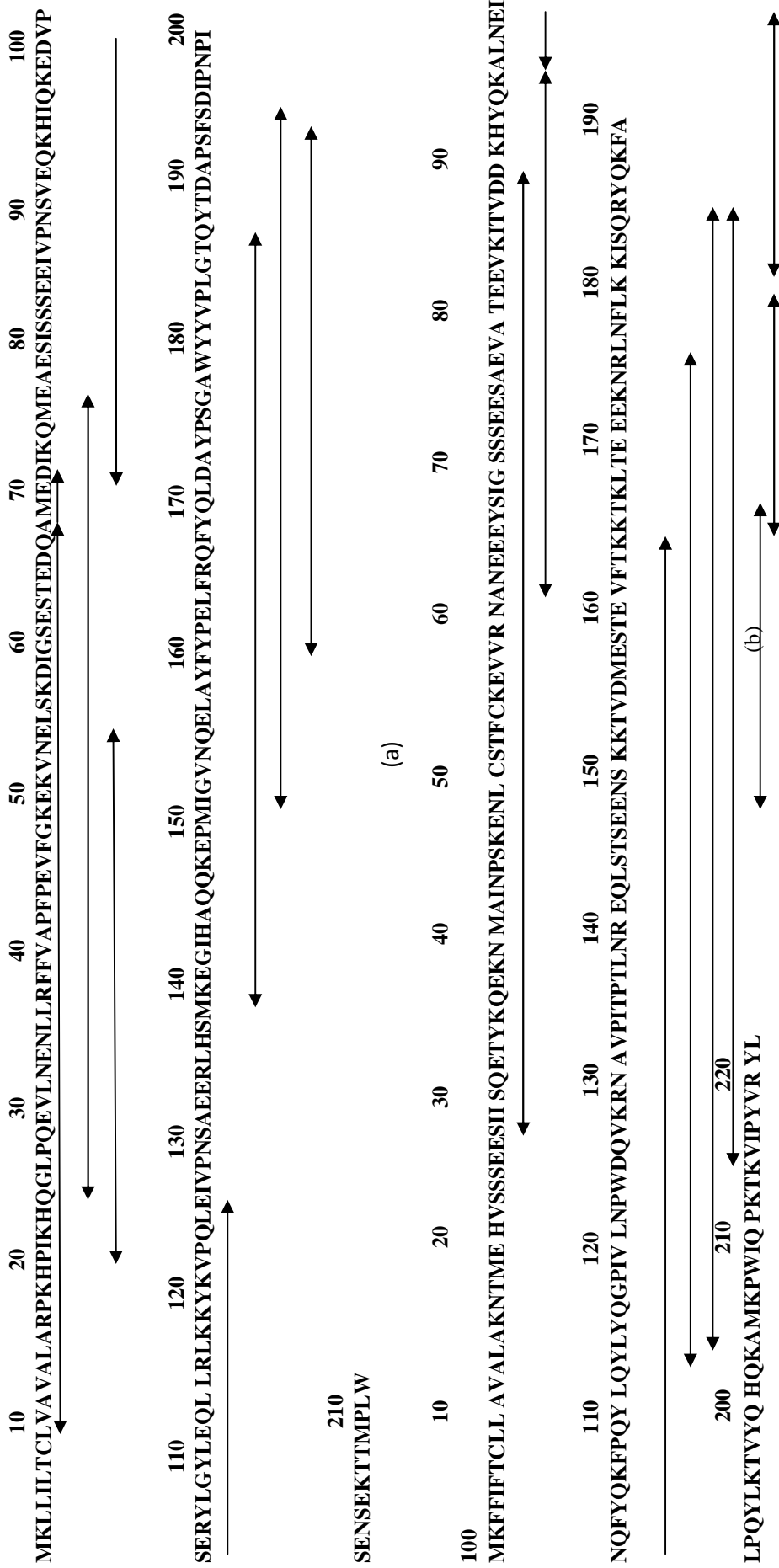


Figure 48. Représentation des peptides antimicrobiens sur la chaîne de la caséine αS_1 (a) et de la caséine αS_2 (b) bovine.

Ce peptide présente ainsi le pouvoir antimicrobien le plus élevé parmi le groupe de peptides actifs issus des fractions α_s de la caséine bovine.

Comparé au peptide α_{s2} (164-207), l'extrait peptidique, a montré des valeurs de CMI plus élevées sur les différentes souches testées (Tableau 12). Toutefois, cet extrait a montré une activité comparable à celle de la nisine contre *L. innocua* et *L. monocytogène* (CMI = 30,14 $\mu\text{g/mL}$ et 60,28 $\mu\text{g/ml}$ contre 31,25 $\mu\text{g/mL}$ et 62,5 $\mu\text{g/mL}$ respectivement). La faible activité de l'extrait peptidique comparé au peptide pur peut être due à la présence de peptides inactifs dans le mélange. Mc Cann *et al.*, (2005) ont également noté des valeurs élevées de CMI pour une fraction peptidique séparée de l'hydrolysate brut de caséine par chromatographie échangeuse de cation (CMI de 312 à 625 $\mu\text{g/mL}$ et de 625 à 5000 $\mu\text{g/mL}$ pour des souches à Gram positif et à Gram négatif, respectivement). Bien que cette dernière renferme plusieurs peptides actifs tels que les peptides α_{s2} (164-207, 175-207 et 181-207), la présence de peptides inactifs semble affecter l'activité antimicrobienne.

Aux concentrations testées, la CMI n'a pas pu être déterminée sur la souche de *S. aureus*, **CIP 4.83**, pour le peptide α_{s2} (164-207) et l'extrait peptidique, la (MIC > 624,2 $\mu\text{g/mL}$ pour le peptide α_{s2} (164-207) et MIC >1929 $\mu\text{g/mL}$ pour l'extrait peptidique). Bien qu'une activité sur milieu solide a été préalablement observée sur cette souche mais en présence de quelques colonies sur les zones d'inhibition (Figure 49). Ainsi, des concentrations en peptides plus élevées doivent être testées pour déterminer la CMI sur la souche en question.

L'effet bactéricide ou bactériostatique des peptides est déterminé à partir des puits de la CMI en dénombrant les cellules restantes. Un dénombrement est en parallèle réalisé sur les puits contenant la culture bactérienne sans ajout de peptides (témoin de croissance) afin de définir un pourcentage de mortalité cellulaire. Après incubation à 37°C pendant 24h, un dénombrement est effectué afin de déterminer le nombre d'UFC par mL. Les résultats obtenus pour les peptides testés sont données dans le tableau 13. Un agent antimicrobien est considéré comme bactéricide lorsqu'il ne laisse qu'une bactérie viable sur 10000 ce qui correspond à un taux de mortalité de 99,99 %, à la concentration de la CMI ou bien à une valeur proche. A des taux de mortalité plus faibles, l'effet est dit bactériostatique.

Le mode d'action du peptides α_{s2} -CN f(164-207) et de l'extrait peptidique est étudié sur deux souches à Gram-positif : *L. innocua* **LMG1138** et *B. subtilis* **ATCC 6633** et deux souches à Gram-négatif : *E. coli* **JM109** et *E. coli* **DH5 α** . Selon les résultats obtenus, les

peptides testés présentent un effet bactériostatique sur les bactéries à Gram-positif et un effet bactéricide sur les souches à Gram-négatif, lorsqu'ils sont employés à une concentration égale à la CMI (Tableau 13).

Parmi les peptides identifiés, certains ont été reportés par d'autres travaux et pour lesquels l'activité antimicrobienne a été mise en évidence. C'est le cas des peptides (164-179, 180-207, 183-207 et 164-207) issus de la région C-terminale de la caséine α_{s2} bovine. Ces peptides possèdent un point isoélectrique compris entre 10,00 et 10,40, (Recio et Visser, 1999 ; Mc Cann *et al.*, 2005). Présentant, ainsi, des propriétés communes au groupe de peptides antimicrobiens caractérisés par la présence dans leur structure d'une région chargée positivement et capables d'adopter une conformation dipolaire permettant leur présence au niveau des interfaces hydrophiles/hydrophobes. Ce caractère bipolaire est à l'origine des perturbations de la membrane microbienne, chargée négativement, conduisant à la mort cellulaire (Bradshaw *et al.*, 2003).

Une étude réalisée sur le mécanisme d'action du peptide α_{s2} (183-207) indique que le site initial de liaison de ce peptide était l'acide lipotéichoïque chez les bactéries à Gram positif et les lipopolysaccharides chez les bactéries à Gram négatif. Le peptide était capable de perméabiliser les membranes externe et interne et de générer des pores dans la membrane externe des bactéries à Gram-positif et dans la paroi cellulaire des bactéries à Gram-négatif. Provoquant ainsi, une fuite du contenu cytoplasmique chez les bactéries à Gram-positif et condensation du cytoplasme chez les bactéries à Gram-négatif. Le peptide montre, ainsi, un mécanisme d'action comparable à celui de la lactoferrecine prise comme témoin (López-Expósito *et al.*, 2008). Cependant, la relation entre le mécanisme d'action de ces peptides et leurs structures reste à déterminer. En effet, plusieurs de ces peptides sont des précurseurs du peptide (181-207) avec différentes longueurs de la chaîne peptidique. Ces derniers montrent un pouvoir antimicrobien différent. Le peptide (175-207) possédant 6 résidus en plus du côté N-terminal que le peptide (181-207), montre une CMI 2,3 fois plus faible que ce dernier contre des bactéries à Gram positif. De même, le peptide (164-207) possédant 17 résidus supplémentaires montre une CMI 7 fois plus faible que celle du peptide (181-207) (Mc Cann *et coll.*, 2005). Bien que, ce segment supplémentaire, correspondant au peptide (164-179), montre une CMI 3,1 fois plus élevée que le peptide (181-207) et 50 fois plus élevée que le peptide (164-207) sur le même groupe de bactéries (Recio et Visser, 1999 ; Mc Cann *et al.*, 2005).

Une étude réalisée sur l'obtention de peptides antimicrobiens par hydrolyse pepsique de la caséine α_{s2} ovine montre que le peptide (184-208) d'origine ovine présente une activité antimicrobienne plus faible que son homologue bovin (fragment 183-207), alors que la structure des deux fragments se différencie par 4 résidus seulement. Il s'agit du remplacement des résidus valine, tyrosine, isoleucine, et lysine dans le peptide d'origine bovine par l'alanine, un acide aspartique, thréonine et asparagine, respectivement, dans son homologue ovin.

Tableau 12. Concentration minimale inhibitrices (CMI) du peptide α_{s2} (164-207) et de l'extrait peptidique en comparaison à la tétracycline et la nisine

	Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)							
	Extrait peptidique		α_{s2} (164-207)		Tétracycline		Nisine	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
Bactéries Gram-positif								
<i>L. innocua</i> LMG 1138	30,14	NA	9,754	1,788	0,25	0,000520	31,25	8,928
<i>B. subtilis</i> ATCC6633	60,28	NA	19,50	3,577	0,50	0,001040	15,625	4,462
<i>L.monocytogène</i> ATCC 3512	60,28	NA	-		0,25	0,000520	62,5	17,857
<i>S. aureus</i> CIP4.83	>1929	NA	>624,2	>114,49	0,488	0,001015	15,625	4,464
Bactéries Gram-négatif								
<i>E. coli</i> JM109	241,12	NA	78,02	14,311	15,62	0,032481	-	
<i>E. coli</i> DH5α	964,50	NA	312,10	57,245	3,90	0,008110	-	
<i>E. coli</i> CIP 54127	482,25	NA	-		-		-	

NA : non attribuable

Tableau 13. Taux de mortalité cellulaire engendré par le peptide α_{s2} (164-207) et de l'extrait peptidique lorsqu'ils sont employés à une concentration égale à leurs CMI

	Taux de mortalité (%)	
	Extrait de peptide	α_{s2} -CN f(164-207)
Bactéries Gram-positif		
<i>L. innocua</i> LMG 1138	99,87	99,97
<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	99,97	99,98
Bactéries Gram-négatif		
<i>E. coli</i> JM109	99,99	99,99
<i>E. coli</i> DH5 α	99,99	99,99
<i>E. coli</i> CIP 54127	99,99	—

En outre, des études plus récentes ont montré l'importance de certaines séquences en acides aminés dans l'activité antimicrobienne de peptides. En effet, Catiau *et al.*, (2011a et 2011b) ont pu déterminer une séquence minimale responsable de l'activité antimicrobienne du peptide α (133-141) et celle du peptide β (114-145) issus de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine. En prenant des segments de plus en plus courts de ces peptides, ils ont pu démontrer que les tripeptides KYR et RYH seraient les séquences antimicrobiennes minimales des peptides α (133-141) et β (114-145) respectivement. Ces tripeptides montrent des CMI 10 à 40 fois plus faibles que celles de leurs précurseurs sur les souches testées. En outre, le dipeptide de séquence YR est dépourvu d'activité antimicrobienne (Catiau *et al.*, 2011b). Cela indique que la présence de la tyrosine (Y), arginine (R) et d'un acide aminé basique tel que la lysine (K) ou l'histidine (H) est requise pour l'activité antimicrobienne de ces peptides.

Lopes *et al.*, (2005), en étudiant l'effet analgésique de la néokyotorphine (α 137-141 : TSKYR) ont montré que l'interaction de ce peptide avec la membrane des bactéries est due à la présence de la lysine et de l'arginine qui apportent les charges positives nécessaires à cet effet. Cette interaction induit un changement de conformation du groupement phénolique de la tyrosine, permettant au peptide de se fixer sur un récepteur membranaire provoquant un effet analgésique. La présence de cette séquence particulière doit être prise en considération dans l'étude du mécanisme d'action des peptides issus de protéolyse. Du fait que nous avons observé la présence dans plusieurs peptides identifiés dans ce présent travail. C'est le cas de groupe de peptide issus de la région C-terminale de la caséine α_{s2} bovine et plus particulièrement le segment (164-207).

LKKISQRYQKFALPQYLKTVYQHQQAMKPWIQPKTKVIPYVRYL). Ou bien dans la région (70-126) de la caséine α_1 (EIVPNSVEQKHIQKEDVPSERYLGYLEQLLRLLKRYKVPQL).

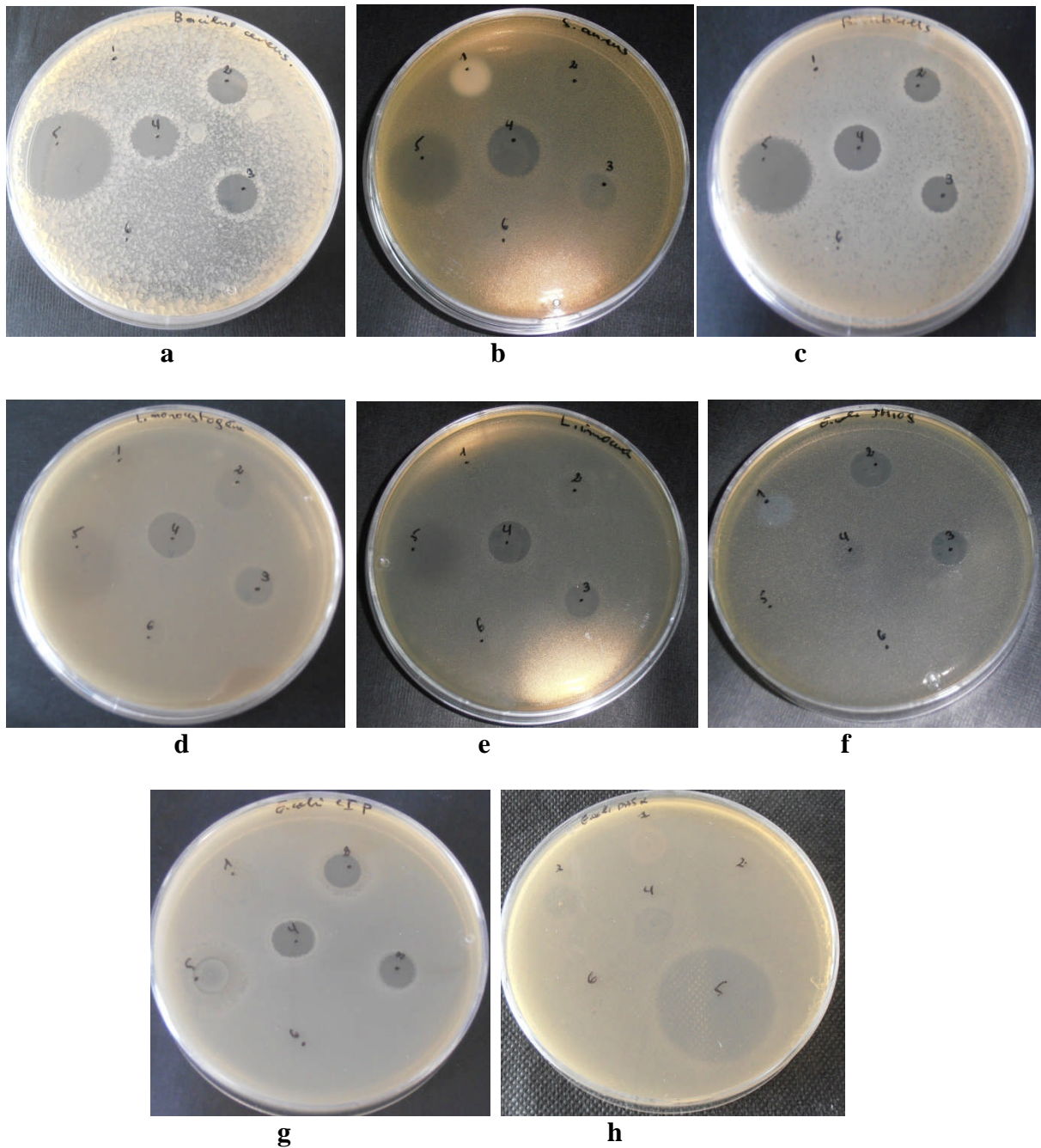


Figure 49. Zones d'inhibition des échantillons testés sur les souches cibles ; **a** : *B. cereus*, **b** : *S. aureus* CIP 4.83, **c** : *B. subtilis* ATCC 6633, **d** : *L. monocytogène* ATCC 3512, **e** : *L. innocua* LMG 11387, **f** : *E. coli* JM109, **g** : *E. coli* CIP 54127, **h** : *E. coli* DH5a. (les annotations faites sur chaque boîte correspondent aux échantillons ; 1 : caséines natives, 2 : hydrolysats total, 3 : extrait de peptique, 4 : peptide α_2 (164-207), 5 : témoin positif ; tétracycline, 6 : témoin négatif ; tampon phosphate).

IV.2. Cas de la protéase purifiée de Lc.L6

L'activité antimicrobienne est recherchée dans les différents hydrolysats de caséine bovine préparés sous l'action de la protéase purifiée de Lc.L6. L'activité est mise en évidence selon la méthode de diffusion sur milieu gélosé. Les hydrolysats sont testés contre 4 souches à Gram-positif ; *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Listeria innocua* LMG 11387, *Listeria monocytogenes* ATCC 3512, *Staphylococcus aureus* CIP 4.83, et 3 souches à Gram-négatif : *Escherichia coli* JM 109, *Escherichia coli* DH5 α et *Escherichia coli* CIP 54127.

Les hydrolysats prélevés à différents intervalles de temps sont testés contre les souches cibles. Des zones d'inhibition nettes ont été observées contre seulement la souche *Listeria innocua* LMG 11387 pour les hydrolysats obtenus à partir de 4 h d'hydrolyse. (Tableau 14 ; Figure 50).

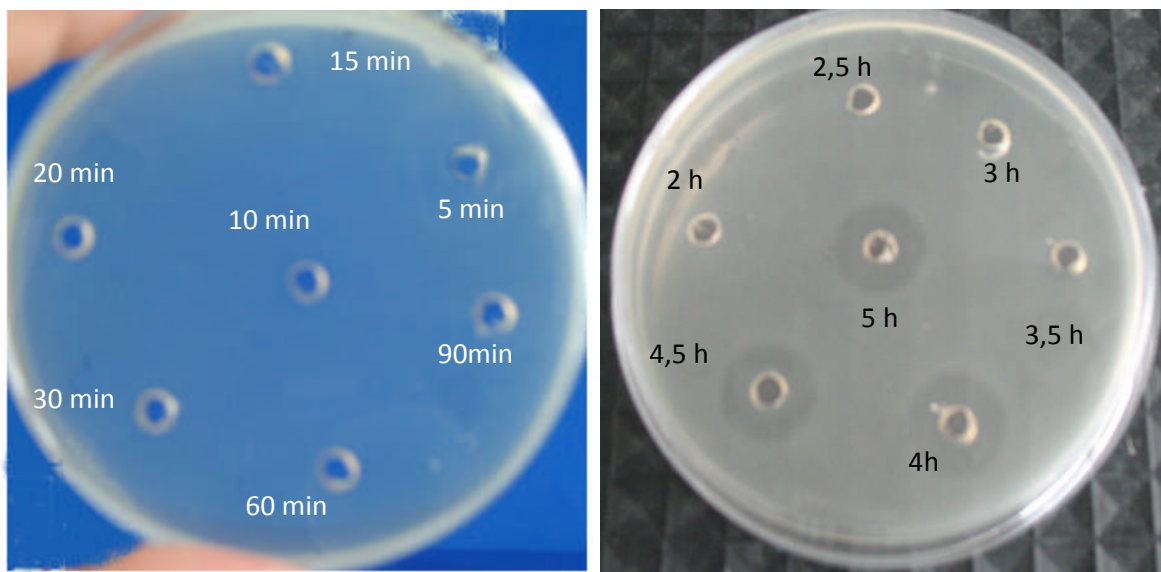


Figure 50 : photos montrant les zones d'inhibition obtenues sur la souche *Listeria innocua* LMG 11387 des hydrolysats de la caséine bovine par l'action de la protéase purifiée.

Tableau 14 : Activité antibactérienne des hydrolysats protéasiques de la caséine bovine

Hydrolysats	Souches cibles						
	<i>L. innocua</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>L.monocytogène</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>
	LMG 11387	ATCC 6633	ATCC 3512	CIP 4.83	CIP 54127	JM109	DH5a
T0	-	-	-	-	-	-	-
2.5 min	-	-	-	-	-	-	-
5 min	-	-	-	-	-	-	-
10 min	-	-	-	-	-	-	-
15 min	-	-	-	-	-	-	-
30 min	-	-	-	-	-	-	-
1 h	-	-	-	-	-	-	-
2 h	-	-	-	-	-	-	-
2,5 h	-	-	-	-	-	-	-
3 h	-	-	-	-	-	-	-
3,5 h	-	-	-	-	-	-	-
4 h	+	-	-	-	-	-	-
4,5 h	+	-	-	-	-	-	-
5h	+	-	-	-	-	-	-
5,5 h	+	-	-	-	-	-	-
6 h	+	-	-	-	-	-	-
24 h	+	-	-	-	-	-	-

IV.2.1 Séparation des peptides antimicrobiens à partir d'hydrolysat de la caséine bovine par la méthode de Yang *et al.*, (1991)

L'adsorption des molécules de bactériocines a été largement utilisée sur des souches productrices appartenant au genres *Pediococcus* (Gonzalez *et al.*, 1987 ; Bhunia *et al.*, 1991), *Lactobacillus* (Klaenhammer,1998), *Lactococcus* (Hurst, 1981) et les *Leuconostoc* (Daba *et*

al., 1991 ; Hastings *et al.*, 1991). Ainsi, le pH optimum pour l'adsorption de la nisine et la pediocine des Gram (+) ont été également rapportées.

Comme pour le cas de la pepsine, en premier lieu la purification des peptides d'intérêts a été réalisée en appliquant la même méthode de précipitation par la force ionique et le pH. Les résultats trouvés étaient non concluants. En revanche, l'application de la méthode de Yang *et al.*, (1991) s'est avérée plus intéressante.

Cette méthode a été appliquée pour adsorber et désorber les peptides obtenus à différents temps d'hydrolyses, en utilisant les souches pathogènes comme support d'adsorption des peptides antimicrobiens. Ainsi les solutions de peptides récupérées après l'étape de désorption qui correspondent aux différents types d'hydrolysats ont été utilisées pour la recherche des peptides antimicrobiens.

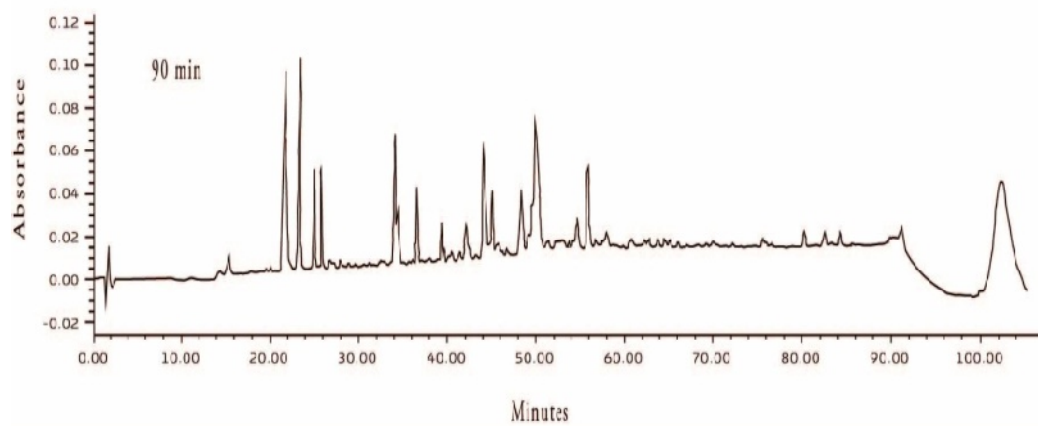
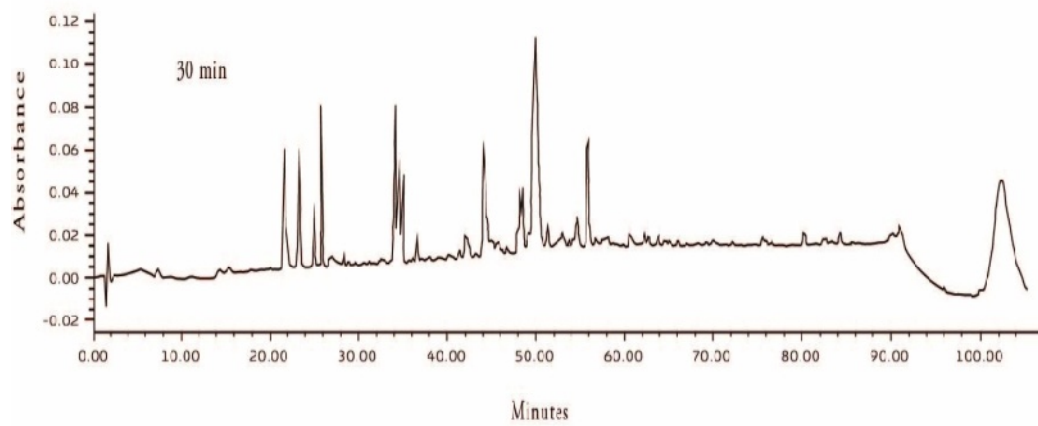
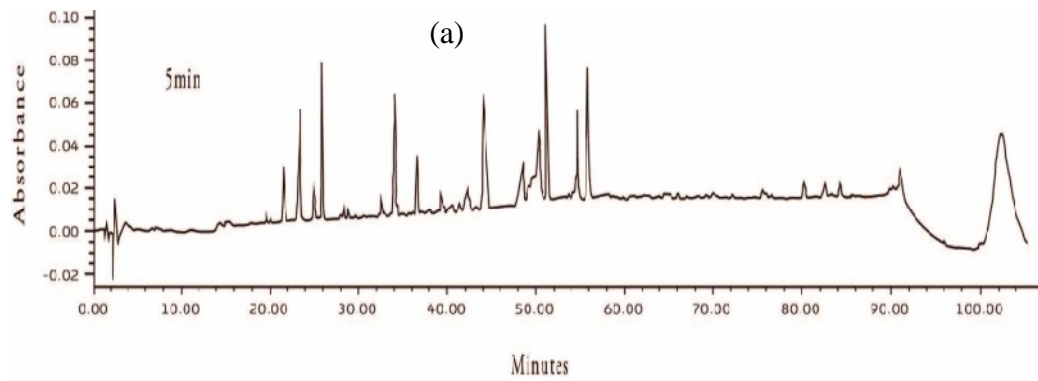
L'activité est mise en évidence selon la méthode de diffusion sur milieu gélosé comme indiqué précédemment. Les solutions obtenus après la désorption sont testées contre la collection de souches cibles présentées ci-dessus. Les résultats sont consignés dans le tableau 15.

Les résultats présentés dans la figure 51 illustrent les chromatogrammes peptidiques obtenus en appliquant la méthode de Yang. La figure montre clairement que tous les chromatogrammes ont un profil d'éluion similaire, cela signifie que la fixation sur la paroi des cellules bactériennes de la souche cible est spécifique, c'est-à-dire que les peptides de même charge globale se comportent d'une manière identique. Par ailleurs, le rendement de purification de peptides par la méthode de désorption est très faible, ceci est du probablement à la charge et encombrement stérique des molécules qui est un facteur déterminant pour l'adsorption. Généralement, les rendements d'extraction et de purification des bactériocines en tant que peptides antimicrobiens est faible. Selon l'étude réalisée par Vera Pingitore *et al.*, (2007) sur la stratégie de purification des peptides antimicrobiens à partir des bactéries lactiques, le rendement varie entre 15%- 30%.

Afin de pouvoir séparer les peptides actifs, l'analyse a été réalisé sur l'hydrolysat de 4 heures et sa solution de peptides issue de la désorption, qui ont montré une activité antibactérienne contre uniquement la souche cible *Listeria innocua* **LMG 11387**.

En vue d'identifier les peptides désorbés, les différentes fractions (numérotées sur le chromatogramme de 1 à 10) (figure 52) ont été collectées par RP-HPLC sur une C₁₈. L'activité antimicrobienne des fractions collectées a été déterminée. Une seule fraction a démontrée une

activité vis-à-vis *Listéria innocua* **LMG 11387** (figure 53). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 15. Toutes les fractions collectées ont été par la suite analysées par spectrométrie de masse.



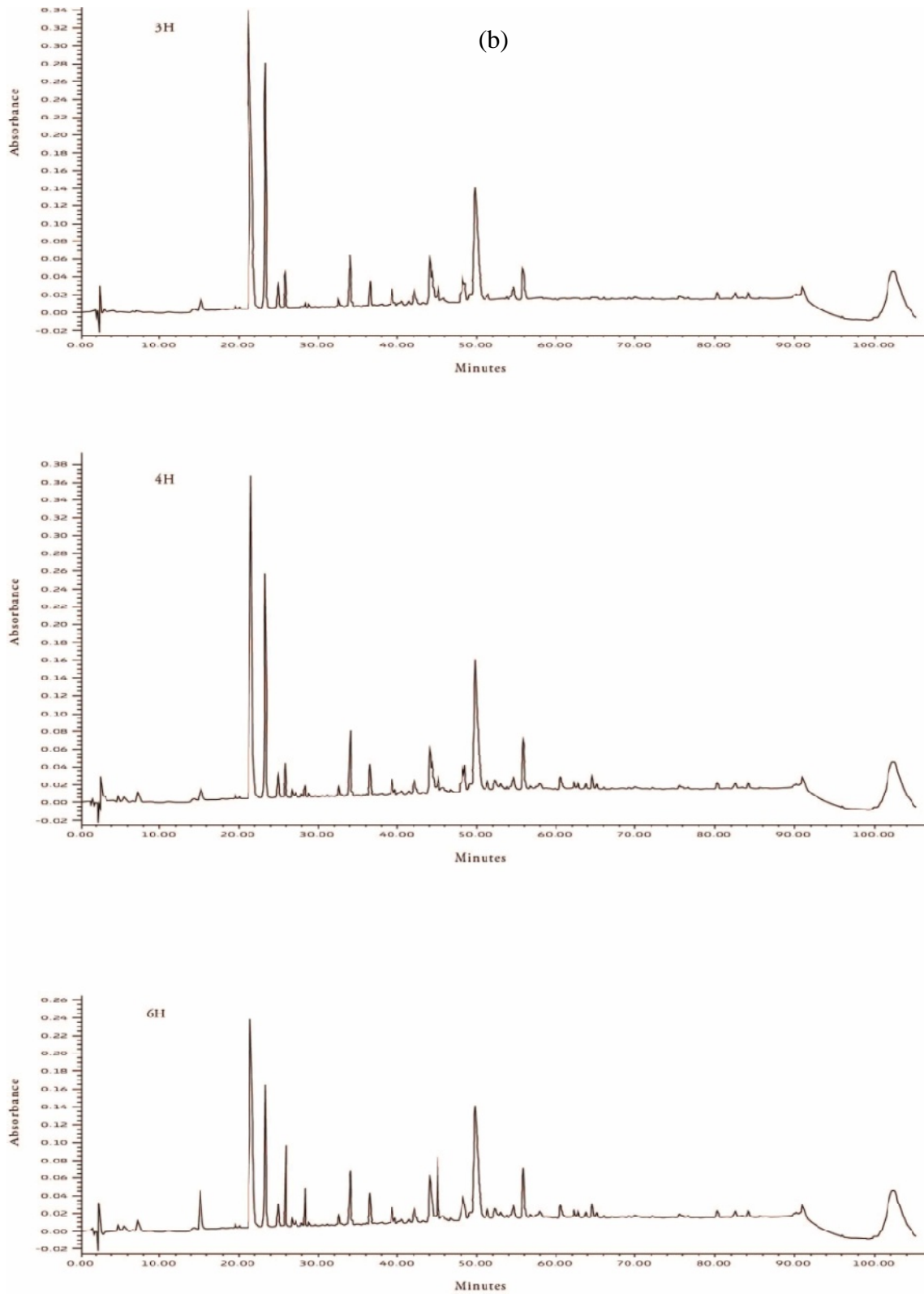


Figure 51 : Profils CLHP-PI des solutions de désorption des hydrolysats (a) ; (b) de caséine bovine à différents temps d'hydrolyses.

Tableau 15 : Activité antibactérienne des de la solution de peptides de désorption et les fractions

Fractions ^a	Souches cibles						
	<i>L. innocua</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>L.monocytogène</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>
	LMG 11387	ATCC 6633	ATCC 3512	CIP 4.83	CIP 54127	JM109	DH5a
Solution de la désorption 4 h	+	-	-	-	-	-	-
Fraction 1	+	-	-	-	-	-	-
Fraction 2	-	-	-	-	-	-	-
Fraction 3	-	-	-	-	-	-	-
Fraction 4	-	-	-	-	-	-	-
Fraction 5	-	-	-	-	-	-	-
Fraction 6	-	-	-	-	-	-	-
Fraction 7	-	-	-	-	-	-	-
Fraction 8	-	-	-	-	-	-	-
Fraction 9	-	-	-	-	-	-	-
Fraction 10	-	-	-	-	-	-	-

Note : ^a fait référence aux fractions du profil CLHP dans la Figure 52, - : absence de zone d'inhibition.

IV.2.2 Identification et caractérisation par spectrométrie de masse des peptides actifs purifiés par la méthode Yang, (1992).

IV.2.2.1. Identification et caractérisation par MALDI-TOF

Afin de déterminer la carte massique de l'échantillon à analyser, une identification par spectrométrie de masse en MALDI-TOF (Bruker Daltonics) a été effectuée sur la solution de désorption issue de l'hydrolysate de 4h. La recherche a été réalisée dans une gamme de m/z entre 200-5000Da pour la détection de maximum de masses peptidiques. Les résultats de l'analyse sont interprétés par le logiciel Flexanalysis qui permet l'identification des peptides présents dans l'échantillon sous d'un spectre massique. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 54.

Les résultats montrent la présence de 08 peptides dans la solution de désorption issue de l'hydrolysats de 4h ayant les masses suivantes : 805,345 ; 851,335 ; 922,438 ; 1025,520 ; 1069,803 ; 1140,582 ; 1272,696 ; 1385,765 et 1470,140 Da.

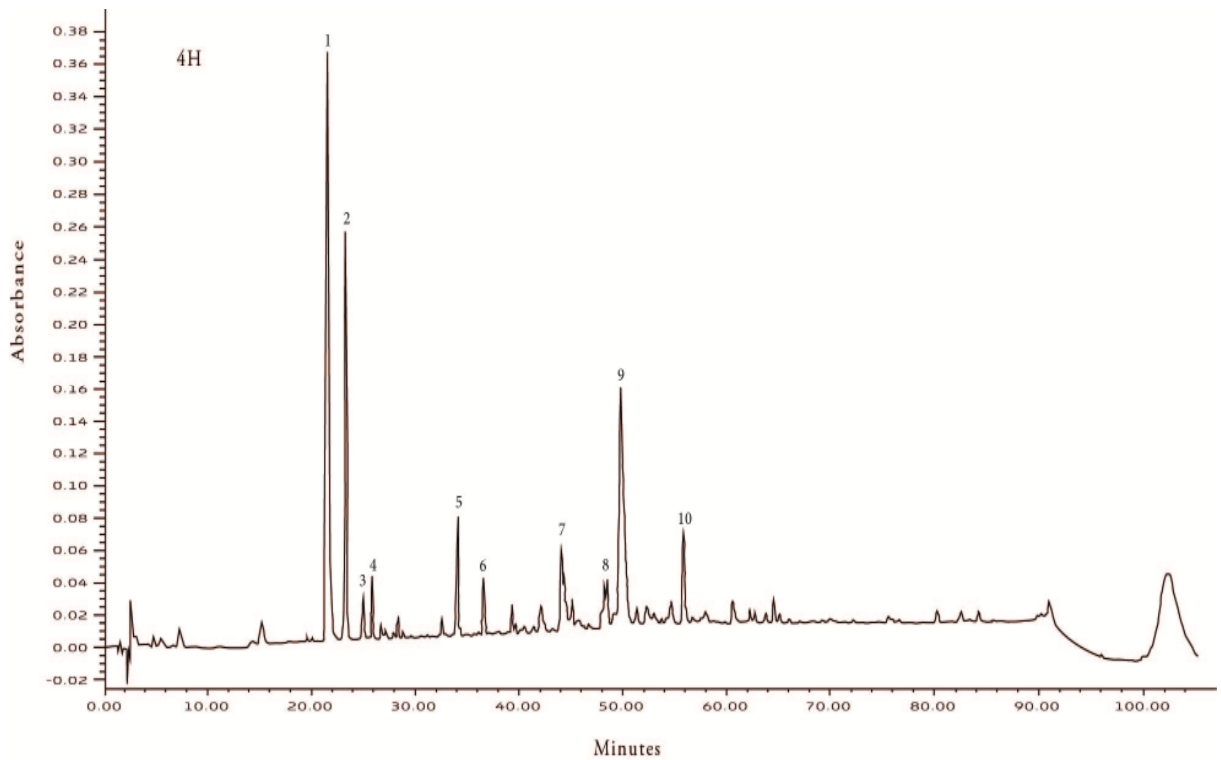


Figure 52:Chromatogramme CLHP-PI de la solution de désorption issue de l'hydrolysats de 4 h.

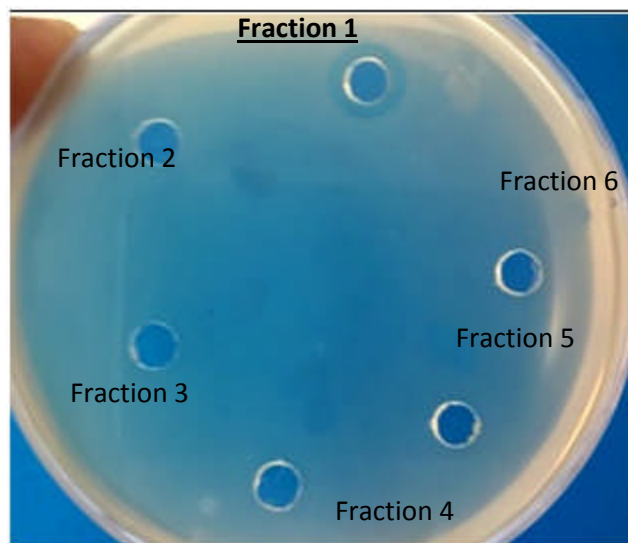
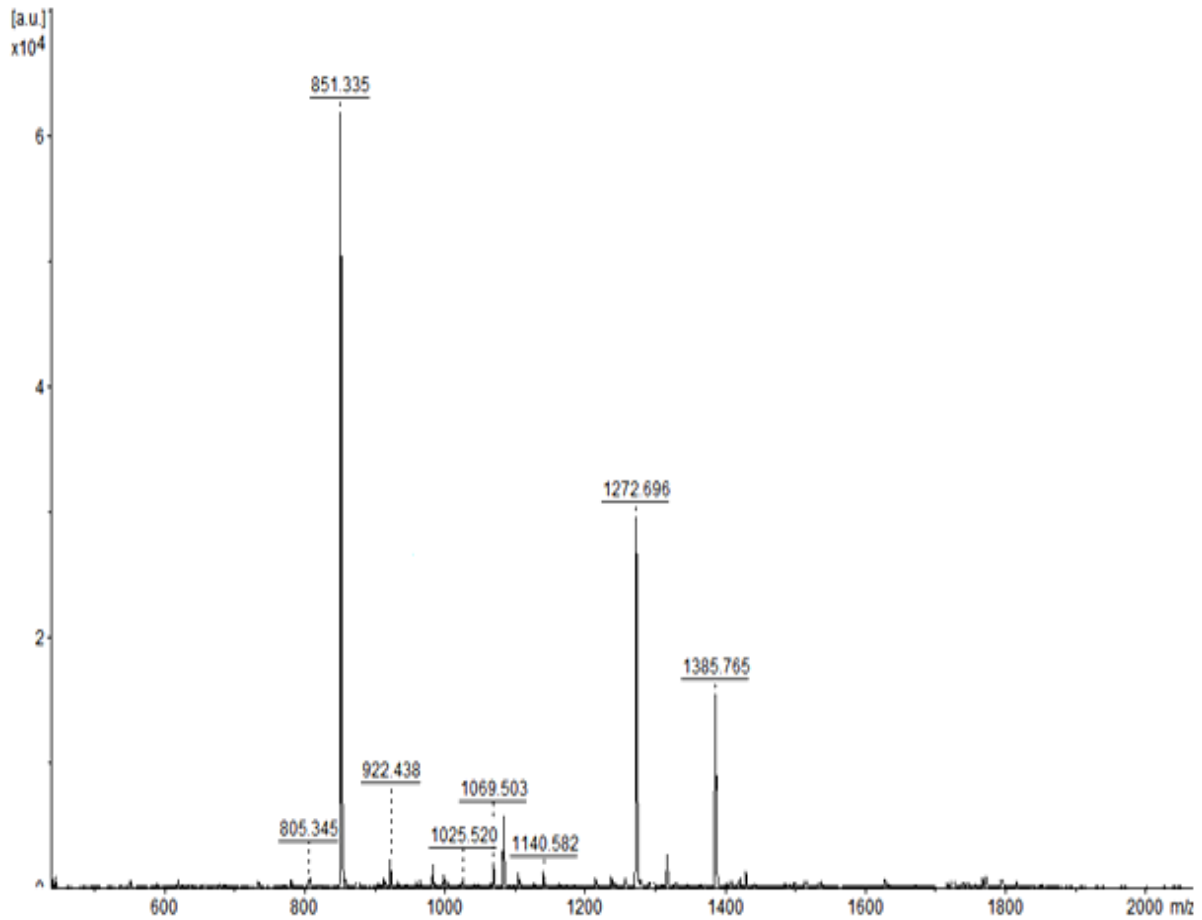


Figure 53 : Zone d'inhibition de la fraction 1 testée sur *L. innocua* LMG 11387.**Figure 54** : Spectre de masse en MALDI-TOF de la fraction de l'hydrolysat de 4h issue de la désorption.

IV.2.2.2. Identification bioinformatique

L'identification des peptides par bioinformatique était indispensable par l'emploi de deux logiciels, **BioTools** et **Sequence Editor**. Ces deux outils nous a permis à partir de séquences protéiques (des différentes sous unités de caséines α_{S1} , α_{S2} , β et κ fournies par la base UniProt) de réaliser des digestions théoriques. La recherche a été réalisée sur les différentes sous unités de caséine en précisant l'intervalle de masses (entre 500 et 2000), la séquence de la sous unité de caséine, le type d'enzyme (dans notre cas c'est une enzyme non identifiée).

La liste théorique des masses des peptides édités par *Sequence Editor* peut alors être comparée avec le spectre acquis par *BioTools*. Enfin, le logiciel traite l'ensemble des résultats de la liste et propose pour chaque ion parent une ou plusieurs séquences dont la probabilité est

définie par un score. L'utilisation de cet outil nous a permis d'améliorer la couverture de séquence et par ailleurs de localiser des peptides qui n'ont pas été préalablement identifiés. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 16.

Les résultats montrent que l'ensemble des sous unités de caséines (caséine- α_{s1} , de la caséine- α_{s2} , caséine bêta et kappa) peuvent générer des peptides actifs. En effet, La caséine- α_{s1} peut générer 08 peptides actifs, correspondants aux fragments de peptides suivants : le fragment (156-161) de masse 805,384Da ; le fragment (124-131) de masse 842,46 Da ; le fragment (79-86) avec une masse égale à 851,381Da ; le fragment (93-100) ou (177-185) de masse 1025,518 Da ; le fragment (75- 84) de masse égale à 1069,466Da ; le fragment (130-140) ou (151-161) avec une masse égale à 1316,628Da ; le fragment (146-157) de masse 1385,740Da et enfin, le fragment (133-144) ou le (141-153) de masse égale à 1407,723Da (figure 55a).

La caséine- α_{s2} peut générer 08 peptides suivants : le fragment (26-32) de masse 805,384Da ; le fragment (66-73) avec une masse égale 829,378Da ; le fragment (23-30) de masse égale à 851,381Da ; le fragment (45-52) ou (87-93) avec une masse 877,404Da ; le fragment (145-152) de masse égale à 922,436Da ; le fragment (201-208) de masse 1025,518Da ; le fragment (31-39) avec une masse de 1140,548Da et le fragment (20-32) de masse égale à 1385,40Da (figure 55b).

La caséine bêta ne peut générer que 05 peptides actifs suivants : le fragment (171-177) de masse égale à 805,384 Da ; le fragment (31-38) de masse égale à 851,381Da ; le fragment (137-144) avec une masse de 864,438Da ; le fragment (134-142) de masse de 1025,518 Da enfin, le fragment (20-32) ayant une masse égale à 1385,74 Da (figure 56a).

Finalement, 07 peptides actifs pouvant être générés à partir de la caséine kappa qui sont : le fragment (158-165) ayant une masse égale à 805,384Da ; le fragment (162-170) avec une masse de 922,436Da ; le fragment (50-57) ou le (110-119) de masse égale à 1140,548Da ; le fragment (134-144) de masse égale à 1272,674Da ; le fragment (31-40) ayant une masse de 1316,628Da et enfin, le fragment (79-90) avec une masse égale à 1385,74Da (figure 56b). Pour l'ensemble des sous unités de caséine, les masses des peptides identifiés sont de petites tailles, qui se situent entre 805 Da et 1140 Da.

Tableau 16. Masse moléculaire et séquence en acides aminés des peptides contenus dans la solution de désorption issue de l'hydrolysate de 4h de la caséine bovine

Sous unité de la caséine	Masse (Da)	Fragment ^a	Séquence
α₁	805,384	156 – 161	ELAYFY
	842,460	124 – 131	LEIVPNSA
	851,381	79 – 86	SISSEEI
	1025,518	177 – 185	GAWYYVPLG
	1025,518	93 – 100	QKHIQKED
	1069,466	75 – 84	MEAESISSE
	1316,628	130 – 140	SAEERLHSMKE
	1316,628	151 – 161	IGVNQELAYFY
	1385,740	146 – 157	QKEPMGVNQEL
	1407,723	133 – 144	ERLHSMKEGIHA
1407,723	141 - 153	GIHAQQKEPMIGV	
α₂	805,384	26 – 32	EESIISQ
	829,378	66 – 73	EYSIGSSS
	851,381	23 – 30	SSSEESI
	877,404	87 – 93	TVDDKHY
	877,404	45 – 52	PSKENLCS
	922,436	145 – 152	TSEEBSKK
	1025,518	201 – 208	HQKAMKPW
	1140,548	31 – 39	SQETYKQEK
	1385,740	103 - 119	QYLQYLYQGPI
Beta	805,384	171 – 177	MFPPQSV
	851,381	31 – 38	LSSSEESI
	864,438	137 – 144	SQSLTLTD
	1025,518	134 – 142	FTESQSLTL
	1385,740	20 - 32	ELNVPGEIVESLS
Kappa	805,384	158 – 165	EAVESTVA
	922,436	162 – 170	STVATLEDS
	1025,518	50 -57	QYVLSRYP
	1140,548	110 – 119	QAQPTTMARH
	1140,548	78 – 87	PYPYAJPAA
	1272,674	134 – 144	NQDKTEIPTIN
	1316,628	31 – 40	RCKDERFFS
	1385,740	79 - 90	YPPYAKPAAVRS

^a : position des peptides dans les différentes sous unités de la caséine.

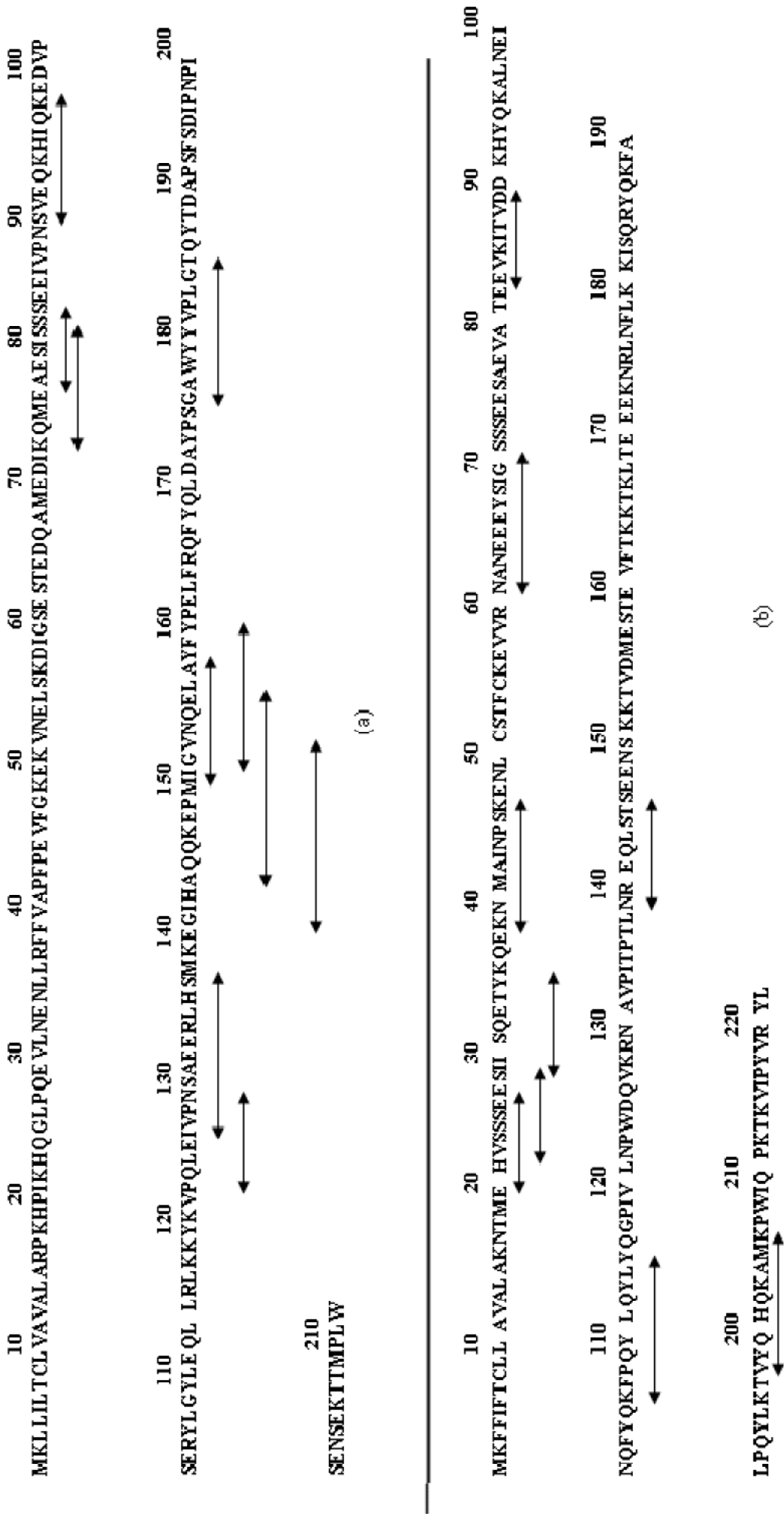


Figure 55. Représentation des peptides antimicrobiens sur la chaîne de la caséine α_{s1} (a) et de la caséine α_{s2} (b) de la solution de désorption de l'hydrolysat de 4h.

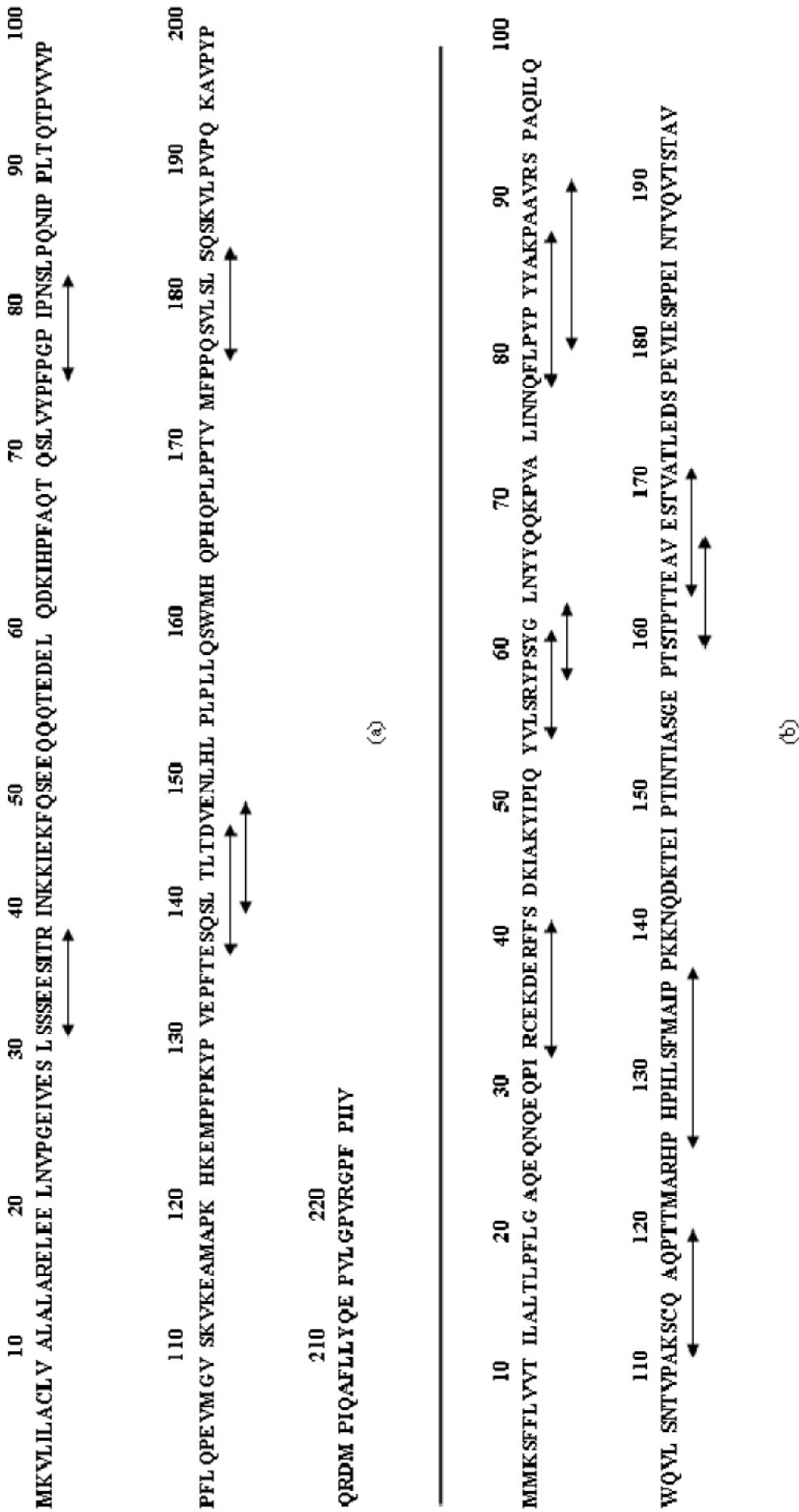


Figure 56. Représentation des peptides antimicrobiens sur la chaîne de la caséine bêta (a) et de la caséine kappa (b) de la solution de désorption de l'hydrolysats de 4h.

IV.2.2.3. Stratégie d'identification par MS/MS

La pureté de la fraction 1 a été confirmée par l'analyse en MALDI-TOF qui a montrée la présence d'un seul peptide pur avec une masse égale à 851,385 Da (figure 57). Ce résultat a été confronté à une analyse bioinformatique par l'emploi des logiciels appropriés (Biotoools et Sequence Editor ; Bruker) a fin de déterminer la ou les séquence(s) la ou les plus probable(s) ainsi leurs l'origine au niveau des différentes sous unités de caséine.

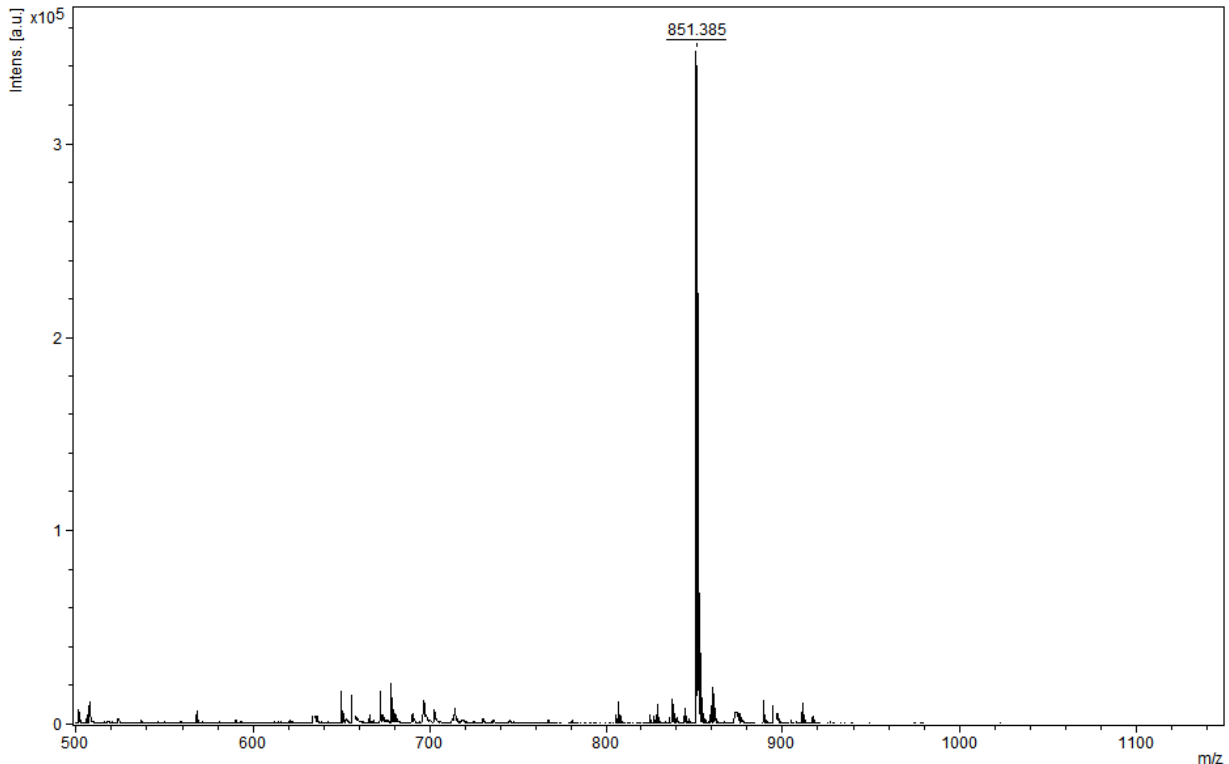


Figure 57: Spectres de masse de la fraction 1 obtenu par MALDI-TOF.

Le résultat de l'analyse présenté dans le tableau 17 montre l'existence de trois propositions de séquences pouvant être générées par trois sous unités de caséines. La séquence **SISSSEEI** correspondant au fragment (79-86) peut être générée par la sous unité α_{s1} , alors que la séquence **SSSEESI** peut être générée par la sous unité α_{s2} correspondant au fragment (24-31) et enfin, la séquence **LSSSEESI** qui correspond au fragment (31-38) peut être générée par la sous unité β .

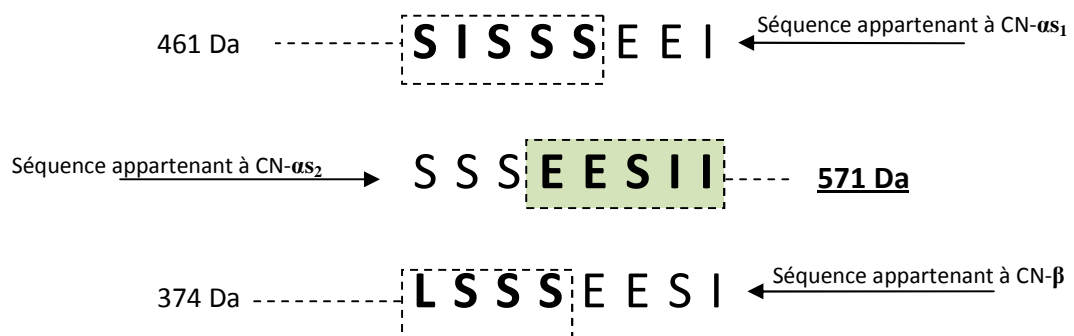
Tableau 17. Masse moléculaire et séquence en acides aminés du peptide actif contenu dans la Fraction 1

Sous unités de la caséine	Masse (Da)	Fragment ^a	Séquence
α S ₁	851,385	79 - 86	SISSEEI
α S ₂	851,385	24 - 31	SSSEESI
Béta	851,385	31 – 38	LSSSEESI

^a: position des peptides dans les différentes sous unités de la caséine.

En effet, l'approche en mode MS/MS s'est avérée nécessaire pour la détermination de la séquence exacte du peptide actif. Cette approche consiste, par définition, à reconstituer la séquence en acides aminés d'un peptide à partir de son spectre de fragmentation issu de l'analyse par spectrométrie de masse en tandem. Très souvent réalisé « à la main » sur la base des règles de fragmentation des peptides. Le résultat de l'analyse en MS/MS du peptide actif est représenté au niveau de la figure 58.

La reconstitution de la séquence du peptide actif a été réalisée par un calcul de masse de fragment non commun entre les trois séquences proposées et le comparé au spectre de fragmentation du peptide actif. L'exemple de la méthode de calcul est présenté par le schéma suivant.



Cependant, le fragment **EESI** de masse égale à **571Da** appartenant à la séquence **SSSEESI** est présent dans le spectre de fragmentation du peptide, contrairement aux deux fragments SISSEEI avec une masse égale à 461 Da et LSSSEESI de masse égale à 374 Da correspondant respectivement aux séquences SISSEEI et LSSSEESI.

Ainsi, ce raisonnement a permis d'identifier la séquence exacte du peptide actif, qui est la séquence **SSSEESII** générée par la sous unité $\alpha 2$ de la caséine bovine correspondant au fragment (24-31). Ce peptide n'a jamais été signalé dans la littérature.

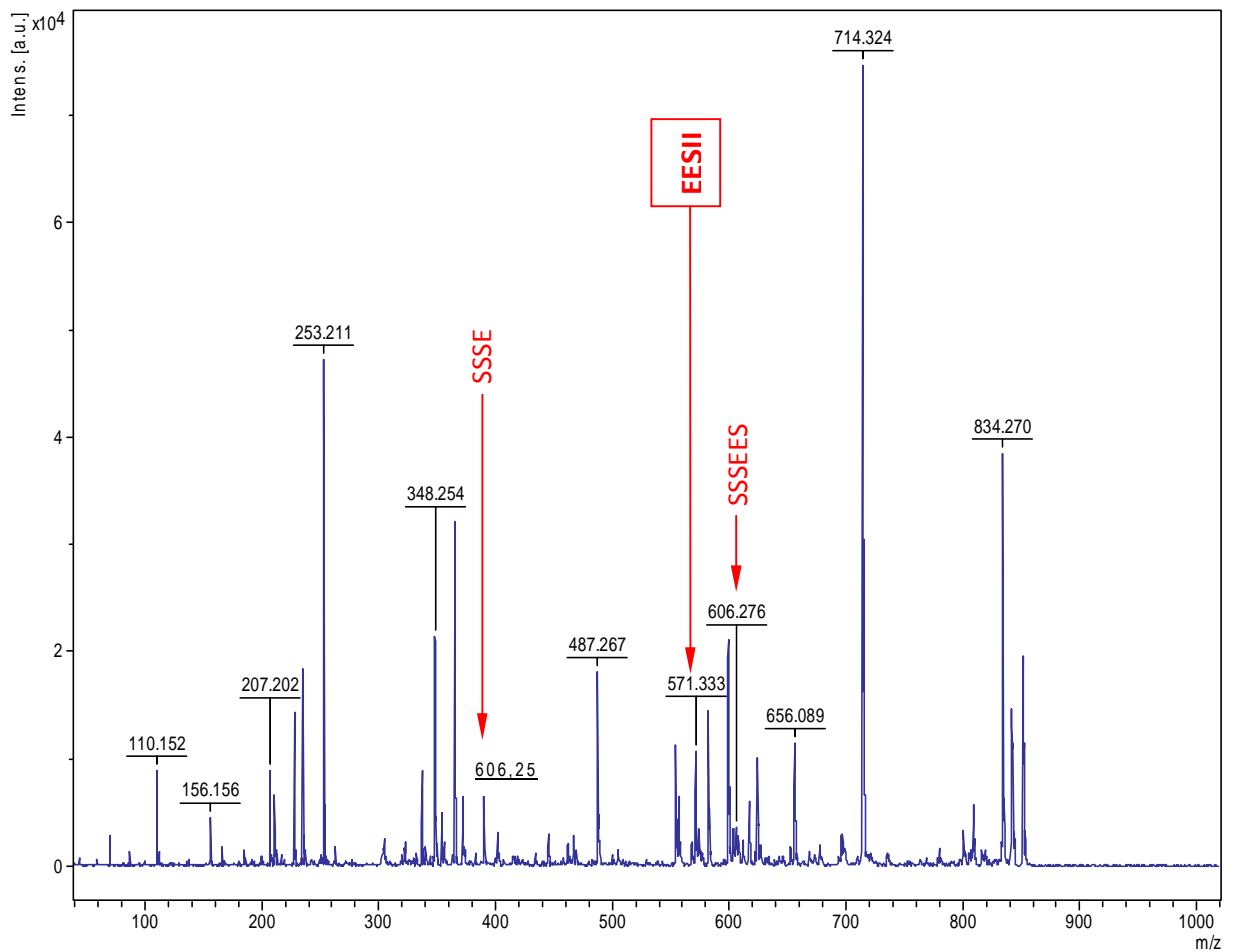


Figure 58 : Résultat de l'analyse en MS/MS du peptide actif de masse 851,385 Da.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

L'objectif de la présente étude est l'obtention de peptides antimicrobiens par hydrolyse enzymatique à partir de la caséine bovine par l'emploi d'une protéase produite par une souche locale de *Lactococcus lactis*.

Au cours de ce travail nous avons recherché à isoler une souche potentiellement protéolytique à partir d'une collection constituée de 24 souches appartenant à l'espèce *Lactococcus lactis* résidentes du microbiote du lait de chèvres, de brebis et de vaches dans le bassin laitier du moyen Chellif.

Parmi la collection de souches protéolytiques, la souche Lc.L6 identifiée en tant que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a démontré un pouvoir protéolytique assez important. Cette souche a été utilisée pour l'isolement et la purification de la protéase à partir du lait. La protéase a été purifiée à partir de surnageant de culture en utilisant de trois méthodes, l'ultrafiltration, la chromatographie échangeuse d'ions sur SP-Sépharose et enfin, par gel filtration sur Sephadex G-50 SF avec un rendement de purification de 47% et un facteur de purification égale à 5,83. La protéase purifiée est une métalloprotéase extracellulaire de masse moléculaire égalé approximativement 38KDa rarement signalée dans la littérature. C'est une enzyme présentant des caractéristiques biochimiques assez intéressantes, une plage d'activité assez large dans un intervalle de pH compris entre 5 à 9 et une température de 40 à 60°C. L'enzyme a démontrée une sensibilité vis-à-vis l'EDTA et certains ions métalliques polyvalents à savoir le Cu^{+2} , Zn^{+2} et le Fe^{+3} .

La pepsine porcine qui a démontrée la capacité de générer des peptides antimicrobiens à partir de la caséine bovine a été utilisée comme enzyme de référence. Par ailleurs, en suivant les mêmes conditions envisagées pour la pepsine porcine, la protéase purifiée de Lc.L6 a été employée pour l'obtention des peptides antimicrobiens.

Toutefois, le suivi des cinétiques d'hydrolyse pour les deux protéases a permis d'étudier leur mécanisme d'action sur caséine bovine. L'action des ces protéases sur les caséines suit un mécanisme « one by one » favorable à l'obtention de peptides intermédiaires. D'après les résultats obtenus, les peptides antimicrobiens sont des produits d'hydrolyse intermédiaires.

Dans le cas de la pepsine porcine, l'extrait peptidique enrichi en peptides antimicrobiens a pu être obtenu à partir d'hydrolysats pepsiques de caséine bovine par précipitation, sous l'effet de la force ionique et du pH. L'extrait préparé a été fractionné sur

CLHP-PI afin d'identifier les peptides actifs par analyses en LC/MS et en MALDI-TOF. L'ensemble des peptides actifs identifiés est, principalement, issu de la caséine α_{s2} et de la caséine α_{s1} . Il comprend les fragments (164-179), (148-166), (180-207) (183-207) et (176-207) de la caséine α_{s2} bovine dont l'activité est déjà signalée dans des études précédentes (Recio et Visser, 1999 ; Mc Cann *et al.*, 2005) et de nouveaux éléments actifs, non reportés dans la littérature, correspondant aux peptides (131-174), (153-196), (99-137) (99-163/100-164), (114-176) (115-174), (126-184), (28-90), (138-184) de la caséine α_{s2} et (9-68/70-126) de la caséine α_{s1} . L'extrait peptidique renferme un taux considérable du fragment α_{s2} (164-207) qui représente le peptide le plus actif parmi le groupe de peptides antimicrobiens issus des fractions α s de la caséine bovine.

L'extrait peptidique ainsi que le peptide α_{s2} (164-207) séparé à l'état pur, ont présenté des valeurs de CMI plus faibles sur les souches à Gram-positif que sur les souches à Gram-négatif testées. L'extrait peptidique, a montré une activité comparable à celle de la nisine contre *L. innocua* et *L. monocytogène* (CMI = 30,14 μ g/ml et 60,28 μ g/ml contre 31,25 μ g/ml et 62,5 μ g/ml respectivement). Cela nous incite à envisager l'étude de l'emploi de cet extrait dans le milieu alimentaire.

L'extrait peptidique ainsi que le peptide α_{s2} (164-207), employés à leurs CMI respectives, présentent un effet bactériostatique sur les bactéries à Gram-positif et un effet bactéricide sur les souches à Gram-négatif. L'effet positif observé, de ces peptides, sur les souches à Gram-négatif constitue un résultat très encourageant du fait que la majeure partie des peptides identifiés, de différentes origines, tels que les bactériocines, ne sont actifs que sur les souches à Gram-positif.

Dans le cas de protéase purifiée de Lc.L6, un seul peptide *anti-listéria* a pu être obtenu à partir d'un hydrolysat de caséine bovine par la méthode d'adsorption et de désorption. L'extrait a été fractionné par CLHP-PI afin d'identifier les peptides actifs par analyses en MALDI-TOF et en MS/MS. Le peptide actif identifié comme étant le fragment (24-31) de masse égale à 851,382 Da et pour séquence SSSEESII générée par de la caséine α_{s2} . Ce peptide actif n'a jamais été rapporté dans la littérature.

A partir de ces résultats encourageants, plusieurs recommandations peuvent être envisagées afin d'améliorer les moyens pour la génération et la production des peptides antimicrobiens.

Approfondir l'étude sur la détermination de la structure de la protéase Lc.L6 pour mieux comprendre son mécanisme d'action vis-à-vis les protéines.

- L'optimisation des conditions de protéolyses s'avère indispensable pour l'obtention d'autres catégories de peptides actifs ayant un spectre d'activité plus large contre les germes pathogènes et d'altération.
- L'optimisation et la recherche des techniques de purifications, de fractionnements et d'identifications des peptides antimicrobiens.
- Etudier et optimiser la technique d'immobilisation d'enzyme afin d'augmenter le rendement de production des peptides d'intérêts.
- Chercher d'autres protéases microbiennes à utilisation alimentaire, ayant des caractéristiques encore intéressantes (plus de stabilité, plage d'activité plus large, mode d'action différent...)
- Etudier et optimiser la possibilité d'emploi des peptides actifs dans la conservation des aliments.
- Développer des technologies nouvelles, telles que les techniques chromatographiques et de séparation par membrane, pour l'obtention des fractions enrichis de peptides actifs à partir des hydrolysats de diverses protéines alimentaires permettant leur utilisation en milieu alimentaire.
- Elargir l'étude à d'autres protéines moins onéreuses et plus disponibles, tels que les protéines du lactosérum et les protéines végétales.

Références bibliographiques

1. **Akuzawa R. et Okitani A., (1995)** Purification and characterization of a cysteine proteinase with low activation energy from *Lactococcus lactis ssp lactis* IAM 1198. *J Dairy Sci* 78, 2609-2616.
2. **Akuzawa R., Yagi N., Kmura M. et Okitani A.,(1994)** Purification and characterization of serine proteinase from *Lactococcus lactis ssp. lactis* IAM 1198. *Anim. Sci. Technol.* 65:32.
3. **Akuzawa R., Yokoyama K., Matsuishi M. et Okitani A., (1990)** Isolation and partial characterization of intracellular proteinases in *Lactococcus lactis ssp lactis* IAM 1198. *J Dairy Sci.* 73, 3385-3392.
4. **Arnolds F.H., Wintrode P.L. et Miyazaki K., (1998).** How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends Biochem. Sci.* 26:100-106.
5. **Andres E. et Dimarcq J. L., (2007).** Peptides antimicrobiens cationiques : de l'étude de l'immunité innée à la production de médicaments : mise à jour. *Revue générale : Médecine et maladies infectieuses*, 37, 194-199.
6. **Alloing G., de Philip P. et Claverys J.P. (1994).** Three highly homologous membrane-bound lipoproteins participate in oligopeptide transport by the Ami system of the Gram-positive *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Biol.* 241, 44-58.
7. **Banks D.J., Porcella S.F., Barbian K.D., Beres S.B., Philips L.E., Voyich J.M., DeLeo F.R., Martin J.M., Somerville G.A., and Musser J.M. (2004).** Progress toward characterization of the group A *Streptococcus* metagenome: complete genome sequence of a macrolide-resistant serotype M6 strain. *J Infect Dis.* 190, 727-738.
8. **Beavis R.C., et Chait B.T., (1996).** Matrix –assisted desorption ionization mass spectrometry in high resolution separation analysis of biological macromolecules. Part A Fundamentals, B.L. Karger and W.S. Hankok, Editors, Academic Press: San Diego, 519-551.
9. **Bechinger B. et Zasloff M., Opella S.J. (1993).** Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Sci* 2(12):2077-84.
10. **Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K. and Tomita, M. (1992b).** Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim Biophys Acta*, 1121(1-2), 130-136.
11. **Benkerroum, N. (2010).** Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review. *J. Dairy Technol.* 63:320-338.

12. **Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K. and Tomita M., (1992b)**. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1121, 130–136.
13. **Beynon R. J. and Bond J.S., (1992)** Proteolytic enzymes : A Practical Approach. IRL Press at Oxford University Press, Oxford.259.
14. **Bessalle R., Haas H., Gorla A., Shalit I., Fridkin M. (1992)**. Augmentation of the antibacterial activity of magainin by positive-charge chain extension. *Antimicrob. Agents Chemother* **36** (2): 313-7.
15. **Boman H. G., (2000)**. Innate immunity and the normal microflora. *Immunol. Rev* **173**: 5-16.
16. **Boman H. G., (2003)**. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med* 254 (3): 197-215.
17. **Boman, H. G. and Hultmark D., (1987)**. Cell-free immunity in insects. *Annu. Rev Microbiol* **41**: 103-126
18. **Blondelle S. E. et Lohner K., (1999)**. Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity. *Biochim Biophys Acta* **1462** (1-2): 89-108.
19. **Biemann K., (1990)**. Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). *Methods Enzymol.*, 193, 886-887.
20. **Biggadike H.J., Ohnstad I., Laven R.A. and Hillerton .E., (2002)** Evaluation of measurements of the conductivity of quarter milk samples for the early diagnosis of mastitis. *The Veterinary Record*, **150** : 655-658
21. **Brogden K. A., (2005)**. Antimicrobial peptides : pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* **3**(3): 238-50.
22. **Brogden K. A. et Ackermann M., (2003)**. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int J Antimicrob Agents* **22**(5): 465-78.
23. **Bulet P. Stocklin R., (2004)**. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* **198**: 169-84.Chen *et al.* 20
24. **Boekhorst J., Siezen R.J., Zwahlen M.C., Vilanova D., Pridmore R.D., Mercenier A., Kleerebezem M., de Vos W.M., Brüssow H. and Desiere F., (2004)** The complete genomes of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus johnsonii* reveal extensive differences in chromosome organization and gene content. *Microbiology* **150**: 3601–3611.

25. **Bradford M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*; 72: 248-254.
26. **Branen A.L. and Davidson P.M. (1983)**. Antimicrobials in foods, In: Marcel Decker Editor, 1993, Food science and technology (Marcel Dekker, Inc), New York, USA, p. 465.
27. **Brogden K. A., Ackermann M., Mc Cray P. B., Tack Jr.B.F. (2003)** Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22, 465-478.
28. **Brogden K.A. (2005)**. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Rev. Microbiol.* 3:238-250.
29. **Bruinenberg P.G., Doesburg P., Alting A.C., Exterkate F.A., deVos W.M., and Siezen R.J. (1994)**. Evidence for a large dispensable segment in the subtilisin-like catalytic domain of the *Lactococcus lactis* cell-envelope proteinase. *Protein Eng.* 7, 991-996.
30. **Brul S. and Coote P., (1999)** Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* **50** (1-2): 1-17.
31. **Buist G., Karsens H., Nauta A., van Sinderen D., Venema G. and Kok J., (1997)** Autolysis of *Lactococcus lactis* caused by induced overproduction of its major autolysin, AcmA. *Appl Environ Microbiol* 63:2722–2728
32. **Bulet P., Stöcklin R. et Menin L. (2004)** Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev.*198:169-84.
33. **Burt S., (2004)**. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94:223-253.
34. **Buyong N., Kok J. and Luchansky J.B. (1998)**. Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis subsp. lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in Cheddar cheese. *Appl. Envir. Microbiol.* 64:4842—4845.
35. **Caplice E. and Fitzgerald G., (1999)** Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **50**(1-2): 131-149.
36. **Castro M. S. and Fontes W., (2005)**. Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein Pept Lett* **12**(1): 13-8.

37. **Charbonnel P., Lamarque M., Aubel D., Piard J., Juillard V. and Atlan D., (2004).** Qui régit la spécificité de transport des oligopeptides chez *Lactococcus lactis* ? *Lait*. 84, 95-102.
38. **Church F.C., Swaisgood H.E., Porter D.H., and Catignani G.L., (1983)** Spectrophotometric assay using O-PhthaldiAldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science* ; 66: 1219-1227.
39. **Clare D. A. and Swaisgood H. E., (2000)** Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of Dairy Science* 83 1187–1195.
40. **Coolbear T., Reid J. R. and Pritchard G.G., (1992)** Stability and Specificity of the Cell Wall-Associated proteinase from *Lactococcus lactis subsp. cremoris* H2 Released by Treatment with lysozyme in the Presence of Calcium Ions. *Applied and Environmental Microbiology*, Oct. 1992, 3263-3270.
41. **Collins M.D., Ash C., Farrow J.A.E., Wallbanks S. and Williams A.M. (1989)** 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov., sp. nov. *Journal of Applied Bacteriology* 67, 453–460.
42. **Cowland J. B., Johnsen A. H., Borregaard N. (1995)** hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett.*, 368 : 173-176.
43. **Dashper S.G., Liu S.W., Dalgalarrrondo M., Chobert J.M., Dufour E., Bertrand-Hard C, Dumont J.P. and Haertlé T., (1990).** Characterization of bovine β -lactoglobulin a tryptic peptides by reverse-phase high performance liquid chromatography. *Milchwissenschaft* 45:212-216.
44. **Dashper S.G., Liu S.W. and Reynolds E.C., (2007).** Antimicrobial peptides and their potential as oral therapeutic agents. *Int. J. Peptides Res. Therap.* 13:505-516.
45. **Dathe M., Meyer J., Beyermann M., Maul B., Hoischen C., Bienert M. (2002).** General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. *Biochim Biophys Acta* **1558** (2): 171-86.
46. **Dathe, M. and Nikolenko H., Meyer J., Beyermann M., Bienert M. (2001).** Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett* **501**(2-3): 146-50.
47. **Davies J. and Davies D., (2010).** "Origins and evolution of antibiotic resistance." *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* **74**(3): 417-433.

48. **De Castro R. J. S. and Sato H. H., (2015).** Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries review. *Food Research International* 74 (2015) 185–198.
49. **Dellaglio F., de Roissart H., Torriani S., Curk M.C, and Janssens D., (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In *bactéries lactiques*, 25-116. Edited by H. de Roissart and F.M. Luquet. Uriage, France : Loriga.
50. **Delorme C., Bartholini C., Bolotine A., Ehrlich S.D., and Renault P. (2010).** Emergence of a cell wall protease in the *Streptococcus thermophilus* population. *Appl Environ Microbiol.* 76,:451-60.
51. **Demers-Mathieu V., Gauthier S.F., Britten M., Fliss I., Robitaille G. and Jean, J. 2011.** Antimicrobial activity of peptide extracts from a tryptic whey protein hydrolysate against food pathogens.
52. **Dennison S. R., Wallace J., Harris F. et Phoenix D. A. (2005)** Amphiphilic α -helical antimicrobial peptides and their structure/function relationships. *Protein and Peptide Letters*, 12, 31-39.
53. **De Vuyst L., and Frederic L. (2007)** Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13: 194–199.
54. **Diamond G. and Beckloff N., Weinberg A. and Kisich K.O. (2009).** The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr Pharm Des* 15(21): 2377-92.
55. **Dieye Y., Oxaran V., Ledue-Clier F., Alkhakaf W., Buist G., Juillard V., Lee C. W., and Piard J. C. (2010).** Functionality of Sortase A in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 76, 7332-7337.
56. **Doeven M.K., van den Bogaart G., Krasnikov V., and Poolman B. (2008).** Probing receptor \dot{R} translocator interactions in the oligopeptide ABC transporter by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J.* 94, 3956-3965.
57. **Doyen A., Beaulieu L., Saucier L., Pouliot Y. and Bazinet L., (2011).** Impact of ultrafiltration membrane material on peptide separation from a snow crab by product hydrolysate by electro dialysis with ultrafiltration membranes. *Agr. Food Chem.* 59:1784-1792.
58. **EFSA, (2005)** EFSA scientific colloquium summary report. QPS Qualified Presumption of Safety of micro-organisms in food and feed, 13-14 December 2004, Brussels, Belgium. ISBN 92-9199-012-4.

59. **Ehrenstein G. and Lecar H., (1977).** Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q Rev Biophys* **10**(1): 1-34.
60. **Ehret-Sabatier L., Loew D., (1996).** Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. *J Biol Chem* **271**(47): 29537-44.
61. **Espeche-Turbay M.B., Savoy de Giori G., and Hebert E.M. (2009).** Release of the cell-envelope-associated proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *lactis* CRL 581 is dependent upon pH and temperature. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **57**: 8607-8611.
62. **Enrique M., Manzanares P., Yuste, M. Martine, M., Vallè, S and, Marcos, J.F., (2009).** Selectivity and antimicrobial action of bovine lactoferrin derived peptides against wine lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* **26**:340-346.
63. **Fales-Williams A. J. and Brogden K. A., (2002).** Cellular distribution of anionic antimicrobial peptide in normal lung and during acute pulmonary inflammation. *Vet Pathol* **39**(6): 706-711.
64. **Flambard B., Helinck S., Richard J. and Juillard V., (1998)** The Contribution of Caseins to the Amino Acid Supply for *Lactococcus lactis* depends on the Type of Cell Envelope Proteinase. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1991–1996.
65. **Expósito I.X. and Recio, I., (2006).** Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins. *Int. Dairy J.* **16**:1294-1305.
66. **Fernandez-Espla M.D., Garault P., Monnet V. and Rul F., (2000)** *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl Environ Microbiol* **66**:4772–4778.
67. **Firdaous L., Dhulster P., Amiot J., Gaudreau A., Lecouturier D., Kapel R., Lutin F., Véniza L.P. and Bazinet L., (2009).** Concentration and selective separation of bioactive peptides from an alfalfa white protein hydrolysate by electro dialysis with ultrafiltration membrane. *J. Membrane Sci.* **329**:60-67.
68. **Fox P.F., Singh T.K. and McSweeney P.L.H., (1995)** Biogenesis of flavour compounds in cheese. In: *Chemistry of Structure-Function Relationships in Cheese* (EL Malin, MH Tunick, eds) Plenum Press, New York, USA.
69. **Furtterman S. and Heller J., (1972).** The enhancement of fluorescence and the decreased susceptibility to enzymatic oxidation of retinol complexed with bovine serum albumin, B-lactoglobulin and the retinol-binding protein of human plasma. *J. Biol. Chem.* **247**:5168-5172.

70. **Gauthier S.F. and Pouliot Y., (2003).** Functional and biological properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins. *J. Dairy Sci.* 86:E78-E87.
71. **Galia W., Perrin C., Genay M., and Dary A. (2009).** Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. *Int. Dairy J.* 19 (2), 89-95.
72. **Garault P., Letort C., Juillard V., and Monnet V. (2000).** Branched-chain amino acid biosynthesis is essential for optimal growth of *Streptococcus thermophilus* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5128-5133.
73. **Garault P., Le Bars D., Besset C., and Monnet V. (2002).** Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus thermophilus*. *J Biol Chem.* 277: 32-39.
74. **Gardan R., Besset C., Guillot A., Gitton C., and Monnet V. (2009).** The oligopeptide transport system is essential for the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* strain LMD-9. *J. Bacteriol.* 191, 4647-4655.
75. **Gazit E. and Boman A., Boman H.G., Shai Y. (1995).** Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles. *Biochemistry* 34 (36): 11479-88.
76. **Gennaro R. and Zanetti M., (2000).** Structural features and biological activities of the cathelicidin derived antimicrobial peptides. *Biopolymers* 55 (1): 31-49.
77. **Germond J.E., Delley M., Gilbert C., and Atlan D. (2003).** Determination of the domain of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cell surface proteinase PrtB involved in attachment to the cell wall after heterologous expression of the *PrtB* gene in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 69: 3377-3384.
78. **Gilbert C., Atlan D., Blanc B., Portalier R., Germond G.J., Lapierre L. and Mollet B., (1996).** A new cell surface proteinase: sequencing and analysis of the prtB gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *J Bacteriol* 178:3059–3065
79. **Godfrey T. and West S., (1996).** Introduction to industrial enzymology. In: Godfrey T., West S. (Eds), *Industrial Enzymology*, second éd., Stockholm Press, New York, USA, p. 1-7
80. **Gobbetti M.P., Ferranti E., Smacchi F., Goffredi and Addeo F., (2000).** Production of angiotensin-I- converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Appl Environ Microbiol* 66: 3898-3904.

81. **Guani-Guerra E. and Santos-Mendoza T., (2010).** Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol* **135**(1): 1-11.
82. **Guiraud J.P.(1998).** *Microbiologie alimentaire*. Ed: Dunod Paris, France : 36-37.
83. **Haque E. and Chand R., (2008).** Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. *Eur. Food Res. Technol.* **227**:7-15.
84. **Hamasaki Y., Ayaki M., Fuchu H., Sugiyama M. and Morita H. (2003).** Behavior of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from spoiling cooked meat products. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 3668-3671.
85. **Hancock R. E. and Chapple D. S., (1999).** Peptide antibiotics. *Antimicrobial Agents Chemother* **43**(6): 1317-23.
86. **Hara T. Mitani Y, Tanaka K, Uematsu N, Takakura A, Tachi T, Kodama H, Kondo M, Mori H, Otaka A, Nobutaka F, Matsuzaki K. (2001).** Heterodimer formation between the antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa in lipid bilayers: a cross-linking study. *Biochemistry* **40**(41): 12395-12399
87. **Hayes M., Ross R. P., Fitzgerald G. F., Hill C. and Stanton C., (2006)** Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 2260 –2264..
88. **He K., Ludtke S.J., Worcester D.L., Huang H.W. (1996).** Neutron scattering in the plane of membranes: structure of alamethicin pores. *Biophys J* **70** (6): 2659-66.
89. **Helinck S., Richard J. and Juillard V., (1997)** The effects of adding lactococcal proteinase on the growth rate of *Lactococcus lactis* in milk depend on the type of the enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2124–2130.
90. **Hernández-Ledesma B., Recio I., Amigo L., (2008).** P-Lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino Acids* **35**:257-265.
91. **Hickey R. M., Twomey D. P., Ross R. P., and Hill C., (2003).** Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors. *Microbiology* **149**:655–664.
92. **Hiron A., (2007).** Les transporteurs de peptides de *Staphylococcus aureus*. Thèse de l’Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l’Environnement, Agro Paris Tech.
93. **Holk A. and Naes H., (1992).** Cloning sequencing and expression of the gene encoding the cell-envelope associated proteinase from *Lactobacillus paracasei* NCDO 151. *Journal of General Microbiology* **138**, 1353-1364.

94. **Huang H. W., (2000).** Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry* 39(29): 8347-52.
95. **Huffman L.M. and Harper W.J., (1999).** Symposium: marketing dairy value through technology: maximizing the value of milk through separation technologies. *J. Dairy Sci.* 82, 2238-2244.
96. **Jean J. and Turgeon E., (2009).** Les protéines du lactosérum: une source potentielle de peptides antimicrobiens. Colloque STELA/symposium, Université Laval, Québec, QC, CA, 1 mai 2009.
97. **Jenssen H., Hamill P. and Hancock R.E.W., (2006).** Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 19:491-511.
98. **Juillard V., Laan H., Kunji E., Jeronimus-Stratingh C.M., Bruins A. and Konings W., (1995)** The extracellular PI-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes β -casein into more than one hundred different oligopeptides. *J Bacteriol* 177, 3472–3478.
99. **Karam H. and Karam N.E., (2006).** Bactéries lactiques du lait de chamelle du sud d'Algérie. Mise en évidence des souches de *Lactococcus* résistante au sel. *Tropicultura*, 24, 153-156.
100. **Kawabata S. and Iwanaga S., (1999).** Role of lectins in the innate immunity of horseshoe crab. *Dev Comp Immunol* 23 (4-5): 391-400.
101. **Korhonen H. and Marnila P., (2002).** Lactoferrin. In: Roginski, H., Fuguay, J.W., Fox, P.F. *Encyclopedia of dairy sciences*, Academic Press, London, UK, p. 1946-1950.
102. **Kok J., Leenhouts K.J., Haandrikman A.J., Ledeboer A.M. and Venema G., (1988)** Nucleotide sequence of the cell wall proteinase gene of *Streptococcus cremoris* Wg2. *Appl Environ Microbiol* 54:231–238.
103. **Korhonen H. and Pihlanto A., (2007).** Technological options for the production of health-promoting proteins and peptides derived from milk and colostrum. *Curr. Pharm. Des.* 13:829-843.
104. **Kussmann M., Nordhoff E., Rabek-Nielsen H., Heabel S., Rossel-larsen M., Jakobsen L., Gobom J., Mirgorodskaya E., Kroll-Kristensen A., Palm L., and Roepstoff P., (1997).** Matrix-assisted laser desorption/ ionization mass spectrometry sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes. *J. Mass Spectrom.*, 32, 593-601.

105. **Kunji E.R., Fang G., Jeronimus-Straitingh C.M., Bruins A.P., Poolman B. and Konings W.N., (1998).** Reconstruction of the proteolytic pathway for use of beta-casein by *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*. 27: 1107-1118.
106. **Kunji E.R.S., Mierau I., Hagting A., Poolman B., and Konings W.N. (1996).** The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 187-221.
107. **Kunji E., Hagting A., De Vries C., Juillard V., Haandrikman A., Poolman B. and Konings W.N., (1995)** Transport of β -casein-derived peptides by the oligopeptide transport system is a crucial step in the proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem* 270:1569–1574
108. **Kusuda R., Kawai K., Salati F., Banner C.R., Fryer J.L., (1991).** *Enterococcus seriolicida* sp.nov., a fish pathogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41, 406-409.
109. **Laan H. and Konings W. N., (1991)** Autoproteolysis of the extracellular serine proteinase of *Lactococcus lactis subsp. cremoris* Wg2. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2586-2590.
110. **Laemmli U. K., (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
111. **Lahov E. and Regelson W., (1996).** Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: Casecin, isracidin peptides. *Food Chem. Toxicol.* 34:131-145.
112. **Lai R. and Liu H., (2002).** An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. *Biochem Biophys Res Commun* 295 (4): 796-9.
113. **Lai Y. and Gallo R. L., (2009).** AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol* 30(3): 131-41.
114. **Law J. and Haandrikman A., (1997).** Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 7, 1-11.
115. **Lemaitre B. and Hoffmann J., (2007).** The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* 25: 697-743.
116. **Leroy, F. and De Vuyst, L. (2004).** Lactic Acid Bacteria as Functional Starter Cultures for the Food Fermentation Industry. *Food Science and Technology*, 15, 67-78.
117. **Letort C, Juillard V (2001).** Development of a minimal chemically defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. *J. Appl. Microbiol.*, 91: 1023-1029.

118. **Linderstrom-Lang K., (1952).** The initial stages in the breakdown of proteins by enzymes. proteins and Enzymes III. Lane Medical Lectures, Stanford University Press California, 6, 53-72.
119. **Madureira A.R., Tavares T., Gomes A.M.P., Pintado M.E. and Malcata F.X., (2010).** Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. J. Dairy Sci. 93:437-455.
120. **Maeno M., Yamamoto N., and Takano T., (1996).** Identification of an Antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. Journal of Dairy science 79: 1316-1321.
121. **Marshall S. H. et Arenas G., (2003)** Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. Electronic Journal of Biotechnology. Vol.6, No.2, 271-284.
122. **Martin-Hernandez M.C., Alting, A.C. and Exterkate, F.A. (1994)** Purification and characterization of the mature, membrane associated cell-envelope proteinase of *Lactobacillus helveticus* L89. *Applied Microbiology and Biotechnology* **40**, 828-834.
123. **Matar C, LeBlanc J G, Martin L. and Perdigon G., (2003)** Biologically active peptides released in fermented milk: role and functions. In Handbook of Fermented Functional Foods, 177–199. Farnworth E R, ed. Boca Raton: CRC Press Inc.
124. **Matsuzaki K., Harada M., Funakoshi S., Fujii N., Miyajima K. (1991).** Physico-chemical determinants for the interactions of magainins 1 and 2 with acidic lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* **1063**(1): 162-70.
125. **Matsuzaki K. and Sugishita K., Fujii N., Miyajima K. (1995).** Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemistry* **34**(10): 3423-9.
126. **Maubois J.L. et Léonil J., (1989).** Peptides du lait à activité biologique. *Lait* 69:245-269.
127. **Malkoski M., Dashper S. G., O'Brien-Simpson N. M., Talbo G. H., Marcis M., Cross K. J. and Reynolds E. C., (2001).** Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 2309–2315.
128. **Martin-Hernandez M., Alting C.A. and Exterkate F., (1994).** Purification and characterization of the mature, membrane-associated cell-envelope proteinase of *Lactobacillus helveticus* L89. *Apl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 828-834.
129. **Mangoni M.L., Papo N., Barra D., Simmaco M., Bozzi A., Di Giulio A. and**

- Rinaldi A.C. 2004.** Effects of the antimicrobial peptide temporin L on cell morphology, membrane permeability and viability of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 380:859-865.
130. **Maruyama S., Mitachi H., Awaya J., Kurono M., Tomizuka N. and Suzuki H., (1987)** Angiotensin Converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of α 1-casein, *Agric. Biol. Chem.* 51 2557–2561.
131. **McCann K. B., Shiell B. J., Michalski W. P., Lee A., Wan J., Roginski H. and Coventry M.J. (2005).** Isolation and characterization of antibacterial peptides derived from the f (164–207) region of bovine α S2-casein. *International Dairy Journal*, 15, 133–143.
132. **Meisel H. (1998).** Overview on milk protein-derived peptides. *Int. Dairy J.* 8:363-373.
133. **Meisel H. and FitzGerald R. J., (2003).** Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1289–1295.
134. **Meijer W., Marugg Joey D. and Hugenholtz J., (1996).** Regulation of Proteolytic Enzyme Activity in *Lactococcus lactis*. *Applied and environmental microbiology*, 62, 1, 156–161
135. **Minervini F., Algaron F., Rizzello C.G., Fox P.F., Monnet V. and Gobetti M., (2003)** Angiotensin I-Converting-Enzyme-Inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 Proteinase hydrolyzed caseins of milk from six species. *Applied and Environmental Microbiology*; 69:297–5305.
136. **Morales P., Fernandez-Garcia E., Gaya P., Medina M. and Nunez M., (2001)** Hydrolysis of caseins and formation of hydrophilic and hydrophobic peptides by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes' milk cheese. *Journal of Applied Microbiology* 91, 907–915.
137. **Monnet V., (2006).** *Streptococcus thermophilus*, un streptocoque atypique et sympathique. *Bulletin de la Société Française de Microbiologie.* 21, 23-28.
138. **Monnet V., Nardi M., Chopin A., Chopin M.C. and Gripon J.C., (1994)** Biochemical and genetic characterization of PepF, an oligopeptidase from *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem* 269, 32070-32076.
139. **Muset G., Monnet V., and Gripon, J.C., (1989)** Intracellular proteinase of *Lactococcus lactis ssp lactis* NCDO 763. *J Dairy Res* 56, 765-778.

140. **Nakamura Y.N., Yamamoto N., Sakai K., Okubo A., Yamazaki S. and Takano K., (1995).** Purification and characterization of angiotensin-I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J Dairy Sci* 78: 777-783.
141. **Germond J.E., Delley M., Gilbert C., and Atlan D. (2003).** Determination of the domain of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cell surface proteinase PrtB involved in attachment to the cell wall after heterogenous expression of the *PrtB* gene in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 69: 3377-3384.
142. **Ng-Kwai-Hang K.F., (2003).** Milk proteins: Heterogeneity, fractionation and isolation. In: Dow, J., Other A.N. (Eds) *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Academic Press, Amsterdam, p. 1881-1894.
143. **Nielsen P.M., Petersen D., Dambmann C., (2001)** Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science*; 66:642-646.
144. **Nikaido H., (1994).** "Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux." *Science* 264(5157): 382-388.
145. **Nissen-Meyer J. and Sletten K., (1991.)** Purification and characterization of the free form of the lactococcal extracellular proteinase and its autoproteolytic cleavage products. *Journal of General Microbiology* (1991), 137, 161 1-1618.
146. **Norberg E., Hogeveen H., Korsgaard I.R., Friggens N.C., Sloth K.H.M.N., Lovendahl P., (2004).** Electrical conductivity of milk: ability to predict mastitis status. *J. Dairy Sci.*, , 87 : 1099-1107
147. **North M.J., (1982).** Comparative biochemistry of the proteinases of eukaryotic microorganisms. *Microbiological Review*, 46, 308–340.
148. **Ohmiya K. and Sato Y., (1975).** Purification and properties of intracellular proteinase from *Streptococcus cremoris*. *Appl Microbiol* 30, 738-745.
149. **Orsi N., (2004).** The antimicrobial activity of lactoferrin: Current status and perspectives. *Bio Metals* 17:189-196.
150. **Papiz M.Z., Sawyer L., Eliopoulos E.E., North A.C.T., Findlay J.B.C, Sivaprasadarao R., Jones T.A., Newcomer M.E. and Kraulis P.J., (1986).** The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature* 324:383-385.
151. **Park C. H., Valore E. V., Waring A.J. and Ganz T., (2001).** Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276(11): 7806-10.

152. **Pastar I., Tonic I., Golic N., Kojic M., van Kranenburg R., Kleerebezem M., Topisirovic L. and Jovanovic G., (2003).** Identification and genetic characterization of a novel proteinase, PrtR, from the human isolate *Lactobacillus rhamnosus* BGT10. *Appl Environ Microbiol* 69:5802–5811.
153. **Pederson J.A., Mileski G.J., Weimer B.C. and Steele J.L., (1999).** Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *J Bacteriol* 181:4592–4597
154. **Pellegrini A., (2003).** Antimicrobial peptides from food proteins. *Curr. Pharm. Des.* 9:1225-1238.
155. **Pellegrini A., Dettling C, Thomas U. and Hunziker P., (2001).** Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin. *Biochim. Biophys. Acta* 1526:131-140.
156. **Pellegrini A., Hulsmeler A.J., Hunziker P. and Ursula T., (2004).** Proteolytic fragments of ovalbumin display antimicrobial activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1672:76-85.
157. **Pellegrini A., Thomas U., Bramaz N., Hunziker P. and von Fellenberg R., (1999).** Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine α -lactalbumin molecule. *Biochim. Biophys. Acta* 1426:439-448.
158. **Petranxiene and Lapid (1981).** The bacteriological quality of milk and dairy products. Paris, France: Tec & Doc. Lavoisier, p. 228.
159. **Pouny Y., Rapaport D., Mor A., Nicolas P., Shai Y. (1992).** Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* 31(49): 12416-12423.
160. **Pihlanto-Leppälä A., Marnila P., Hubert L., Rokka T., Korhonen H.J T. and Karp M., (1999).** The effect of α -lactalbumin and β -lactoglobulin hydrolysates on the metabolic activity of *Escherichia coli* JM103. *J. Appl. Microbiol.* 87:540-545.
161. **Powers J. P. and Hancock R. E., (2003).** The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 24 (11): 1681-91.
162. **Pritchard G.G. et Coolbeart T., (1993).** The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEBS Microbiology letter* 12: 179-206.
163. **Reddy K.V.R., Yedery R.D. and Aranha C., (2004).** Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int. J. Antimicrob. Agents* 24:536-547.

164. **Recio L. and Visser S., (1999).** Two ion-exchange chromatographic methods for the isolation of antibacterial peptides from lactoferrin. In situ enzymatic hydrolysis on an ion-exchange membrane. *J. Chromatography* 831:191-201.
165. **Roepstorff P. and Fohlman J., (1984).** Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom.*, 11, 601.
166. **Reynolds E.C., (2007).** Antimicrobial peptides and their potential as oral therapeutic agents. *Int. J. Peptides Res. Therap.* 13:505-516.
167. **Romeo D. and Skerlavaj B., (1988).** Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. *J Biol Chem* 263(20): 9573-9575.
168. **Rydengard V., Shannon O., Lundqvist K., Kacprzyk L., Chalupka A., Morgelin M., Jahnen-Dechent W., Malmsten M., Schmidtchen A. and Olsson A-K., (2008).** Histidine-rich glycoprotein protects from systemic *Candida* infection *PLoS Pathogens* 4 e1000116 doi:1000110.1001371/journal.ppat.1000116.
169. **Recio I. and Visser S., (1999).** Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine α S2-casein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1428, 314–326.
170. **Reviriego C., Fernandez L. and Rodriduez J.M., (2007).** A food-grade system for production of pediocin PA-1 in nisin-producing and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains: Application to inhibit *Listeria* growth in a cheese model system. *J. Food Protection* 70:2512-2517.
171. **Saito T., Miyakawa H., Tamura Y., Shimamura S. and Tomita M., (1991).** Potent bactericidal activity of bovine lactoferrin hydrolysate produced by heat treatment at acidic pH. *J. Dairy Sci.* 74:3724-3730.
172. **Savijoki K., Ingmer H. and Varmanen P., (2006)** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol Biotechnol* (2006) 71, 394–406.
173. **Schleifer K.H. and Klipper-Balz R., (1987).** Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of *Streptococci*, *Enterococci* and *Lactococci*. *Systematic Applied Microbiology* 10, 1-19.
174. **Schleifer K.H., Kraus J., Dvorac M., Klipper-Balz R., Collins M. and Fisher W., (1985).** Transfer of *Streptococcus lactis* and related *streptococci* to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst. Appl. Microbio.* 6, 183-195.
175. **Schröder J.-M.I. et Harder J. (2006)** Peptides antimicrobiens naturels cutanés. *médecine /sciences ; 22 : 153-7.*

176. **Shahbal S., Hemme D., and Desmazeaud M. J. (1991).** High cell wall-associated proteinase activity of some *Streptococcus thermophilus* strains (H-strains) correlated with a high acidification rate in milk. *Lait*. 71, 351-357.
177. **Shahbal S., Denis H., and Pierre R. (1993).** Characterization of a cell envelope-associated proteinase activity from *Streptococcus thermophilus* H-Strains. *Appl Environ Microbiol.* 59, 177-182.
178. **Siezen R.J., (1999).** Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76:139–155
179. **Sit C.S. and Vederas J.C., (2008).** Approaches to the discovery of new antibacterial agents based on bacteriocins. *Biochem Cell Biol.* 86, 116-123.
180. **Srividhya J. and Schnell S., (2006).** Why substrate depletion has apparent first-order kinetics in enzymatic digestion. *Computational Biology and Chemistry*, 30, 209-214.
181. **Stiles M.E. and Holzapfel W.H., (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. In *J Food Microbiol* 36, 1-29.
182. **Stepaniak L., Gobbetti M. and Fox P.F., (1996)** Partial purification and characterization of Intracellular proteinases from *Lactococcus lactis subsp lactis* MG1363. *Lait* 76, 489-499.
183. **Shai Y., (2002).** Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 66(4): 236-248.
184. **Shai Y. and Oren Z., (2001).** From "carpet" mechanism to de-novo designed diastereomeric cell selective antimicrobial peptides. *Peptides* 22(10): 1629-1641.
185. **Shike H. and Lauth X., (2002).** Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. *Eur J Biochem* 269 (8): 2232-7.
186. **Swaisgood H., (1982).** Chemistry of milk protein. In: Fox P (ed) *Developments in dairy chemistry*, vol. 1. Applied Science, London, pp 1–59.
187. **Tasiemski A. and Vandenbulcke F., (2004).** Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid, the leech *Theromyzon tessulatum*. *J Biol Chem* 279(30): 30973-30982.
188. **Teixeira L.M., Merquior V.L.C., Vianni M.C.E., Carvalho M.G.S., Fracalanza S.E.L., Steigerwalt A.G., Brenner D.J. and Facklam R.R. (1996).** Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior

subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. International Journal of Systematic Bacteriology 46, 664–668.

189. **Tossi A., Sandri L., Giangaspero A. (2000).** Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides" Biopolymers **55** (1): 4-30.
190. **Tsakalidou E., Anastasiou R., Vandenberghe I., VanBeeumen J. and Kalantzopoulos G., (1999).** Cell-wall-bound proteinase of *Lactobacillus delbruekii subsp. lactis* ACA-Dc 178: characterization and specificity for beta-casein. Appl Environ Microbiol 65: 2035-2040.
191. **Tomita M., Wakabayashi H., Yamauchi K., Teraguchi S. and Hayasawa H., (2002).** Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and application. Biochem. Cell Biol. 80:109-112.
192. **Tossi, A. and Sandri L., (2000).** Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. Biopolymers **55**(1): 4-30.
193. **Ueno K., Mizuno S., Yamamoto N. (2004)** Purification and characterization of an endopeptidase that has an important role in the carboxyl terminal processing of antihypertensive peptides in *Lactobacillus helveticus* CM4. Letters in applied microbiology. 39: 313-318.
194. **Van der Krann M.I.A., Groenink J., Nazmi K., Veerman E.C.I., Bolscher J.G.M. and Amerongen A.V.N., (2004).** Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the NI-domain of bovine lactoferrin. Peptides 25:177-183.
195. **Vaz Gomes A., de Waal A., Berden J.A., Westerhoff H.V. (1993).** Electric potentiation, cooperativity, and synergism of magainin peptides in protein-free liposomes. Biochemistry **32**(20): 5365-5372.
196. **Vieille C. and Zeikus J.G., (2001).** Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability Microbiol. Mol. Biol., 65: 1– 43.
197. **Vorn O., Roepstorff P. and Mann M., (1994).** Improved resolution and very high sensitivity in MALDI-TOF of matrix surfaces made by fast evaporation. Anal. Chem., 66, 3281-3287.
198. **Wakabayashi H., Yamauchi K. and Takase M., (2006).** Lactoferrin research, technology and applications. Int. Dairy J. 16:1241-1251.
199. **Wang Z. and Wang G., (2004).** APD: the antimicrobial database. Nucleic Acids Research 32: 590–592.
200. **Weinberg E.D., (2007).** Antibiotic properties and applications of lactoferrin. Curr. Pharm. Des. 13:801-811.

201. **Wong J. H. and Xia L., (2007).** A review of defensins of diverse origins. *Curr Protein Pept. Sci.* **8**(5): 446-59. Yang *et al.* 2001
202. **Westhoff O.C., Cowman R.A. and Swaisgood H.E. (1971)** Characterization of an intracellular proteinase of a slow acid producing mutant of *Streptococcus lactis*. *J Dairy Sci.* **54**, 1259-1264.
203. **Xiang F. and Beavis R.C., (1994).** A method to increase contaminant tolerance in protein matrix-assisted laser desorption ionization by the fabrication of thin protein-doped polycrystalline film. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **8**, 199-204.
204. **Yang L., Harroun T.A., Weiss T.M., Ding L., Huang HW. (2001).** "Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores." *Biophys J* **81**(3): 1475-85.
205. **Yeaman M. R. and Yount N. Y., (2003).** Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* **55**(1): 27-55.
206. **Zanetti M., Gennaro R. et Romeo D. (1995)** Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.*, **374**, 1-5.
207. **Zasloff M., (2002).** Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**(6870): 389-395.
208. **Zevaco C. and Gripon J.C., (1988).** Properties and specificity of a cell wall associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Le lait* **68**: 393-408.
209. **Zucht H. D., Raida M., Adermann K., Mägert H. J. and Forssman W. G. (1995).** Casocidin-I: a α S2-casein derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Letters*, **372**, 185–188.

Annexe

<i>Citratase</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>Acétoïne</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>Lait tournesolé</i>	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC
<i>Hydrolyse esculine</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Hydrolyse de l'amidon</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Espèce</i>	<i>LcL₁</i>	<i>LcL₂</i>	<i>LcC₁</i>	<i>LcL₅</i>	<i>LcL₆</i>	<i>LcD₁</i>	<i>LcL₇</i>	<i>LcL₈</i>	<i>LcL₁₀</i>	<i>LcL₁₁</i>	<i>LcD₄</i>

Tableau 4 : Profil de fermentation des sucres des isolats du lait de vaches.

Lait de vaches											
<i>Lactose</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Glucose</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Galactose</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Maltose</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Mélibiose</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sorbitol</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Raffinose</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Xylose</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
<i>Mannitol</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Arabinose</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tréhalose</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Cellobiose</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Inositol</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Espèce</i>	<i>Lc.L₁</i>	<i>Lc.L₂</i>	<i>Lc.L₅</i>	<i>Lc.L₆</i>	<i>Lc.L₇</i>	<i>Lc.L₈</i>	<i>Lc.L₁₀</i>	<i>Lc.L₁₁</i>	<i>Lc.C₁</i>	<i>Lc.D₁</i>	<i>Lc.D₄</i>

Tableau 5 : Caractéristiques des souches de *Lactococcus Lactis* originaires du lait de chèvres.

Origine du lait	Lait de chèvre					
	Hivers		Printemps		Été	
Caractère/ Souches	C1	C2	C1	C2	C1	C2
<i>Gram</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Oxydase</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Catalase</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Hémolyse</i>	γ	γ	γ	γ	γ	γ
<i>Croissance à :</i>						
10°C	+	+	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+	+	+
45°C	+	+	+	+	+	+
<i>Croissance à pH 9,6</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Type respiratoire</i>	μA	μA	μA	μA	μA	μA
<i>Type fermentaire</i>	Ho	Ho	Ho	Ho	Ho	Ho
<i>Croissance à :</i>						
2%	+	+	+	+	+	+
4%	+	+	+	+	+	+
6,5% de NaCl	+	+	+	+	+	+
<i>sur milieu bilié</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Résistance 30 mn à 63°C</i>	-	-	-	+	-	-
<i>lait de Sherman</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Hydrolyse de l'arginine</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Acétoïne</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Résistance au tellurite</i>	+	-	-	-	+	-
<i>Gélatinase</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Citratase</i>	-	-	+	-	-	-

<i>Lait tournesolé</i>	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC
<i>Hydrolyse de l'amidon</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Hydrolyse esculine</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Espèce</i>	<i>LcL₃</i>	<i>LcL₄</i>	<i>LcD₂</i>	<i>LcL₉</i>	<i>LcL₁₂</i>	<i>LcL₁₃</i>

Tableau 6 : Profil de fermentation des sucres des isolats du lait de chèvres

Lait de chèvre						
<i>Lactose</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Glucose</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Galactose</i>	+	+	+	-	+	+
<i>Maltose</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Mélibiose</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Sorbitol</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Raffinose</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Xylose</i>	-	-	+	+	+	+
<i>Mannitol</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Arabinose</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Tréhalose</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Cellobiose</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Inositol</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Espèce</i>	<i>Lc.L₃</i>	<i>Lc.L₄</i>	<i>Lc.L₉</i>	<i>Lc.D₂</i>	<i>Lc.L₁₂</i>	<i>Lc.L₁₃</i>

Tableau 7 : Caractéristiques des souches de *Lactococcus lactis* originaires du lait de brebis

<i>Origine du lait</i>	Lait de brebis					
	<i>Hivers</i>	<i>Printemps</i>		<i>Eté</i>		
<i>Saisons</i>	<i>B1</i>	<i>B1</i>	<i>B2</i>	<i>B1</i>	<i>S11</i>	<i>S12</i>
<i>Caractère/ Souches</i>	<i>B1</i>	<i>B1</i>	<i>B2</i>	<i>B1</i>	<i>S11</i>	<i>S12</i>
<i>Gram</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Oxydase</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Catalase</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Hémolyse</i>	γ	γ	γ	γ	γ	γ
<i>Croissance à :</i>						
<i>10°C</i>	+	+	+	+	+	+
<i>30°C</i>	+	+	+	+	+	+
<i>45°C</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Croissance à pH 9,6</i>	-	-	-	-	+	+
<i>Type respiratoire</i>	A-A	A-A	A-A	A-A	A-A	A-A
<i>Type fermentaire</i>	Ho	Ho	Ho	Ho	Ho	Ho
<i>Croissance à :</i>						
<i>2%</i>	+	+	+	+	+	+
<i>4%</i>	+	+	+	+	+	+
<i>6,5% de NaCl</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Croissance sur milieu bilié</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Résistance 30 mn à 63°C</i>	-	-	-	+	-	-
<i>sur lait de Sherman</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Hydrolyse de l'arginine</i>	-	-	+	+	+	-
<i>Acétoïne</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Résistance au tellurite</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Gélatinase</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Citratase</i>	+	+	+	-	-	+
<i>Lait tournesolé</i>	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC
<i>Hydrolyse de l'amidon</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Hydrolyse esculine</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Espèce</i>	<i>Lc.C₂</i>	<i>Lc.C</i>	<i>Lc.D₃</i>	<i>Lc.L₁₄</i>	<i>Lc.L*</i>	<i>Lc.C*</i>

Tableau 8: Profil de fermentation des sucres des souches des isolats du lait de brebis

Sucre	Lait de brebis				Souches de référence	
<i>Lactose</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Glucose</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Galactose</i>	+	+	-	+	+	+
<i>Maltose</i>	+	+	+	-	-	+
<i>Mélibiose</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Sorbitol</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Raffinose</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Xylose</i>	-	-	+	-	+	-
<i>Mannitol</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Arabinose</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Tréhalose</i>	-	-	+	+	+	-
<i>Cellobiose</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Inositol</i>	-	-	+	+	+	-
<i>Espèce</i>	<i>Lc.C₂</i>	<i>Lc.C</i>	<i>Lc.D₃</i>	<i>Lc.L₁₄</i>	<i>Lc.L*</i>	<i>Lc.C*</i>

+ : Réaction positive ; - : réaction négative ; **A** : acidification ; **R** : réduction ; **C** : coagulation ; **μA** : micro-aérobie ;

Ho : homofermentaire. **V** : isolat à partir du lait de vache. **B** : isolat à partir du lait de brebis. **C** : isolat à partir du lait de chèvre. **S1** et **S2** : bactéries lactiques présumées lactocoques isolées à partir de ferments lyophilisés.