

THÉOLIER JÉRÉMIE

**APPROCHES BIOCHIMIQUES ET
BIOINFORMATIQUES POUR L'IDENTIFICATION
DE PEPTIDES ANTIMICROBIENS D'ORIGINE
LAIITIÈRE**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en Microbiologie Agroalimentaire
pour l'obtention du grade de Philosophiæ doctor (Ph. D.)

DÉPARTEMENT DES SCIENCES DES ALIMENTS ET DE NUTRITION
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2013

Résumé court

Une base de données regroupant l'ensemble des peptides antimicrobiens provenant de protéines laitières et décrits dans la littérature a été réalisée, révélant le fait que peu de peptides antimicrobiens ont été identifiés à partir d'un mélange de protéines du lactosérum ou de produits laitiers. D'autre part, un hydrolysât d'isolat de protéines sériques a été fractionné par chromatographie liquide haute performance afin de séparer spécifiquement des fractions contenant des peptides antimicrobiens. Cinq fractions antimicrobiennes ont été obtenues et les peptides responsables de l'activité ont été identifiés. En parallèle, cinq extraits peptidiques hydrosolubles ont été isolés de fromages canadiens. Deux de ces extraits ont révélé une activité antimicrobienne et confirme la présence de peptides antimicrobiens dans les produits laitiers. Les protéines laitières ont ainsi démontré leur capacité à générer des peptides antimicrobiens après hydrolyse.

Résumé long

L'objectif général de la présente thèse était d'identifier, d'étudier et de caractériser la présence de peptides antimicrobiens dans les protéines laitières en utilisant des approches différentes mais complémentaires en bioinformatique, en physicochimie et en microbiologie.

Le premier objectif a consisté à monter une base de données, dénommée milkAMP, qui regroupe tous les peptides antimicrobiens identifiés à ce jour dérivant des protéines laitières. Elle inclut les peptides modifiés ou dérivés et même les peptides qui n'ont pas révélé d'activité. Actuellement, MilkAMP contient 405 entrées dont 9 hydrolysats, 346 peptides antimicrobiens, 23 peptides dont l'activité antimicrobienne est soupçonnée mais reste à être démontrée, et 36 peptides qui ont été testés mais qui sont non actifs. Cette base de données est librement accessible à l'adresse suivante <http://milkampdb.org/> et devrait être utile pour le développement de peptides actifs biologiquement dans les secteurs pharmaceutique et alimentaire. Il en ressort que les peptides identifiés le sont principalement à partir d'hydrolysats obtenus de protéines pures ou d'un mélange de caséines, mais pratiquement jamais à partir d'un mélange de protéines du lactosérum ou même de produits laitiers.

Le deuxième objectif visait à obtenir des peptides antimicrobiens à partir d'un matériel de base simple. Dans le cadre de ce travail, des hydrolysats d'un isolat de protéines sériques ont été préparés et obtenus par l'action d'enzymes gastro-intestinales. Seuls les hydrolysats obtenus entre les 45^{ième} et 90^{ième} minutes d'hydrolyse avec la pepsine ont démontré une activité significative contre les souches bactériennes *Escherichia coli* MC4100 et *Listeria ivanovii* HPB 28. Le fractionnement par chromatographie liquide haute performance en phase inverse de l'échantillon prélevé à la 60^{ième} minute de l'hydrolyse a permis d'obtenir cinq fractions qui ont présenté une activité antibactérienne à des concentrations inférieures à 30 µg/ml. Six peptides dérivés de la β-lactoglobuline et un dérivé de l'α-lactalbumine ont été identifiés, à partir de ces fractions, comme des séquences antibactériennes.

Le dernier objectif a été de vérifier la présence de peptides antimicrobiens dans des matrices plus complexes telles que les fromages. Les fractions peptidiques purifiées issues

des fromages Mozzarella et Gouda ont permis des réductions significatives de la croissance de *Listeria ivanovii* et d'*Escherichia coli* par rapport au témoin sans fraction. Cependant, les réductions observées sur *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli* O157:H7 ne se sont pas révélées significatives. Les extraits provenant des Cheddars et du fromage Suisse n'ont révélé aucune activité antibactérienne. Les cinq extraits ont retardé la germination des spores de plusieurs souches de champignons de manière significative sans pour autant avoir un effet sur leur viabilité.

L'ensemble de ces résultats a permis de démontrer le potentiel des protéines laitières comme source de peptides antimicrobiens et de les identifier comme une des alternatives valides aux molécules antimicrobiennes utilisées actuellement, en vue d'applications futures.

Abstract

The overall objective of this thesis was to identify, investigate and characterize the presence of antimicrobial peptides generated from milk proteins using different but complementary approaches of bioinformatic, physicochemistry and microbiology.

The first step was to set up a database, namely milkAMP, containing all identified antimicrobial peptides derived from milk proteins to date. It includes chemically modified peptides or derivatives, and even peptides which have not proven activity. Currently, MilkAMP contains 405 entries, including 9 hydrolysates, 346 antimicrobial peptides, 23 peptides with suspected antimicrobial activity but not demonstrated yet, and 36 peptides that have been tested but are not active. This database is freely accessible at the following address <http://milkampdb.org/> and should be useful for the development of biologically active peptides in pharmaceutical and food industries. It appears that identified peptides are always from hydrolysates produced from either pure protein or a mixture of caseins but never from a mixture of whey proteins or even dairy products.

The second step was to obtain antimicrobial peptides from a basic and simple material. As part of this work, hydrolysates of whey protein isolate, obtained by the action of gastrointestinal enzymes, were prepared. Only hydrolysates obtained between the 45th and 90th minutes of hydrolysis with pepsin showed significant activity against bacterial strains *Escherichia coli* MC4100 and *Listeria ivanovii* HPB 28. Fractionation by reverse phase HPLC of the sample collected at the 60th minute of hydrolysis, yielded five fractions showed antibacterial activity at concentrations below 30 µg/ml. Six peptides derived from β -lactoglobulin and one derivative of α -lactalbumin have been identified as antibacterial sequences.

The last step was to verify the presence of antimicrobial peptides in complex matrices such as cheeses. The peptidic fractions purified from Gouda and Mozzarella cheeses presented significant reductions against *Listeria ivanovii* and *Escherichia coli*. However, the observed reductions of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 have not been significant. Extracts from Cheddars and Swiss cheeses had showed no antibacterial activity.

In addition, the five extracts delayed significantly the spore germination of several fungal strains without affecting their viability.

Taken together, these results demonstrated the potential of milk proteins as a source of antimicrobial peptides and identified them as credible alternatives to currently used antimicrobial molecules for future applications.

Avant-Propos

Ce mémoire est composé de six chapitres. Le premier chapitre est une revue de littérature comprenant deux parties. La première partie présente les principales protéines laitières qui ont déjà conduit à l'identification de peptides antimicrobiens. La deuxième partie traite des différentes généralités en rapport avec les peptides antimicrobiens. Une partie de cette revue de littérature a été soumise pour publication dans « Food International Review » sous le titre « Antimicrobial peptides of dairy proteins: from fundamental to applications ». Auteurs: Jérémie Théolier, Ismail Fliss, Julie Jean et Riadh Hammami.

Le deuxième chapitre relate les problématiques découlant du sujet de recherche, la formulation de l'hypothèse de recherche ainsi que les différents objectifs spécifiques à atteindre afin de la vérifier. Les trois chapitres suivants, rédigés sous forme d'articles de recherche, décrivent l'ensemble des expérimentations réalisées et les résultats obtenus. Enfin, le dernier chapitre présente une discussion et une conclusion générale.

Le premier article a été soumis pour publication dans « Journal of Dairy Science » sous le titre « MilkAMP: a comprehensive database of antimicrobial peptides of dairy origin ». Auteurs: Jérémie Théolier, Ismail Fliss, Julie Jean et Riadh Hammami.

Le deuxième article a été accepté pour publication dans « Journal of Functional Foods » sous le titre « Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate ». Auteurs: Jérémie Théolier, Riadh Hammami, Philip Labelle, Ismail Fliss et Julie Jean.

Le troisième article a été soumis pour publication dans « Journal of the Science of Food and Agriculture » sous le titre « Antimicrobial activities of water-soluble extracts from cheeses produced in Canada ». Auteurs: Jérémie Théolier, Riadh Hammami, Ismail Fliss et Julie Jean.

Le premier article présente la base de données qui a été conçue pour centraliser les informations importantes sur l'ensemble des peptides antimicrobiens laitiers répertoriés à ce jour. Le deuxième article aspire à démontrer la possibilité d'obtenir des peptides antimicrobiens à partir d'hydrolysats d'un mélange de protéines sériques. Enfin, le

troisième article se focalise sur l'étude de la présence de peptides antimicrobiens sur des fromages commerciaux à la fin du processus de fabrication.

Dans tous les cas, M. Jérémie Théolier^{1,2} est l'auteur principal et il a été en charge de la conception, de la planification et de l'exécution des travaux pratiques en laboratoire, ainsi que de la rédaction des articles. M. Philip Labelle¹ a également participé à l'exécution des travaux pratiques sous la supervision de M. Théolier, dans le cadre d'un stage de trois mois. Le Dr Riadh Hammami^{1,2}, stagiaire post-doctoral et coauteur des quatre articles, a contribué à la planification des expériences, à la discussion des résultats et à la rédaction et révision des articles. Le Dr Ismail Fliss^{1,2}, coauteur des quatre articles, a participé à la planification et à la discussion des résultats. Le Dr Julie Jean^{1,2}, directeur du projet et coauteure des quatre articles, était responsable de la conception des travaux pratiques, de la discussion des résultats, de la rédaction et révision des articles ainsi que de la gestion administrative et financière du projet.

¹*Institut des Nutraceutiques et Aliments Fonctionnels (INAF), Université Laval, Québec, Canada, G1V 0A6.*

²*Département des Sciences des Aliments et de Nutrition, Université Laval, Québec, Canada, G1V 0A6.*

Remerciements

Je souhaite, à travers ces quelques lignes, exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude aux différentes personnes qui, chacune à leur façon, ont rendu possible cette grande aventure qu'aura été mon doctorat.

En premier lieu, cette thèse n'aurait jamais vu le jour sans la confiance de ma directrice de recherche, la docteure Julie Jean, professeur titulaire au Département des Sciences des Aliments et de Nutrition. La pleine confiance qu'elle m'a accordée, m'a permis d'élaborer un plan de thèse personnel et propre à mes aspirations. Je voudrais spécifiquement la remercier pour le temps et la disponibilité dont elle a fait preuve pendant ces quatre années, ainsi que pour m'avoir donné une véritable liberté d'action et ce, dans d'excellentes conditions logistiques et financières. Je tiens par ailleurs à la remercier pour tous les conseils et enseignements qu'elle m'a prodigués dans la rédaction de cette thèse et dans la façon d'interpréter mes résultats.

Je tiens à remercier le docteur Ismail Fliss, mon codirecteur, professeur titulaire au Département des Sciences des Aliments et de Nutrition, pour ses encouragements répétés et sa vision à long terme durant la réalisation de mon doctorat.

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude et ma reconnaissance au docteur Riadh Hammami. Il est difficile pour moi de trouver les mots exacts pour souligner l'apport de Riadh à mon travail lors de cette thèse. J'ai beaucoup appris à son contact : scientifiquement, dans la façon d'aborder les problématiques de recherche et sur ces précieux conseils de rédaction, mais aussi humainement. Le docteur Hammami a toujours été le premier à m'épauler et à me conseiller durant les moments de faiblesse que l'on peut connaître durant une thèse. Je lui serai toujours reconnaissant. Je lui serai aussi infiniment redevable d'avoir su me mettre des coups de pieds au cul quand c'était nécessaire. Au moins, cela aura porté ses fruits.

Je voudrais également remercier les docteurs Sylvie Gauthier et Michel Britten pour leurs encouragements répétés durant mon travail. Je tiens à leur exprimer ici ma gratitude et mon respect. Je remercie également Michel pour avoir accepté d'être le prélecteur de cette thèse

et pour la pertinence des remarques et conseils qu'il a pu m'apporter. Je tiens à remercier Gwenaëlle Le Blay pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Un grand merci également aux personnes qui m'ont offert une aide technique précieuse en laboratoire : Alain Gaudreau, Marie-Michelle Gagnon et Pascal Cliche. Une mention spéciale est accordée à Diane Gagnon pour l'apport continu en chocolat et en bonne humeur, sans parler du travail colossal abattu au laboratoire.

Je souhaite remercier aussi ma famille pour m'avoir soutenu et appuyé durant mon travail, mes parents, Isabelle et Philippe Théolier, ainsi que mon frère Vivien Théolier. J'aimerais exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude pour votre soutien inconditionnel et surtout pour tout l'amour et la joie que vous m'apportez depuis toujours. En revanche pour ma sœur, bernique (mouhahaha!).

Je tiens aussi à remercier mes collègues étudiants présents ou non au sein de l'Université Laval ainsi que mes amis pour leur soutien et leur aide constante : Alain, Allison, Benoit, Christian, Christophe, Cyril, David, Élodie, Françoise, Geneviève, Laure, Marco, Maryline, Maxime, Myriam, Romain, Sandrine, Véronique et tous ceux que j'oublie. Un gros MERCI! Merci également à mes stagiaires et aux personnes ayant participé à mes expérimentations : Philip et Marie-Pierre.

Je remercie également Valzi pour sa présence mais également pour ses gros efforts pour comprendre mon sujet « qui parle d'acide lactique, de lactose et de bactéries du lait ».

*C'est quand même contrariant tout ce temps
qu'on perd dans la vie à devoir matraquer
sauvagement les forces brutales de l'hostilité
pour aplanir les obstacles les plus anodins au
marteau-pilon de la volonté pacifique.*

Achille Talon

Table des matières

Résumé court	i
Résumé long	ii
Abstract	iv
Avant-Propos	vi
Remerciements.....	viii
Table des matières	xi
Liste des tableaux.....	xv
Liste des figures.....	xvi
Introduction.....	1
CHAPITRE I. Revue de littérature.....	5
I.1. Les protéines du lait.....	6
I.1.1. Les caséines.....	6
I.1.2. Les protéines du lactosérum	7
I.1.2.1. La β -lactoglobuline.....	8
I.1.2.2. L' α -lactalbumine	9
I.1.2.3. La lactoferrine	10
I.1.2.4. Les procédés d'obtention.....	10
I.1.2.4.1. L' α -lactalbumine et la β -lactoglobuline	11
I.1.2.4.2. La lactoferrine	12
I.2. Les peptides antimicrobiens	12
I.2.1. Le contexte historique	12
I.2.2. L'évolution et l'ubiquité des peptides antimicrobiens	14
I.2.3. La diversité et les différentes classifications	16
I.2.3.1. La classification usuelle	17
I.2.3.1.1. Les peptides linéaires	17
I.2.3.1.1.1. Les peptides à hélice α	17
I.2.3.1.1.2. Les peptides enrichis spécifiquement en acides aminés.....	19
I.2.3.1.2. Les peptides avec des feuillets β	20
I.2.3.1.2.1. Les peptides sans pont disulfure.....	20
I.2.3.1.2.2. Les peptides avec un ou plusieurs ponts disulfures.....	20
I.2.3.2. Les variantes existantes dans la classification.....	20
I.2.3.3. Les peptides qui alimentent le débat	21
I.2.3.3.1. Les peptides contenant des acides aminés modifiés.....	21
I.2.3.3.2. Les peptides issus de protéines natives	22
I.2.3.3.3. Les peptides anioniques.....	22
I.2.4. Les interactions entre les peptides antimicrobiens et les microorganismes	23
I.2.4.1. La spécificité des peptides.....	23
I.2.4.2. Les différents modèles d'action théoriques proposés.....	24
I.2.4.2.1. Les mécanismes antibactériens.....	24
I.2.4.2.1.1. Les mécanismes membranaires	25
I.2.4.2.1.1.1. L'hypothèse d'un modèle unique	25

I.2.4.2.1.1.2. Le modèle en douve du tonneau	26
I.2.4.2.1.1.3. Le modèle des pores toroïdaux	28
I.2.4.2.1.1.4. Le modèle en tapis	30
I.2.4.2.1.1.5. Le nouveau modèle	31
I.2.4.2.1.2. Les mécanismes intracellulaires	33
I.2.4.2.2. Les mécanismes antifongiques	33
I.2.4.3. L'activité et les modes d'action des peptides antimicrobiens laitiers.....	34
I.2.4.2.1. Les mécanismes antimicrobiens observés	34
I.2.4.2.1.1. Les mécanismes membranaires.....	34
I.2.4.2.1.2. Les mécanismes intracellulaires	36
I.2.4.2.1.2. Les autres modes d'action observés.....	36
I.2.4.2.2. L'activité en synergie.....	37
I.2.4.2.3. Les modifications chimiques	40
I.2.5. Les mécanismes de résistance.....	43
I.2.5.1. Les phénomènes de résistance passive	44
I.2.5.1.1. La résistance inhérente à chaque microorganisme.....	44
I.2.5.1.2. La résistance de niches.....	45
I.2.5.2. La résistance acquise.....	45
I.2.5.2.1. La production de protéases	45
I.2.5.2.2. La production de matériel de capture ou de rejet.....	46
I.2.5.2.3. Les modifications des membranes bactériennes	47
I.2.5.2.3.1. Les modifications de la charge	47
I.2.5.2.3.2. Les modifications de la fluidité.....	47
I.2.6. Les applications et perspectives.....	48
I.2.6.1. Les applications pharmacologiques	48
I.2.6.2. Les applications agroalimentaires.....	50
 CHAPITRE II. Problématique, hypothèses et objectifs de recherche.....	 53
II.1. Problématique	54
II.2. Hypothèse de recherche.....	55
II.3. Objectifs de recherche	55
 CHAPITRE III. Peptides antimicrobiens dérivés des protéines lactières : mise en place d'une base de données.....	 57
Transition contextuelle	58
Résumé	59
Abstract	60
III.1. Introduction	61
III.2. Materials and methods	62
III.2.1. Data sets	62
III.2.2. Implementation.....	62
III.3. Results & discussion	63
III.3.1. General description of the graphical user interface.....	63
III.3.2. Data summary	65
III.3.2.1. Animal of origin.....	65

III.3.2.2. Protein of origin	66
III.3.2.3. Peptide production	68
III.3.3. Antimicrobial activity	68
III.3.4. Other relevant databases	73
III.4. Conclusion	74
Atteinte des objectifs et avancement des connaissances	75
CHAPITRE IV. Purification et identification de peptides antimicrobiens obtenus par hydrolyse peptique d'un mélange de protéines du lactosérum	77
Transition contextuelle	78
Résumé.....	79
Abstract.....	80
IV.1. Introduction	82
IV.2. Materials and methods.....	83
IV.2.1. Materials and microorganisms.....	83
IV.2.2. Hydrolyses of whey proteins	83
IV.2.3. Purification of peptides.....	84
IV.2.4. Identification of peptides by ESI mass spectrometry	84
IV.2.5. Determination of antibacterial activity	85
IV.2.6. Statistical analysis.....	85
IV.3. Results	86
IV.3.1. Protein hydrolysis and extraction of peptide fractions	86
IV.3.2. Antimicrobial activity of the peptide fractions.....	88
IV.3.3. Purification and identification of antibacterial peptides.....	88
IV.4. Discussion.....	93
Atteinte des objectifs et avancement des connaissances	97
CHAPITRE V. Activité antimicrobienne d'extraits hydrosolubles de fromages produits au Canada	99
Transition contextuelle	100
Résumé.....	101
Abstract.....	102
V.1. Introduction.....	103
V.2. Material and methods.....	104
V.2.1. Preparation of water-soluble extracts.....	104
V.2.2. Chemical analysis of the extracts.....	105
V.2.3. Bacteria and molds.....	105
V.2.4. Agar diffusion assay	105
V.2.5. Critical dilution method and minimal inhibitory concentration determination	106
V.3. Results.....	106
V.3.1. Water-soluble extract production and physicochemical characterization	106
V.3.2. Antibacterial activity.....	108
V.3.3. Antifungal activity	113
V.4. Discussion	113
Atteinte des objectifs et avancement des connaissances	117

CHAPITRE VI. Discussion et conclusion générale.....	119
VI.1. Discussion générale.....	120
VI.2. Conclusion	123
Bibliographie.....	125

Liste des tableaux

Tableau I.1: Caractéristiques physico-chimiques des protéines du lactosérum bovin.....	7
Tableau I.2: Effets synergiques référencés dans la littérature, obtenus avec des AMPs laitiers en combinaison avec d'autres traitements antimicrobiens.....	38
Tableau I.3: Modifications chimiques, testées sur les AMPs laitiers et référencées dans la littérature, qui ont contribué à accroître l'activité antimicrobienne	41
Tableau III.1: Origin of the antimicrobial peptides entered in the MilkAMP database	66
Tableau III.2: Native proteins providing antimicrobial peptides listed in the MilkAMP database.....	67
Tableau III.3: The ten most tested target organisms in the MilkAMP database	72
Tableau IV.1: Antibacterial activity of ultrafiltered peptic hydrolysates as time function...	89
Tableau IV.2: Amino acid sequence (based on MS/MS spectra) and corresponding macromolecular fragment of antibacterial peptides found in reversed-phase HPLC fractions of WPI after 60 minutes of hydrolysis by pepsin	92
Tableau V.1: Characteristics of the cheese varieties tested in this study.	107
Tableau V.2: Chemical composition of the water-soluble extracts of used cheeses (mg/ml).	108
Tableau V.3: Logarithmic reductions of the growth of <i>L. ivanovii</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> MC4100 and <i>E. coli</i> O157:H7 in the presence of 34 mg/ml of each water-soluble extract.....	110
Tableau V.4: Minimal inhibitory concentrations (MIC) of water-soluble extracts of cheeses in the case of food-borne bacteria.....	111
Tableau V.5: Minimal inhibitory concentrations of water-soluble extracts of cheeses causing a delay in spore germination of food-borne molds.....	113

Liste des figures

Figure I.1: Structure d'une micelle de caséine.....	6
Figure I.2: Structure tertiaire de la β -lactoglobuline au pH du lait.....	8
Figure I.3: Structure tertiaire de l' α -lactalbumine	9
Figure I.4: Structure tertiaire de la lactoferrine bovine.....	10
Figure I.5: Exemples de peptide à helices α . (A) mélittine, (B) alaméthicine et (C) magainine	19
Figure I.6: Spécificité des AMPs, basée sur la composition des membranes cibles	23
Figure I.7: Les différents modes d'action de la nisine.....	24
Figure I.8: Les différents modes d'action du modèle unique en fonction de la concentration en peptides associés à la membrane et de la composition lipidique de la membrane. .	26
Figure I.9: Représentation du modèle en douve du tonneau. En haut, fixation du peptide à la membrane. En bas, formation du pore. Les parties hydrophobes des peptides sont en bleu et les parties hydrophiles en rouge	27
Figure I.10: Illustration du modèle des pores toroïdaux. En haut, fixation à la membrane. Au milieu, insertion dans la membrane et en bas, formation du pore. Les parties hydrophobes des peptides sont en bleu et les parties hydrophiles en rouge.	29
Figure I.11: Modélisation informatique du modèle des pores toroïdaux désordonnés. Les peptides sont représentés en jaune, orange, rouge, et blanc. Les queues lipidiques sont en gris et noir. Les phosphates des têtes phospholipidiques sont les sphères roses ou violettes.	30
Figure I.12: Illustration du modèle en tapis. En haut, fixation à la membrane. Au milieu, formation transitoire des pores toroïdaux et en bas, désintégration de la membrane. Les parties hydrophobes des peptides sont en bleu et les parties hydrophiles en rouge.	31
Figure I.13: Modélisation du nouveau modèle. Figure de gauche : (a) fixation à la membrane, (b) insertion dans la membrane et (c) formation de complexe peptidique. Figure de droite : passage du solvant via les domaines hydrophiles.....	32
Figure I.14: Insertion de charges positives dans les membranes bactériennes	48
Figure III.1: Database contents and tools	64
Figure III.2: Amino acid sequence of lactoferrin. The shades of grey represent the occurrence of the amino acid in the milkAMP database. White is for absence and black is used for the most cited amino acids in the database	67
Figure III.3: Distribution of five principal biological activities among the peptides listed in the MilkAMP database (405 AMPs).....	69

- Figure IV.1:** Degree of hydrolysis obtained during digestion of Bipro WPI with pepsin (diamond), trypsin (square) and chymotrypsin (triangle) 86
- Figure IV.2:** Protein concentration measured after heating and filtration (■) and after ultrafiltration on 10 kDa cut-off membrane (□) for Bipro WPI hydrolyzed by (A) pepsin, (B) trypsin and (C) chymotrypsin. *Control before ultrafiltration corresponds to 150 minutes of hydrolysis without heating; control after ultrafiltration corresponds to non-denatured WPI. “×” indicates differing significantly ($P < 0.05$) from the control; Δ indicates differing significantly ($P < 0.05$) from the value obtained after 150 minutes of hydrolysis..... 87
- Figure IV.3:** Reversed-phase HPLC profile of Bipro WPI hydrolyzed for 60 minutes by pepsin (A) and identification of antimicrobial fractions (B). 90
- Figure IV.4:** Determination of the antimicrobial activity of reversed-phase HPLC fractions 1 (open square), 5 (filled diamond), 6 (open diamond), 9 (open triangle) and 12 (filled triangle) obtained from Bipro WPI hydrolyzed for 60 minutes by pepsin. Activity against *L. ivanovii* (A) and *E. coli* (B) compared with negative (no mark) and positive bacterial (filled square) controls. Protein concentrations of added fraction are below 30 µg/ml..... 91
- Figure IV.5:** Identification of daughter ions consistent with whey protein sequences corresponding to the mass determined by MS/MS and using the Fragment Ion Calculator; peak assignments are shown for the corresponding peptide sequence (LMPH)..... 93
- Figure V.1:** Agar diffusion assay showing inhibition of *Listeria ivanovii* HPB28 by cheese water-soluble extracts. 109
- Figure V.2:** Growth of *Listeria ivanovii* HPB28 (A) and *Escherichia coli* MC4100 (B) in the presence of WSE of Mozzarella (1) and Gouda (2) in tryptic soy broth. Concentrations (mg/mL) of extract were 34 (solid diamond), 17 (open square), 8.5 (solid triangle), 4.25 (open diamond), 2.13 (solid square) and 0 (none) 112

Introduction

Avec l'avancement technique et la généralisation des méthodes de détection, le nombre de maladie d'origine alimentaire a fortement augmenté depuis les dernières décennies [1, 2]. Certes certains pathogènes (*Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*...) sont depuis quelques années nouvellement considérés comme d'origine alimentaire, mais les progrès accomplis en matière d'innocuité alimentaire, via le rehaussement des normes d'hygiène, ne peuvent endiguer le phénomène à l'échelle mondiale. Au Québec, le nombre de cas déclarés, d'origine alimentaire, reste stable depuis au moins 2002 [3]. Parmi les produits concernés, les produits laitiers sont directement responsables d'un bon nombre d'entre eux et ont fait l'objet d'une couverture médiatique importante durant la crise de 2008 sur des fromages québécois due à une bactérie du genre *Listeria*. La préservation de la santé humaine (et animale) implique la mise en place d'un plan de lutte actif au sein des industries agro-alimentaires. En dehors de la flore pathogène, qui est étroitement surveillée en industrie, une flore d'altération est clairement identifiable. Cette flore d'altération se compose de bactéries, de champignons filamenteux, de levures et pour les produits fermentés par des bactéries, des bactériophages. Du fait de l'importance économique que représentent les pertes occasionnées par cette flore, il apparaît comme nécessaire de lutter efficacement contre celle-ci.

Jusqu'à présent, l'utilisation de conservateurs de synthèse constituait l'approche traditionnelle pour limiter le développement microbien dans les aliments. Toutefois, l'évolution de la pensée du consommateur, qui réclame de plus en plus des aliments naturels, pousse les industriels à envisager le remplacement de ces composés et à trouver des alternatives afin d'assurer l'innocuité des aliments. La recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes est, par conséquent, un axe de recherche qui est en pleine expansion, que la banalisation des phénomènes de résistance aux antibiotiques observés chez de nombreuses souches de bactéries a grandement contribué à élargir. La nécessité d'utiliser dans des délais relativement serrés de nouvelles alternatives, pour des fins thérapeutique et alimentaire, a déjà permis de mettre en lumière plusieurs alternatives crédibles comme l'utilisation de bactériophages, d'enzymes bactériennes et de peptides

antimicrobiens [4]. Toutefois, dans le cadre de ce travail, seuls les peptides antimicrobiens seront abordés.

Des peptides antimicrobiens peuvent être virtuellement isolés de n'importe quelle source contenant des protéines. Toutefois, leurs applications ultérieures dans l'industrie impliquent des notions de quantité et de rentabilité qui tendent vers l'utilisation de matières premières peu coûteuses et disponibles en grande quantité. Pour cette raison, les coproduits et sous-produits industriels comme les déchets de l'industrie de la pêche [5] ou de la viande [6] semblent être des substrats prometteurs et l'obtention de peptides antimicrobiens à partir d'hydrolysats de déchets industriels représente une voie d'avenir. Actuellement de nombreux peptides bioactifs, dont certains sont antimicrobiens, ont été isolés de cette manière [7-9].

Il semble raisonnable d'affirmer que les protéines laitières sont de bonnes pourvoyeuses en peptides antimicrobiens comme le démontre la pléiade de travaux effectués sur elles. Malgré tout, l'identification des peptides responsables de l'activité représente un véritable défi compte tenu de la composition des hydrolysats dont la complexité va dépendre de la matière première ainsi que des enzymes utilisées. Les deux grandes approches régulièrement utilisées, visant à purifier et caractériser des peptides, présentent des caractéristiques totalement différentes. La première approche, utilisant les méthodes chromatographiques, permet une sélectivité très importante avec la possibilité d'obtenir un peptide pratiquement pur, mais présente le désavantage d'entraîner des coûts importants avec des quantités finales souvent réduites. Tandis que la deuxième approche utilise les procédés baro-membranaires et permet le traitement et l'obtention de grands volumes à moindre coût, elle présente toutefois une sélectivité plutôt faible. Idéalement l'utilisation conjointe des deux approches permet, d'une part, de caractériser le ou les peptide(s) responsable(s) d'une activité antimicrobienne, et d'autre part, de produire des quantités suffisantes pour être rentable par la suite.

L'utilisation de peptides naturels en industrie est encore faible mais est en plein développement comme le prouve la récente déclaration de la lactoferrine comme *Generally Recognize As Safe* (GRAS) par les États-Unis en 2003 [10]. Pourtant, peu de travaux relatent la présence naturelle de ces peptides dans les aliments alors qu'il faut s'attendre à

en trouver lorsqu'une dégradation protéique survient. Les produits laitiers fermentés comme le yogourt ou le fromage devraient logiquement contenir des peptides antimicrobiens de part l'action des enzymes microbiennes des ferments, puisque la protéolyse fait partie intégrante de leurs procédés de fabrication. Il semble pertinent de déterminer la présence de tels peptides pour valoriser le produit et le cas échéant déterminer leur rôle potentiel dans la maturation du fromage favorisant la croissance ou l'inhibition de certaines espèces ou souches.

Ce projet de doctorat vise à étudier et à caractériser les propriétés antimicrobiennes d'hydrolysats de protéine laitières obtenus directement à partir de fromages ou suite à un processus industriel. Les résultats obtenus pourraient jeter les bases d'une nouvelle exploitation de composants laitiers et permettre la mise en place de nouveaux composés pour lutter de manière efficace contre les flores d'altération ou pathogène, problématiques dans le secteur alimentaire.

CHAPITRE I. Revue de littérature

I.1. Les protéines du lait

Le lait est le produit de sécrétion des glandes mammaires chez les mammifères destiné à l'alimentation du nouveau-né. Il est constitué en moyenne de 87,5% d'eau, 3,7% de matière grasse, 3,2% de protéines, 4,6% de glucides et 0,8% de minéraux pour le lait bovin [11]. Le pH d'un lait bovin frais se situe entre 6,6 et 6,8.

I.1.1. Les caséines

Les caséines sont les protéines majoritaires du lait, à hauteur de 80%, mais elles sont également présentes à l'état de trace dans le lactosérum. Dans le lait, les caséines sont naturellement regroupées, formant des particules colloïdales appelées micelles de caséine. Ces dernières se composent des caséines α_1 , α_2 , β et κ dont la teneur est respectivement de 33, 33, 11 et 11%; elles sont maintenues entre elles par des ponts hydrophobes et du phosphate de calcium [12]. La configuration d'une micelle ne fait toujours pas l'objet d'un consensus, chaque modèle proposé ayant des faiblesses. Le modèle le plus en vogue est la structure en submicelle dans lequel des submicelles riches en caséines κ englobent des submicelles n'ayant pas ou étant pauvres en caséines κ (voir figure I.1) [13].

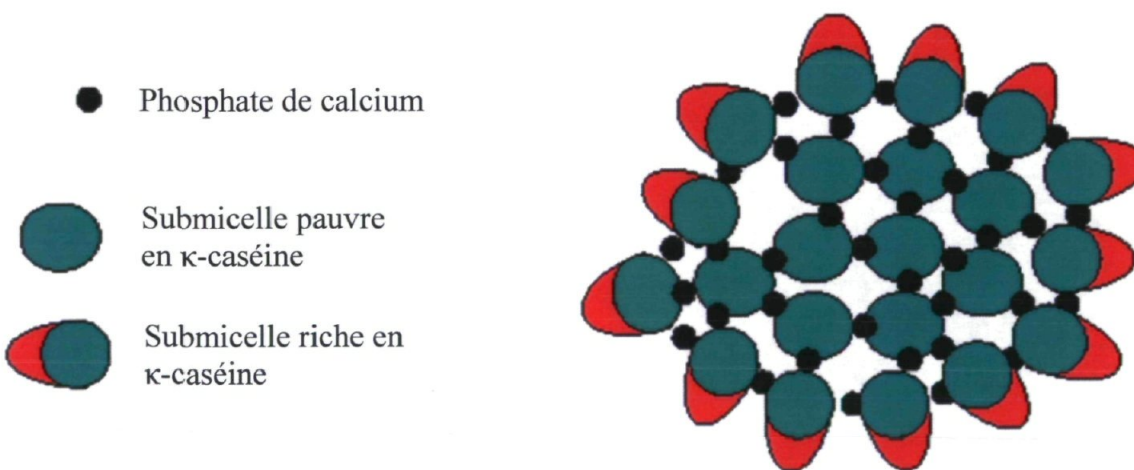


Figure I.1: Structure d'une micelle de caséine. Adaptée de Horne *et al.* [13].

En effet, la caséine κ contient une portion glycomacropeptidique qui lui confère un caractère hydrophile, alors que les autres caséines sont préférentiellement hydrophobes. Les micelles précipitent lors de l'acidification du lait à pH 4,6 à la température de 20°C. À cette valeur, le calcium micellaire se dissout et les ponts phosphate de calcium se rompent, perturbant considérablement la structure des micelles qui subissent un étirement et forment un gel.

I.1.2. Les protéines du lactosérum

Le lactosérum est un sous-produit issu de l'industrie fromagère. Il s'agit de la partie liquide obtenue après action soit de présure pour l'obtention de fromages, soit d'acides pour l'obtention de caséinates. Les protéines du lactosérum sont insensibles à ces deux traitements. Le lactosérum représente environ 90% du volume initial du lait et est composé de 0,7% de protéines, 4,4% de lactose et de 0,06% de lipides sur base humide [11]. L'ensemble des protéines du lactosérum sont définies comme étant les protéines solubles à pH 4,6 au contraire des caséines (voir tableau I.1). Elles présentent toutes la caractéristique d'être globulaire. La β -lactoglobuline (β -lg) est la protéine la plus importante du lactosérum bovin, caprin et ovin suivi de l' α -lactalbumine (α -la). Les trois autres protéines abondantes sont la sérum albumine bovine (BSA), les immunoglobulines (IgG) et les protéoses-peptones (PP). La fraction mineure des protéines du lactosérum comprend la lactoferrine (LF) et des enzymes dont la lactoperoxydase (LP) et le lysozyme.

Tableau I.1: Caractéristiques physico-chimiques des protéines du lactosérum bovin.

Protéines	Concentration (g.L ⁻¹)	Poids mol. (g.mol ⁻¹)	pI	Nombre de S-S (SH)	Références
β -lg	2-4	18 400	5,3	2 (1 SH)	[14-16]
α -la	0,6-1,7	14 200	4,2-4,5	4	[14, 15, 17]
IgG	0,3-0,6	15,0-96,0 × 10 ⁴	5,5-8,3	32	[14, 15]
BSA	0,3-0,4	66 400	4,7-4,9	17 (1 SH)	[14, 15, 18]
PP	0,3-0,8	400-40 000	5,1-5,6	0	[14]
LF	0,02-0,1	76 100	8,95	17	[14, 18, 19]
LP	0,01-0,03	78 000	9,5	6 (3 SH)	[20]

pI : point isoélectrique; S-S : pont disulfure.

Seules les protéines présentant un intérêt pour ce projet de doctorat seront présentées ci-dessous : la β -lg et l' α -la, parce qu'elles sont les deux protéines majoritaires du lactosérum, et la LF, parce qu'elle est la protéine laitière la plus étudiée pour l'obtention de peptides antimicrobiens.

I.1.2.1. La β -lactoglobuline

La β -lg est une protéine de 18,4 kDa retrouvée à 2-4 g/L dans le lactosérum bovin ce qui représente 55% des protéines du sérum. Elle est composée de 162 acides aminés [21] et comprend deux ponts disulfures ainsi qu'un thiol libre [16, 22] pouvant induire la formation d'un pont disulfure. La structure tertiaire de la protéine est présentée à la figure I.2. Sa structure très compacte est composée de 10 feuillets β et d'une hélice α . La conformation de la protéine dépend du pH du milieu. Dans le lait frais à pH entre 6,4 et 6,8, elle est retrouvée sous forme de dimère, c'est à dire que deux unités sont regroupées ensemble. Son poids moléculaire est alors d'environ 37 kDa. En-dessous de pH 2 et au-dessus de pH 9, la β -lg est retrouvée sous forme monomérique [16].

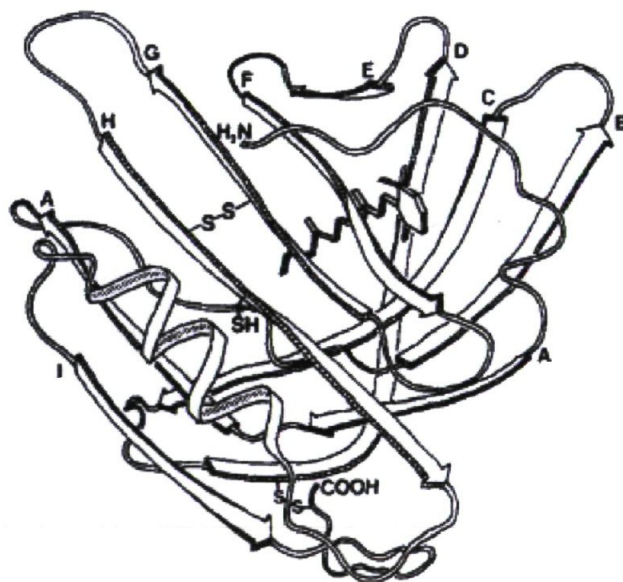


Figure I.2: Structure tertiaire de la β -lactoglobuline au pH du lait. Tirée de Papiz *et al.* [21].

La β -lg native est sensible à la trypsine mais est résistante à l'hydrolyse par la pepsine et la chymotrypsine [23, 24]. Toutefois, sa sensibilité peut être accrue par des traitements de hautes pressions [24], des traitements thermiques ou différentes conditions de solvants [25].

I.1.2.2. L' α -lactalbumine

Cette protéine est retrouvée à hauteur de 1-1,5 g/L dans le lait bovin, mais elle est la principale protéine du lactosérum humain. Dans le lait bovin, elle représente environ 22% des protéines du sérum. Son activité première est de transporter des ions calcium et joue un rôle dans la formation du lactose. Elle est composée de 123 acides aminés [17] et possède un poids moléculaire de 14,2 kDa. Au pH normal du lait, l' α -la est une molécule globulaire avec une forte affinité pour les ions métalliques (surtout le calcium). Sa structure tertiaire est présentée à la figure I.3 [26]. À cause de la raréfaction du calcium à pH acide, la protéine prend une structure dite en « globule en fusion ». Il faut noter qu'en absence de calcium, la structure de la protéine est très instable et sa température de fusion est grandement diminuée (43°C) [17].

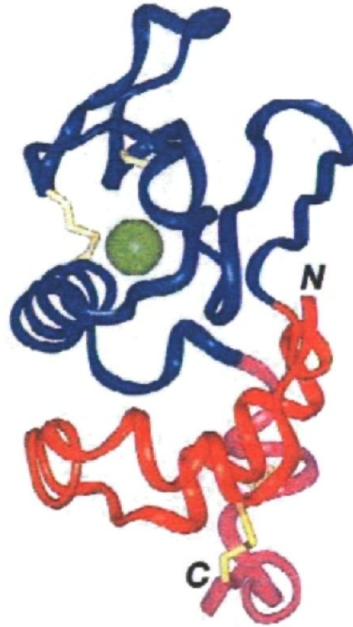


Figure I.3: Structure tertiaire de l' α -lactalbumine. Tirée de Polverino de Laureto *et al.* [26].

I.1.2.3. La lactoferrine

La LF représente environ 4% des protéines du lactosérum et est constituée d'une unique chaîne de 689 acides aminés comprenant 17 ponts disulfures, mais aucun groupement cystéine libre pour un poids moléculaire total de 76,1 kDa. La LF comprend deux lobes nommés N (acides aminés 1-333) et C (345-689) correspondant aux extrémités N-terminal et C-terminale de la protéine. Les deux lobes sont reliés par une hélice α (acides aminés 334-344). Sa structure tertiaire est présentée à la figure I.4 [27]. Son point isoélectrique est entre 8,4 et 9 ce qui lui confère une charge positive dans le lait.

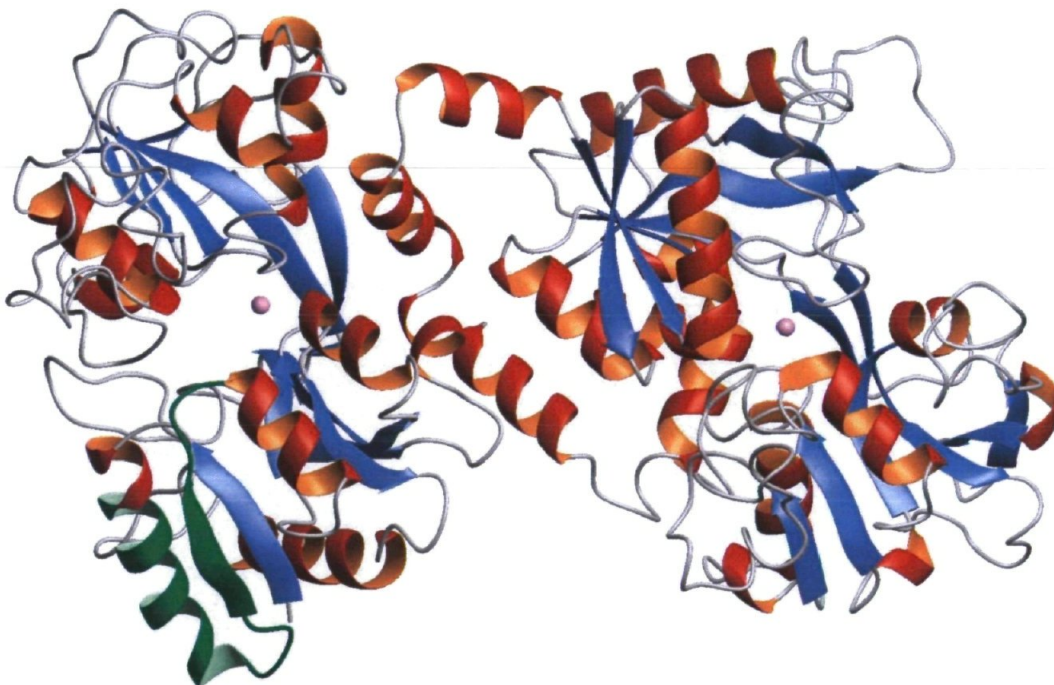


Figure I.4: Structure tertiaire de la lactoferrine bovine. Adaptée de Vogel *et al.* [27]

I.1.2.4. Les procédés d'obtention

Afin d'exploiter au maximum les qualités fonctionnelles ou nutritionnelles des protéines sériques, il est préférable d'utiliser des produits à haute teneur protéique. Pour cela, plusieurs méthodes ont été mises en place. Lorsqu'elle est précédée d'une délipidation, l'ultrafiltration du lactosérum permet d'obtenir des concentrés de protéines de lactosérum contenant de 35% jusqu'à 80% de protéines [11, 15]. Lorsqu'une étape de diafiltration ou

de chromatographie d'échange ionique est rajoutée, elle permet l'obtention d'isolats de protéines avec une teneur en protéines supérieure à 90% et pouvant être valorisés pour la consommation humaine. Toutefois les protéines individuelles du lactosérum ne sont pas utilisées de façon optimale dans de tels produits, notamment à cause de leurs propriétés distinctives. Ainsi, selon les besoins, il peut être préférable de les purifier individuellement. Le raffinement des techniques d'extraction permet maintenant d'obtenir des fractions purifiées, notamment pour des protéines mineures qui possèdent des activités biologiques intéressantes, comme la LF. Les protéines de lactosérum représente un marché important des produits à haute valeur ajoutée avec une production mondiale de 20 000 tonnes par an (en 2004) et une valeur de l'ordre de 200 millions de dollars [11].

1.1.2.4.1. L' α -lactalbumine et la β -lactoglobuline

Plusieurs méthodes ont été proposées : la filtration sur membrane [28, 29], la chromatographie [30], la précipitation chimique ou encore la séparation thermique. Toutefois, certaines de ces méthodes peuvent manquer de spécificité, proposent des rendements peu élevés et ne sont pas extrapolables industriellement [31, 32]. Seules les principales méthodes industrielles seront abordées ici.

Au pH naturel du lactosérum, la β -lg est retrouvée sous forme de dimère et son poids moléculaire est alors plus du double de celui de l' α -la (37 kDa versus 14,2 kDa). Se basant sur cette différence, une méthode par ultrafiltration tangentielle a été rapportée [33]. En utilisant des membranes dont le seuil de coupure se situe entre 50 et 100 kDa, le rétentat a tendance à s'enrichir en β -lg alors que le perméat s'enrichit en α -la [11]. Le rendement reste peu élevé mais un procédé de filtrations successives l'améliore [34]. Un autre procédé est utilisé industriellement et se base sur le fait que ces deux protéines restent solubles même lorsqu'elles sont à leur point isoélectrique respectif à température ambiante (voir le tableau I.1). Cependant, en augmentant la température entre 50 et 60°C et en se plaçant au voisinage de son point isoélectrique, l' α -la précipite suite à une dénaturation partielle, alors que la β -lg reste soluble et ne subit pas d'altération. Les agrégats d' α -la sont ensuite récupérés soit par filtration, soit par centrifugation [34]. La dénaturation de l' α -la étant parfaitement réversible lorsque le pH est augmenté ou que la température est diminuée, il est alors possible de séparer ces protéines. Dans la réalité, un traitement préalable du

lactosérum doit être effectué pour éviter la précipitation des immunoglobulines, de l'albumine bovine et des lipides [11]. Enfin, plusieurs méthodes chromatographiques par échanges ioniques sont utilisées pour séparer chacune des protéines du lactosérum, grâce à une désorption sélective faisant intervenir des gradients de pH et de force ionique, permettant d'obtenir des séparations très fines [11, 30].

1.1.2.4.2. La lactoferrine

Bien qu'en quantité bien moins grande que l' α -la et la β -lg dans le lactosérum, les activités biologiques de la LF justifient le fait que des protocoles d'extraction et de purification lui soient consacrés à l'échelle industrielle. La LF étant une des rares protéines chargée positivement dans le lait (avec la lactoperoxydase), une extraction par chromatographie d'échange cationique a été mise en place avec succès [33]. Une chromatographie d'affinité a également été réalisée avec des anticorps spécifiques et permet la production d'un extrait très pur [11].

I.2. Les peptides antimicrobiens

I.2.1. Le contexte historique

Le concept d'utiliser de molécules antimicrobiennes remonterait de l'antiquité avec l'usage de produits aussi variés que des levures, des plantes ou même des toiles d'araignée pour soulager et/ou limiter des infections contractées suite à des blessures [35]. Toutefois, les premiers témoignages d'antagonisme ont été rapportés scientifiquement qu'à la fin du XIX^{ème} siècle avec des observations de l'activité de certains *Penicillium sp.* sur la croissance de bactéries. Cependant, les premiers travaux présentant un intérêt thérapeutique ont été réalisés par Pasteur et Joubert (1877) et exposaient l'inhibition de *Bacillus anthracis* par des moisissures contenues dans l'air [36]. A priori, de nombreux cas d'antagonisme avaient été observés avant le XX^{ème} siècle sans qu'aucune utilisation pratique ne soit mise en valeur.

Les premiers travaux sur des composés antimicrobiens datent de 1888 avec la découverte de ce qui sera nommé plus tard « les protéines du complément » par Nutall, puis confirmée par Buchner l'année suivante [37]. Par la suite, des travaux datant des années 1920-1930

ont permis d'isoler les premières protéines antimicrobiennes comme le lysozyme par Fleming [38] ou la lactoperoxydase (en réalité, le système lactoperoxydase) par Jones et Simms [39]. Dans la même période, le même Fleming découvre par erreur la pénicilline, qui avait probablement déjà été mise en évidence par Duchesne en 1897 (sans certitude), mais dont les travaux n'avaient pas été poursuivis. Bien qu'identifiée et purifiée tardivement grâce aux travaux de Florey et Chain en 1939, la pénicilline est considérée comme le premier antibiotique alors qu'entre-temps d'autres antibiotiques avaient été découverts et synthétisés comme le Prontosil découvert en 1935 par les chimistes Josef Klarer et Fritz Mietzsch [40]. La seconde guerre mondiale aidant, les premières utilisations thérapeutiques pour prévenir les infections se sont faites rapidement [36].

Il est extrêmement difficile d'attribuer à quelqu'un en particulier la paternité des recherches sur les AMPs car de nombreux travaux précurseurs avaient déjà été effectués sur des protéines antimicrobiennes [38, 39, 41]. Toutefois, il est à peu près certain que le concept des AMPs a été inventé en tentant d'expliquer l'immunité chez les organismes n'ayant pas de système immunitaire acquis. En effet, au tout début des années 1980, les scientifiques n'avaient identifié que le lysozyme comme composé antimicrobien chez les insectes. Or son spectre d'action ne concordait pas avec leur immunité réelle. Ainsi, Hultmark *et al.* (1980) ont purifié à partir d'hémolymphe, les cécropines A et B, qui ont été séquencées et testées contre une batterie de bactéries après avoir pratiqué une vaccination de pupes de *Hyalophora ceropia* [42]. Les auteurs les avaient alors identifiés comme des protéines mais puisqu'ils font tous les deux 37 acides aminés de long, ils sont aujourd'hui considérés comme des peptides [43]. En règle générale, la communauté scientifique considère ces articles comme le début des recherches sur les AMPs. D'autres publications ont rapidement suivies, certaines menées par Lehrer et ses collaborateurs portant sur les granulocytes et la découverte des défensines [44], et celles de Zasloff sur la peau de grenouille qui a amené la découverte des magainines [45]. Pourtant, ces peptides n'étaient pas les premiers à avoir été identifiés et isolés. Dès la fin des années 1950, Habermann et ses collaborateurs avaient réussi à isoler et séquencer un peptide hautement actif à partir du venin d'abeille : la mélittine [46]. De la même manière, le peptide antimicrobien bombinine avait été isolé et séquencé par Csordas et Michl après que des travaux antérieurs aient relevé la présence de AMPs dans les sécrétions de la peau de *Bombina variegata* dès 1962 [47]. Ces travaux

précurseurs sont toutefois passés complètement inaperçus à l'époque et il a fallu véritablement attendre la découverte des magainines [45] et la fin des années 80 pour que la communauté scientifique prenne conscience de l'importance du phénomène.

L'éclosion actuelle des AMPs est due à plusieurs raisons successives, la première, très médiatisée, est l'augmentation des résistances aux antibiotiques, d'une part à cause des usages répétés et même quelque fois inutiles, et d'autre part en raison du manque de renouvellement de ces molécules [48]. Il faut dire que les sources d'antibiotiques ne sont pas inépuisables et que, si bon nombre de molécules sont trouvées, la majorité ne sont pas exploitables à des fins thérapeutiques, ou autres, en raison d'effets secondaires et toxiques très dommageables. Ceci fait que le nombre de nouveaux antibiotiques exploités chaque année décroît depuis les années 1990. Pour substituer aux antibiotiques, plusieurs alternatives sont envisagées parmi lesquelles : les AMPs, les bactériocines, les bactériophages et les hydrolases de parois cellulaires [4, 49]. Si toutes ces solutions apportent des avantages et des inconvénients différents, elles vont toutes devoir démontrer leur efficacité, leur innocuité et leur potentiel industriel en terme de coût et de rentabilité [4].

1.2.2. L'évolution et l'ubiquité des peptides antimicrobiens

Les premiers peptides antibactériens ayant été trouvés dans des organismes différents (abeille, papillon, grenouille et lapin pour les différents travaux cités précédemment), il n'a pas fallu longtemps pour que soit soumise l'idée de leur rôle dans l'immunité [50]. Si cette idée était déjà répandue pour des organismes comme les insectes ou les amphibiens, elle était néanmoins révolutionnaire pour les mammifères en général et le genre humain en particulier [51]. Cette hypothèse était supportée par les faits que les peptides antibactériens étaient produits beaucoup plus rapidement que les immunoglobulines, qu'ils coûtaient moins cher à produire, qu'ils se diffusaient plus facilement et plus rapidement que les cellules de défense, ce qui ne présentait que des avantages pour lutter contre une infection et surtout contre une flore bactérienne indésirable [50]. D'autres observations, comme l'homologie entre certains peptides trouvés chez différents règnes (notamment des cécropines identifiées chez le porc et les insectes) et l'induction de la synthèse des peptides de manière génique, ont consolidé cette hypothèse [52]. Depuis, celle-ci a été étayée par

l'identification de nombreux peptides dans tous les règnes du vivant [53, 54] et leur nombre n'a cessé de s'accroître [55, 56].

Des AMPs ont donc été trouvés chez les procaryotes [57] et chez les eucaryotes, de l'arthropode jusqu'aux mammifères en passant par les nématodes et les oiseaux : ils ont été retrouvés partout [58] y compris chez les archéobactéries [59]. Ils restent cependant beaucoup plus étudiés chez les insectes et les plantes que chez l'homme [60]. Leur spectre d'action s'est considérablement élargi avec des activités contre les champignons, les virus, les parasites et même les cellules cancéreuses [61]. L'ubiquité des AMPs ne faisait plus de doute, des modifications ont été apportées concernant l'évolution du système immunitaire en corrélation avec l'évolution des espèces [62]. Boman, dès 1991, tentait déjà d'expliquer la persistance et la nécessité des AMPs chez les eucaryotes en abordant l'évolution du système immunitaire depuis les organismes unicellulaires jusqu'aux mammifères [50]. L'avènement de la bio-informatique a permis de mettre récemment en évidence ce qu'il convient d'appeler une signature nommée le cœur- γ (« γ -core » en anglais) et qui est commune dans les structures 3D de bon nombre d'AMPs, mais également dans les toxines, les venins, etc. Les auteurs se sont empressés d'émettre l'hypothèse d'un ancêtre commun et ont proposé l'hypothèse selon laquelle le cœur- γ est l'archétype du motif d'interaction avec une membrane [63]. Cette structure particulière a permis d'isoler de nouveaux peptides, dont la kaliocine-1, qui est un peptide issu de la lactoferrine humaine [63]. Bien entendu, cette structure ne se retrouve pas dans tous les AMPs ou molécules cousines. Par exemple, le groupe des peptides enrichis spécifiquement en acides aminés ne possède pas cette structure. Actuellement, les AMPs sont considérés comme un mécanisme ancestral de défense et leur rôle fondamental dans l'évolution des organismes pluricellulaires est reconnu [64]. De fait, ils sont retrouvés à divers endroits à l'intérieur d'un même organisme eucaryote.

Les AMPs identifiés en grand nombre se trouvent concentrés au niveau des tissus épithéliaux (langue, œil, peau, épithélium gastrique...) ou des fluides (lymphe, sueur, larmes, lait...) susceptibles d'être en contact avec des organismes microbiens [65]. La capacité hémolytique de ces peptides est souvent faible ou nulle afin de prévenir la destruction des cellules-hôtes. Cependant, il existe des exceptions, qui vont alors nécessiter

la mise en place de mécanismes afin de limiter les dommages pour l'hôte [66]. Les peptides vont d'une part, permettre une réponse inflammatoire rapide et d'autre part, permettre une modulation de la réponse immunitaire en jouant sur de nombreux facteurs, tels que la simulation de l'apoptose ou l'activation des lymphocytes, malheureusement non identifiés de manière exhaustive encore [61, 64].

Un autre emploi des AMPs est leur présence dans les venins [67, 68]. Certains vont alors présenter des aspects hémolytiques ou cytotoxiques, parfois très forts, ce qui fait qu'ils sont plus considérés comme des toxines que comme des AMPs, à la manière des mycotoxines fongiques avec les antibiotiques, mais d'autres ne vont pas présenter cet effet toxique [69, 70]. Il n'en reste pas moins que ces AMPs ne contribuent pas à l'immunité de l'hôte qui les produit mais vont servir pour sa défense et/ou sa prédation. Certains auteurs voient là une adaptation des AMPs épithéliaux pour être efficaces contre les prédateurs plus grands [71]. Les derniers AMPs à avoir été identifiés sont ceux dérivant des protéines plus grandes à l'instar de la lactoferricine qui dérive de la lactoferrine [72]. Toutefois comme le font remarquer Hancock et Diamond, la plupart de ces peptides proviennent de protéines impliquées dans l'immunité innée et qui présentent déjà des caractéristiques et des activités partagées par de nombreux AMPs cationiques [61].

1.2.3. La diversité et les différentes classifications

Il existe une telle variété d'AMPs, que ce soit au niveau de la longueur de la chaîne, de la structure ou de la composition en acides aminés qu'il est difficile d'établir une classification précise [64]. Pour le moment et d'après la base de données des AMPs (APD : Antimicrobial Peptide Database ; <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), 2110 AMPs ont été recensés (page consultée le 22 octobre 2012). La toute première classification était basée sur la taxonomie, mais les observations d'AMPs avec des structures similaires et des séquences très proches chez plusieurs eucaryotes de différents règnes l'ont très vite rendu caduque [73]. Cependant, certaines traces de cette classification préhistorique existent encore. La bombinine a été nommée ainsi car elle a été découverte chez l'espèce *Bombina variegata* en 1962 [47], la théromacine car elle a été isolée chez *Theromyzon tessulatum* [74].

Habituellement, la classification des AMPs se fait sur les caractéristiques de leurs structures secondaires et de leur composition en acides aminés [64, 75-77]. Cependant, le consensus sur la classification des AMPs n'est pas encore tout à fait atteint, les auteurs ne se basant pas forcément sur les mêmes motifs ou caractéristiques physicochimiques des peptides. Ainsi, il n'existe pas de classification définie au niveau international. D'ailleurs, les structures secondaires et tertiaires de nombreux peptides n'ont pas encore été déterminées ce qui pose d'emblée une limite à une classification. Pour comprendre la difficulté d'établir un consensus, les différentes structures des peptides ainsi que les différentes classifications seront analysées.

I.2.3.1. La classification usuelle

Malgré les différences entre les classifications, certains groupes restent communément retrouvés, tel le groupe des peptides linéaires formant une hélice α qui est cité par tous les auteurs. Les complications se cristallisent sur certains AMPs un peu particuliers qui vont être détaillés par la suite. La majorité des auteurs se limitent aux structures secondaires afin d'établir une classification des AMPs [73, 78], ce qui donnent la classification suivante.

I.2.3.1.1. Les peptides linéaires

I.2.3.1.1.1. Les peptides à hélice α

Ce sont les AMPs fréquemment considérés comme les plus nombreux, a priori à tort d'après l'APD, mais qui sont les plus étudiés [75, 79, 80]. Le plus souvent, il s'agit de peptides de faible longueur (< 40 acides aminés), avec un caractère amphiphile prononcé. Dans un environnement aqueux, leur structure est désordonnée mais au fur et à mesure qu'ils approchent d'une membrane phospholipidique, leur conformation change pour présenter une hélice α aux abords ou au contact de la membrane. La figure I.5 présente trois exemples de peptides à hélice α fréquemment cités [81]. Ces peptides se caractérisent généralement par une forte charge positive ainsi que l'absence totale de résidus cystéines, ce qui a pour conséquence que la majorité des auteurs n'incluent pas les peptides anioniques dans ce groupe et considèrent qu'il est composé uniquement de peptides cationiques. Toutefois, il existe des exceptions à la règle : l'alaméthicine forme une hélice α et présente cependant une charge globale légèrement négative [82, 83]. Les peptides

contenant une hélice α mais avec un ou des ponts disulfures sont placés dans le groupe des peptides cycliques [75]. Les cécropines, composantes d'une des familles les plus importantes des AMPs, sont les parfaites représentantes des peptides à hélice α [84, 85], tout comme les magainines [86].

Les différentes études ne s'accordent pas sur l'importance de l'hélice α . Tôt après la découverte de la magainine, des essais avaient déterminé que le remplacement de plusieurs acides aminés impliqués dans la conformation en hélice α , par des alanines, résultait en une perte de la structure et de l'activité [87]. Ces travaux ont ensuite été complétés en remplaçant certains acides aminés par leur homologue de la série D. Cette fois encore, l'activité des peptides s'en trouvait fortement réduite [88]. Par la suite, des travaux similaires réalisés à partir d'un dérivé du peptide pardaxine, ont révélés que le peptide changeait de conformation et passait d'une structure en hélice α à une structure en feuillet β après incorporation d'acides aminés de la série D [89]. Dans ce cas, l'activité restait la même. Les auteurs ont avancé que c'était probablement la rupture de l'équilibre entre plusieurs facteurs tels que l'hydrophobicité, la charge et la structure qui expliquait la perte d'activité lors des travaux sur la magainine [89].

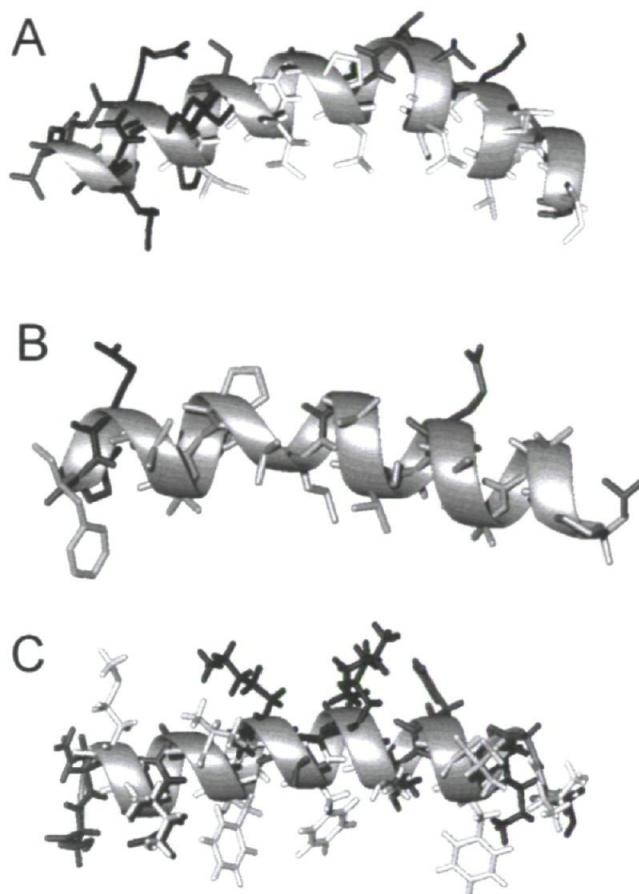


Figure I.5: Exemples de peptides à hélices α . (A) mélittine, (B) alaméthicine et (C) magainine. Adaptée de Bechinger [81].

I.2.3.1.1.2. Les peptides enrichis spécifiquement en acides aminés

Il s'agit de peptides dont la séquence contient une forte proportion d'un ou de plusieurs acides aminés. Ces peptides peuvent être cationiques ou anioniques. Les acides aminés les plus souvent retrouvés, chez les peptides cationiques, sont la proline, la glycine, le tryptophane et l'histidine mais l'arginine et la phénylalanine peuvent également être présents. Les peptides anioniques appartenant à cette catégorie sont enrichis en acides glutamiques et aspartiques [75]. Des études sur l'indolicidine et la drosocine ont montré que ces peptides avaient eux aussi une conformation aléatoire en milieu aqueux [90] et qu'une petite proportion d'entre eux adoptent une conformation repliée en présence des membranes [76, 91]. Toutefois, la structure adoptée par ces peptides lors de leur intégration

dans la membrane fait toujours débat [92]. En guise d'illustration, une étude de 2001 a démontré la capacité de peptides riches en arginine, provenant du virus du SIDA, à traverser la membrane de cellules de mammifères [93]. La plupart d'entre eux présentaient des conformations aléatoires mais il y en avait un qui présentait une conformation typique des hélices α en milieu aqueux.

1.2.3.1.2. Les peptides avec des feuillets β

1.2.3.1.2.1. Les peptides sans pont disulfure

Il s'agit de peptides présentant un ou plusieurs feuillets β , mais aucun pont disulfure, la structure du peptide étant assurée par une cyclisation partielle ou totale du squelette peptidique et maintenue par des ponts hydrogènes. Il n'existe que très peu d'exemples et cela souligne bien la difficulté de présenter une classification logique. La majorité des auteurs n'en parlent même pas mais lorsqu'ils le font, ces peptides sont placés dans le groupe des peptides contenant des ponts cystéines [94]. La gramicidine S fait partie de ces peptides particuliers [95, 96] de même que les tyrocidines [94].

1.2.3.1.2.2. Les peptides avec un ou plusieurs ponts disulfures

Le dernier groupe majoritaire est celui comprenant les peptides avec un ou plusieurs ponts disulfures qu'ils soient anioniques ou cationiques [75, 77]. Les peptides de ce groupe sont classés selon le nombre de ponts disulfures retrouvé dans leur structure. En fonction de ce nombre, les peptides peuvent présenter différentes structures comme celle en épingle à cheveux retrouvée chez les brévinines ou bien des structures plus évoluées avec des hélices α et/ou des feuillets β comme chez les défensines [77]. La lactoferricine B contient un pont disulfure qui permet de stabiliser sa structure en feuillet β et appartient à ce groupe [97]. Certains auteurs n'hésitent pas à faire une nouvelle séparation entre les peptides avec un seul pont disulfure et les autres [73, 98], qui peuvent contenir jusqu'à cinq ponts disulfures [74].

1.2.3.2. Les variantes existantes dans la classification

Étant donné que la majorité des AMPs isolés sont cationiques, la plupart des auteurs utilisent ce critère pour effectuer une première division parmi les AMPs : les peptides

cationiques, fortement majoritaires et les autres, c'est-à-dire les peptides neutres ou anioniques. Ces deux groupes sont ensuite subdivisés selon la structure des peptides telle que décrite ci-dessus. Il arrive que les auteurs fractionnent l'ensemble des AMPs selon d'autres critères tels que la fonction dans l'organisme (neuropeptides, hormones, peptides dérivés de protéines plus grosses, etc.) [75]. Enfin, d'autres classifications un peu oubliées ont été proposées comme la classification selon le mode d'action ou selon l'activité biologique mais elles sont non applicables car, comme détaillé plus loin, le mode d'action peut être différent d'une cible à l'autre et chaque peptide peut posséder plusieurs activités biologiques, dont certaines encore insoupçonnées, ce qui compliquerait la classification et entraînerait des modifications en permanence [73].

1.2.3.3. Les peptides qui alimentent le débat

Ce sont les peptides qui concentrent la majorité des désaccords entre les auteurs. Les critères ne paraissent pas bien définis ce qui fait que certains auteurs y font mention, d'autres non. Dans les faits, les peptides identifiés ici pourraient être placés dans un des groupes vu précédemment. Les limites habituelles de tout système de classification se profilent.

1.2.3.3.1. Les peptides contenant des acides aminés modifiés

Ce sont des peptides reconnus pour être produit par des bactéries et qui contiennent des acides aminés modifiés comme la lanthionine ou la β -methyllanthionine. Ils correspondent grosso-modo aux bactériocine de la classe I. De fait, la nisine est le meilleur exemple de peptide faisant parti de cette catégorie [99]. Toutefois, de tel peptide existe aussi chez les eucaryotes. Par exemple, un peptide antimicrobien de ce type a récemment été découvert chez un annélide. Il s'agit de l'hédistine qui contient du bromotryptophane [100]. En revanche, des peptides synthétiques peuvent très bien contenir des acides aminés modifiés [101]. Dans les faits, ces peptides restent rarement pris en compte par les auteurs [102].

1.2.3.3.2. Les peptides issus de protéines natives

Certains auteurs placent ces peptides dans une catégorie à part alors que bien souvent leur structure aurait permis de les placer dans une des catégories citées ci-dessus à l'instar de la lactoferricine qui peut être classée dans cette catégorie ou dans celle des peptides avec des ponts disulfures [75]. Les AMPs issus des protéines laitières sont majoritaires, pour le moment, avec ceux issus de l'hydrolyse de l'hémoglobine et du lysozyme mais d'autres ont été identifiés comme la buforine I qui provient de l'histone H2A [103] ou encore, des peptides provenant de protéines capables de traverser les parois membranaires [104].

1.2.3.3.3. Les peptides anioniques

Les AMPs référencés présentant une charge globale anionique ne constituent qu'un faible pourcentage des AMPs connus (à peu près 10%). Certains auteurs les classent dans les différentes catégories répertoriées précédemment alors que d'autres les mettent à part [75]. Ces derniers se justifient en arguant le fait que ces peptides nécessitent la présence de cofacteur cationique, généralement un ion métallique divalent tel que le zinc ou le fer pour pouvoir interagir avec la membrane sans se faire repousser [105, 106]. La kappacine qui est un peptide dérivé de la κ -caséine est un bon exemple illustrant ce groupe. Ce peptide devient fortement antimicrobien en présence de Zn^{2+} alors que son activité est modérée voir faible lorsqu'il est seul [107]. Toutefois, d'autres peptides anioniques ne requièrent pas la présence de cofacteur [106]. C'est le cas de la maximine H5, isolée sur la peau de *Bombina maxima* [108]. Leur mode d'action demeure flou pour la simple raison que la plupart des modèles établis l'ont été à partir de peptides cationiques. L'alaméthicine fait figure d'exception avec le modèle en douve du tonneau dont il est, pour l'instant, l'unique ambassadeur [109]. Dans certains cas, il a été possible de déterminer comment le peptide agissait. La kappacine, par exemple, a démontré sa capacité à perméabiliser des liposomes synthétiques [107], alors que les peptides isolés du surfactant de poumon de mouton entraînent une floculation du matériel intracellulaire de *Mannheimia haemolytica* (anciennement *Pasteurella haemolytica*) [105].

I.2.4. Les interactions entre les peptides antimicrobiens et les microorganismes

I.2.4.1. La spécificité des peptides

Quel que soit leur mode d'action, les AMPs doivent obligatoirement interagir avec la membrane des cellules microbiennes. Or, il se trouve que la membrane est un élément indispensable et distinguable des microorganismes. En effet, la membrane plasmique de la majorité des microorganismes présente de nombreux phospholipides anioniques et possède une charge négative nettement plus importante que celle des organismes eucaryotes, qui est composée de peptides neutres. Par conséquent, ces dernières vont présenter une affinité bien moins forte pour les AMPs cationiques que les membranes de microorganismes (voir la figure I.6). Toutefois, les peptides avec une charge positive très importante vont également interagir avec les membranes cytoplasmiques des eucaryotes et avoir un effet hémolytique qui pourrait limiter leur utilisation. Les peptides anioniques vont nécessiter la présence de cofacteur pour atteindre la membrane [75]. Toutefois, d'autres mécanismes doivent probablement rentrer en jeu car certains de ces peptides exhibent une action même sans ces cofacteurs [106].

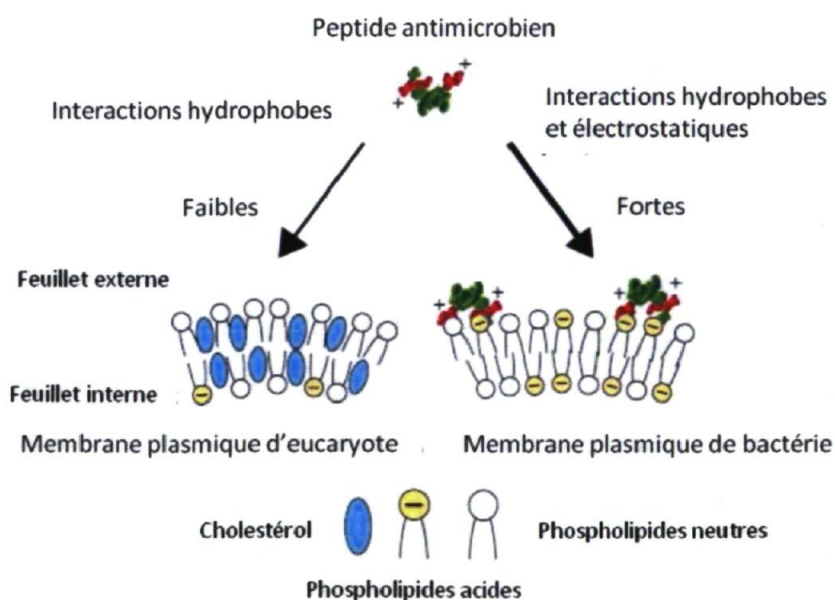


Figure I.6: Spécificité des AMPs, basée sur la composition des membranes cibles. Traduite de Zasloff [64].

I.2.4.2. Les différents modèles d'action théoriques proposés

Dans le cadre de ce travail, seuls les mécanismes ayant pour cibles des bactéries ou des champignons vont être abordés. Toutefois pour être exhaustif, il faudrait compléter cette partie avec les mécanismes antiviraux et antiparasitaires. Il faut savoir que les peptides ne sont pas limités à un seul mécanisme d'action et peuvent les combiner en agissant à deux niveaux (membranaire et intracellulaire). A priori, ils peuvent même disposer de mécanisme différent selon la souche visée (Voir la figure I.7) [110].

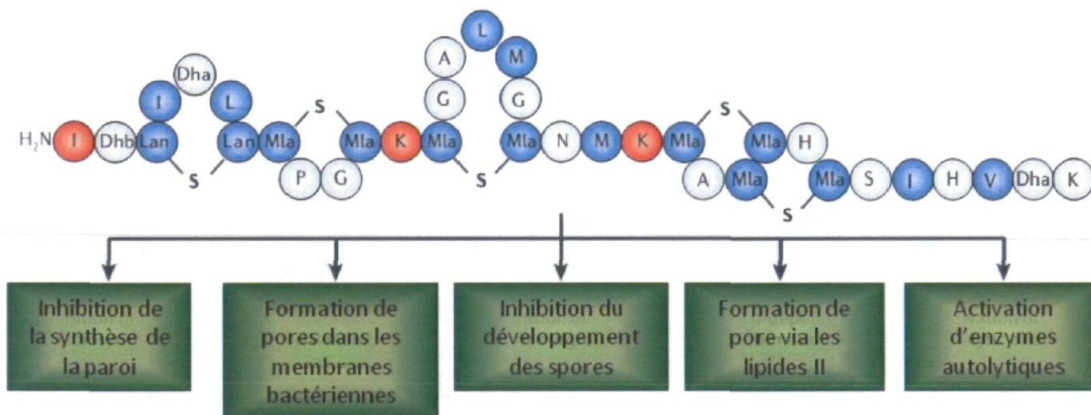


Figure I.7: Les différents modes d'action de la nisine. Traduite de Peschel & Sahl [110].

I.2.4.2.1. Les mécanismes antibactériens

À ce jour, plusieurs mécanismes d'action ont été identifiés. La plupart des peptides ont une action directe sur la membrane bactérienne par le biais de deux mécanismes. Le premier est la formation de pores, ce qui induit un flux d'ions vers l'extérieur de la cellule bactérienne, causant une dépolarisation de la membrane et une perte du contenu cellulaire qui vont conjointement induire la mort de la cellule. Le deuxième est la destruction/solubilisation de la membrane. D'autres peptides ont une action intracellulaire, en agissant sur des mécanismes primordiaux pour le bon fonctionnement cellulaire [75].

I.2.4.2.1.1. Les mécanismes membranaires

Différents mécanismes membranaires ont été identifiés au fur et à mesure des études réalisées. Parmi eux, les modèles avec pores les plus souvent cités sont celui des pores en douve du tonneau et celui des pores toroïdaux. Le modèle en tapis est le modèle de prédilection concernant la destruction/solubilisation de la membrane.

I.2.4.2.1.1.1. L'hypothèse d'un modèle unique

De manière expérimentale, chaque peptide possède deux états physiques distincts lorsqu'il est lié à une membrane plasmique. À faible ratio peptide/lipide, le peptide a tendance à s'insérer dans un état fonctionnellement inactif dans les têtes phospholipidiques. En revanche, lorsque le ratio atteint une valeur seuil déterminée par la composition lipidique de la membrane cellulaire, le peptide devient actif et peut former des pores qui seront létaux pour la cellule. Dans ce cas, la sensibilité d'une cellule à un peptide antimicrobien va dépendre de la valeur du ratio peptide/lipide à atteindre [111]. D'autres proposent un modèle encore plus complexe prenant en compte différents facteurs comme le ratio peptide/lipide, la composition et l'hydratation de la membrane, la température et enfin la composition du liquide tampon pour expliquer l'action d'un peptide sur une membrane [81, 112]. Ceci explique pourquoi la sensibilité d'une bactérie à un peptide n'est pas directement corrélée à son affinité, pourquoi certains peptides vont préférentiellement tuer tel ou tel agent pathogène et enfin pourquoi les peptides présentent des niveaux variables d'activité hémolytique contre différents types de cellules eucaryotes [111].

Finalement, il paraît vraisemblable que l'action d'un peptide sur une membrane dépende d'un ensemble de facteurs qui vont gouverner l'interaction lipide/membrane comme présenté à la figure I.8. Toutefois, ce modèle ne fait pas encore consensus [113].

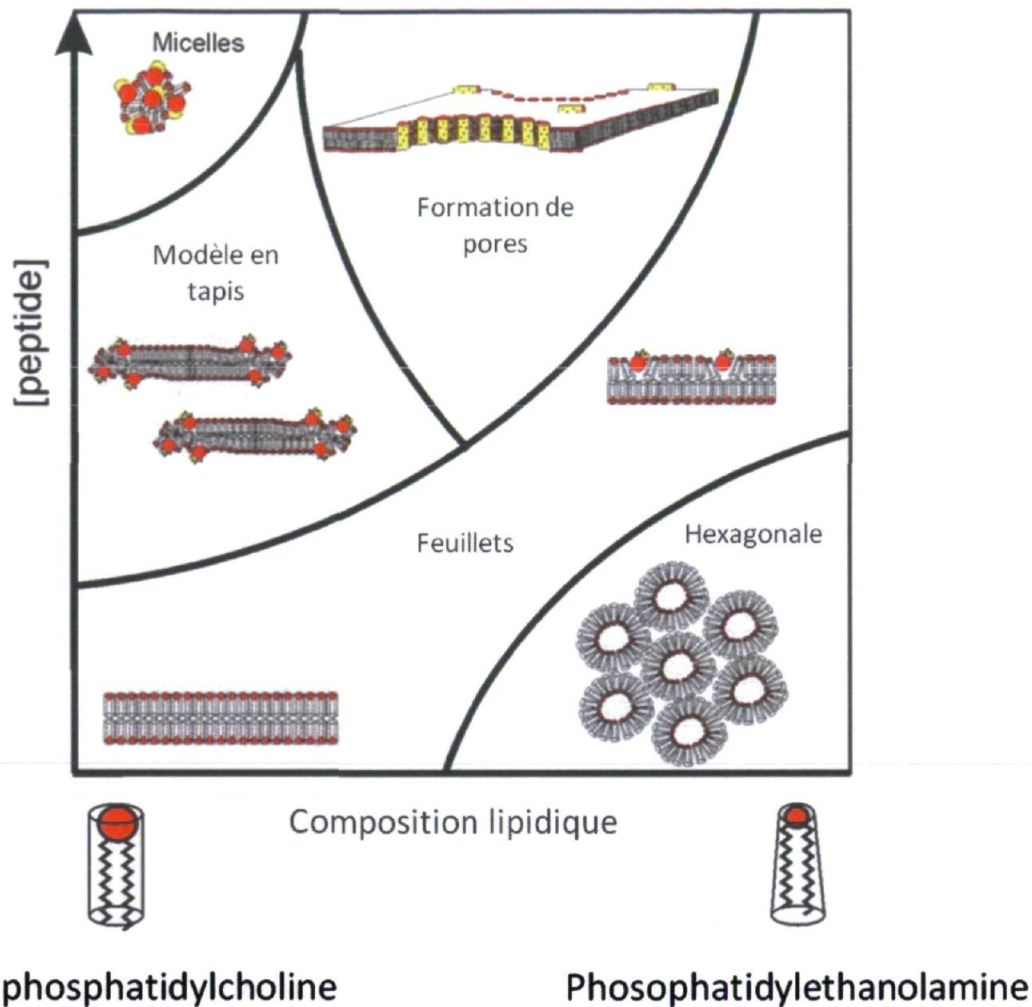


Figure I.8: Les différents modes d'action du modèle unique en fonction de la concentration en peptides associés à la membrane et de la composition lipidique de la membrane. Traduite et adaptée de Bechinger [113].

1.2.4.2.1.1.2. Le modèle en douve du tonneau

Ce modèle a été proposé au début des années 70, par Baumann et Mueller, pour décrire l'action de l'alaméthicine [114]. Il a été conçu à partir de peptides à hélice α mais pourrait s'adapter à des peptides présentant des feuillets β [115].

Le mécanisme d'action est illustré à la figure I.9. Les peptides antibactériens se regroupent à la surface membranaire soit sous la forme de monomères, c'est-à-dire qu'ils adoptent leur structure en hélice α en se fixant à la membrane, soit sous la forme d'oligomères. Dans ce

cas, la conformation la plus plausible est la ségrégation de la partie hydrophobe vers l'intérieur de l'oligomère et l'exposition de la partie hydrophile à l'environnement aqueux [115]. Par la suite, ils écartent les têtes membranaires hydrophiles et pénètrent dans la double couche de phospholipides avec laquelle leur composante hydrophobe va interagir et s'aligner. La partie hydrophile du peptide va permettre la formation d'un pore en se regroupant avec d'autres peptides ce qui induit la perméabilisation membranaire de la cellule et le déversement de son contenu, entraînant la mort cellulaire [98]. La taille du pore va fluctuer en fonction du nombre de monomères qui le compose.

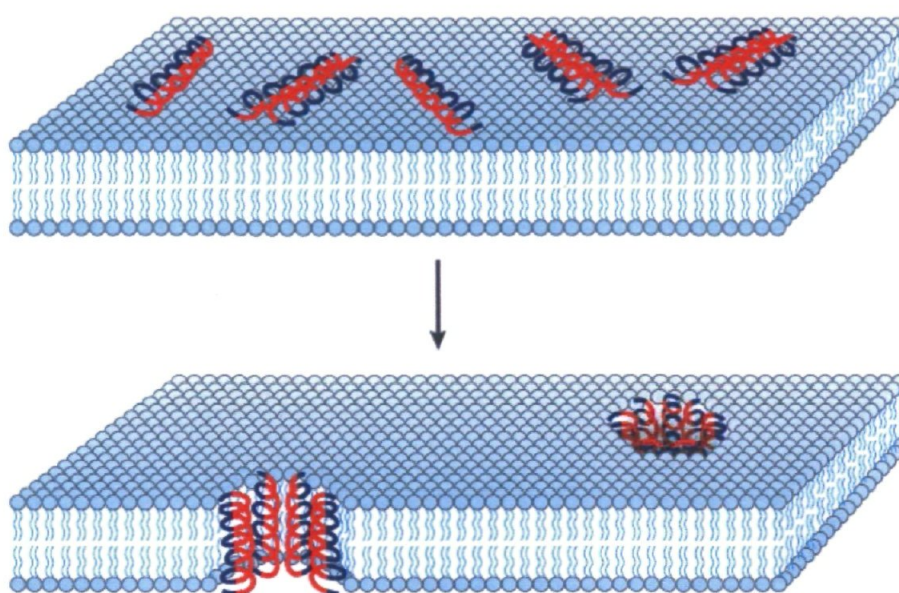


Figure I.9: Représentation du modèle en douve du tonneau. En haut, fixation du peptide à la membrane. En bas, formation du pore. Les parties hydrophobes des peptides sont en bleu et les parties hydrophiles en rouge. Tirée de Brogden [75].

Étant donné que ces peptides peuvent s'insérer dans le noyau hydrophobe de la membrane, il semble évident que leur liaison à la membrane cible est essentiellement gouvernée par des interactions hydrophobes. Par conséquent, ces peptides semblent pouvoir se lier aux phospholipides membranaires chargés mais également à ceux qui présentent un caractère zwiterionique, ce qui devrait les rendre hémolytiques. De plus, étant donné que les surfaces hydrophiles des différents peptides se retrouvent face à face lors de la formation du pore, il est peu probable que ces hélices soient chargées de manière uniforme ou trop importante.

C'est-à-dire que les peptides les plus susceptibles de former ce genre de pores vont être faiblement chargés voir neutres [98]. À ce jour, l'alaméthicine est toujours l'unique peptide identifié qui agit sur les membranes de cette manière [109].

1.2.4.2.1.1.3. Le modèle des pores toroïdaux

Ce modèle a été proposé en 1996 par deux équipes, de manière indépendante, pour expliquer l'insertion de la magainine dans la membrane [116, 117] étant donné que les observations expérimentales ne correspondaient pas à ce qui aurait dû être décrit avec le modèle en douve du tonneau [118]. Il est présenté à la figure I.10. Dans ce cas, les peptides fixés à la membrane vont forcer le déplacement des têtes phospholipidiques qui, en se repliant à l'intérieure de la membrane, vont provoquer la courbure positive de cette dernière. Ceci n'est possible que si le peptide a une interaction très forte avec les têtes phospholipidiques. Cette flexion va induire la formation d'un pore de manière transitoire mais n'est énergétiquement explicable que par l'intégration des régions hydrophobes des peptides dans la zone membranaire déformée. Contrairement au modèle précédent, le pore est donc formé à la fois par la membrane et le peptide [116]. Il semble également plus adapté pour expliquer la formation de pore avec des peptides fortement cationiques, car le pore est formé avec un nombre beaucoup plus restreint de monomères ce qui limite la répulsion entre eux [118].

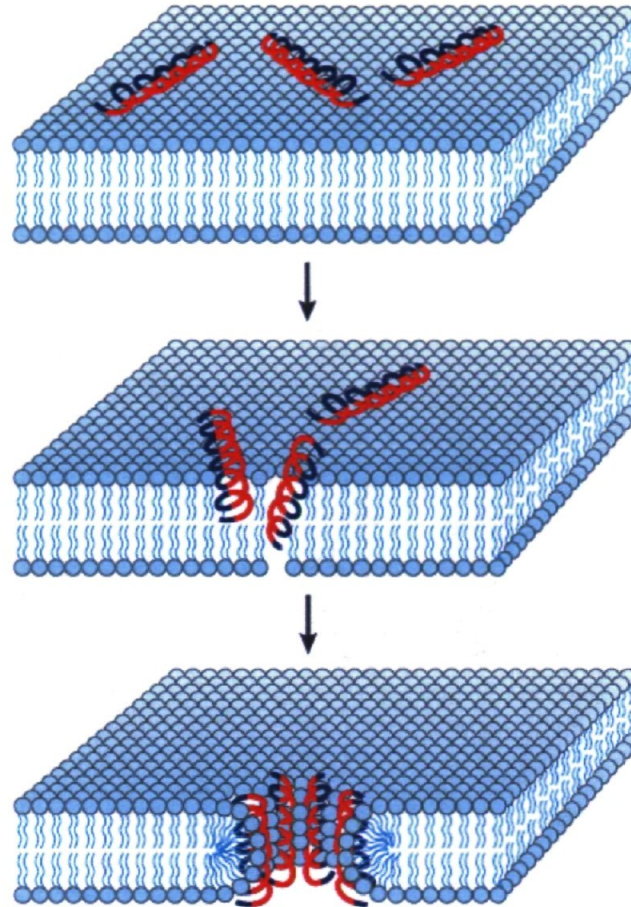


Figure I.10: Illustration du modèle des pores toroïdaux. En haut, fixation à la membrane. Au milieu, insertion dans la membrane et en bas, formation du pore. Les parties hydrophobes des peptides sont en bleu et les parties hydrophiles en rouge. Tirée de Brogden [75].

Des modélisations informatiques avec la magainine ont récemment mis en lumière le fait que les pores n'auraient pas une conformation aussi rigide que prévue, mais plutôt une conformation désordonnée, avec un pore non cylindrique composé de peptides présentant des orientations variées (voir la figure I.11). L'ensemble est très différent du modèle classique qui impose des conformations parallèles ou perpendiculaires aux peptides, par rapport à la membrane. Les auteurs ont proposé le modèle des pores toroïdaux désordonnés pour expliquer leur résultat [119]. D'autres études informatiques ont validé leur modèle. Ainsi, Rzepiela *et al.* ont démontré, grâce à des simulations informatiques, que les peptides magainines formant un pore toroïdal devaient présenter un taux optimal d'hélice α

d'environ 65% pour stabiliser le pore, qu'un pourcentage plus élevé aboutissait à l'effondrement du pore et qu'un taux inférieur rendait le pore moins stable mais qu'il restait néanmoins ouvert [120].

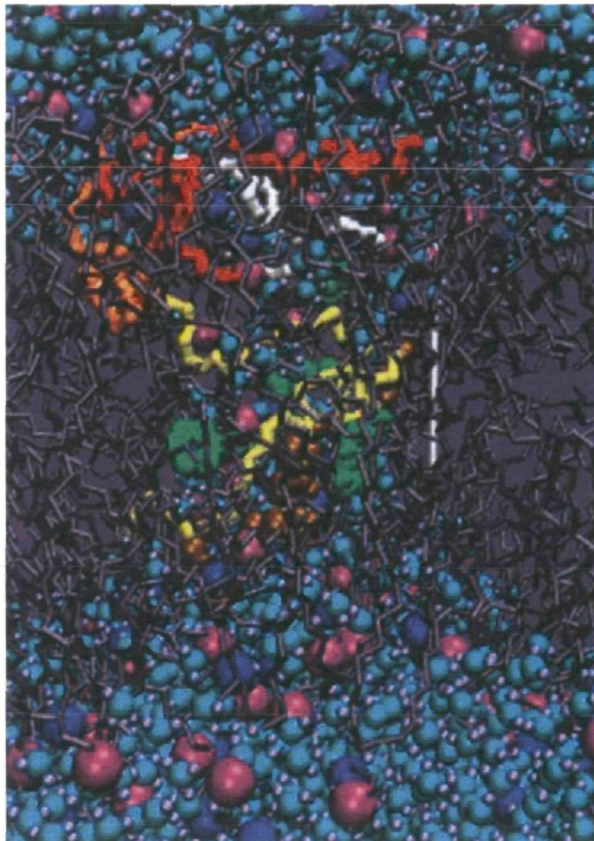


Figure I.11: Modélisation informatique du modèle des pores toroïdaux désordonnés. Les peptides sont représentés en jaune, orange, rouge, et blanc. Les queues lipidiques sont en gris et noir. Les phosphates des têtes phospholipidiques sont les sphères roses ou violettes. Tirée de Leontiadou *et al.* [119].

1.2.4.2.1.1.4. Le modèle en tapis

Ce modèle a été proposé par Pouny *et al.* en 1992 pour expliquer l'action de la dermaseptine sur des membranes modèles [121]. Les peptides s'associent avec la surface membranaire et la recouvre à la manière d'un tapis, probablement grâce aux forces ioniques. Là encore, les auteurs s'accordent pour dire que les peptides vont présenter leur composante hydrophobe face à la membrane. Lorsque la concentration en peptide devient trop importante, la membrane plasmique va subir certaines perturbations qui peuvent

éventuellement entrainer la formation de micelles de membrane. Enfin, lorsqu'une concentration critique en peptide est atteinte localement, et juste avant l'effondrement de la membrane, il existe une étape transitoire qui est la formation de pores toroïdaux. Les monomères vont jouer le rôle de charges dans la région de repliement, ce qui stabilise le pore et permet l'accès à un nombre encore plus important de peptides (voir la figure I.12), induisant la perméabilisation/désintégration de pans membranaires et la mort de la cellule [75, 115].

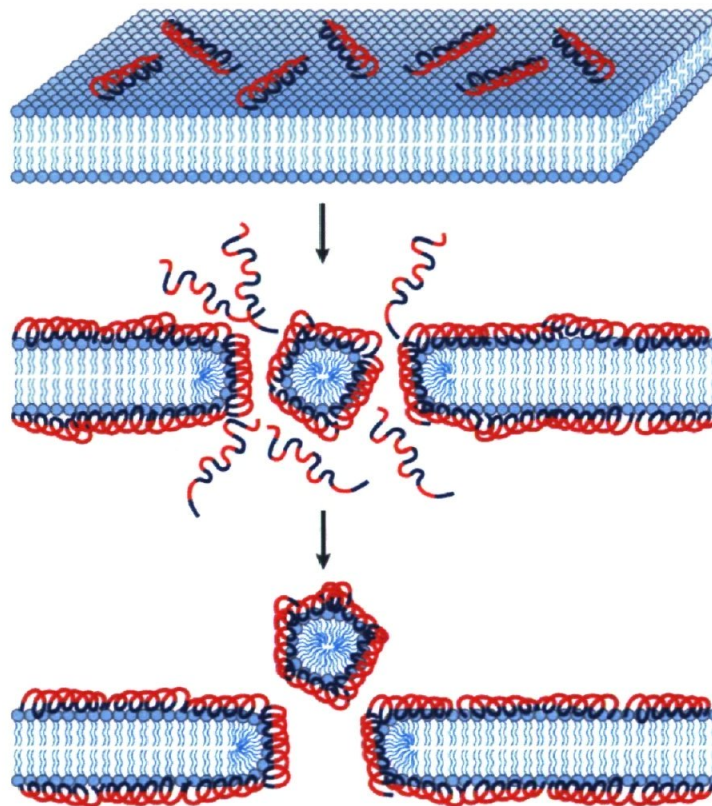


Figure I.12: Illustration du modèle en tapis. En haut, fixation à la membrane. Au milieu, formation transitoire des pores toroïdaux et en bas, désintégration de la membrane. Les parties hydrophobes des peptides sont en bleu et les parties hydrophiles en rouge. Tirée de Brogden [75].

1.2.4.2.1.1.5. Le nouveau modèle

Dernièrement, un nouveau modèle a été proposé par Lopez *et al.*, suite à des simulations informatiques utilisant une modélisation dite en « coarse-grained domain », impliquant de

petits peptides synthétiques [122]. Ces peptides s'enfouissent dans la membrane en restant liés aux têtes chargées des phospholipides. Lorsque leur concentration devient suffisante, ils peuvent faire traverser les molécules d'eau (ou autre solvant) en les faisant passer d'un peptide à l'autre via leur domaine hydrophile. Ainsi, la membrane est perméable mais ne subit ni dégât ni destruction (voir la figure I.13). Ce mode d'action n'a pas encore été confirmé expérimentalement. Toutefois, il est le seul justifiant l'activité de petits peptides qui ne sont pas censés pouvoir traverser la membrane plasmique.

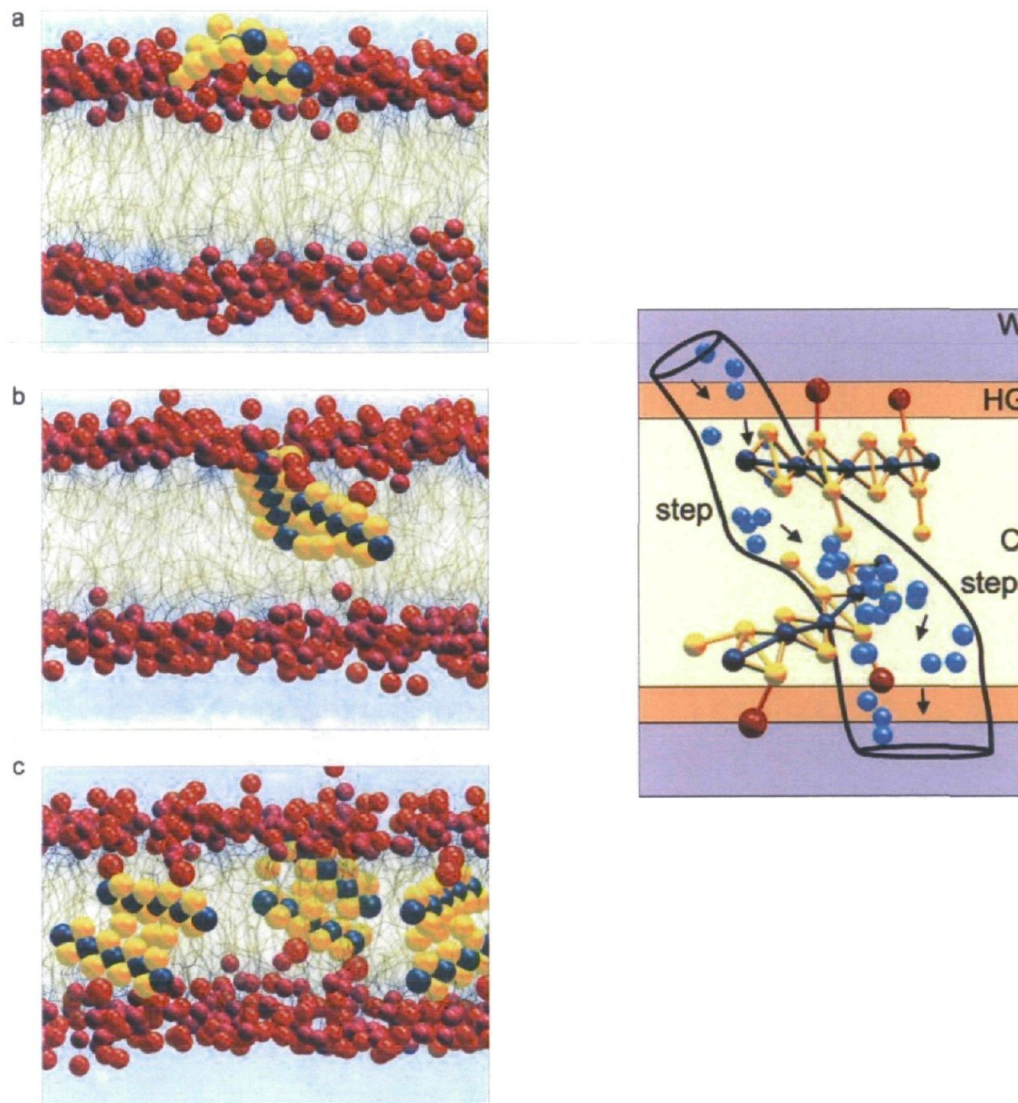


Figure I.13: Modélisation du nouveau modèle. Figure de gauche : (a) fixation à la membrane, (b) insertion dans la membrane et (c) formation de complexe peptidique. Figure de droite : passage du solvant via les domaines hydrophiles. Tirées de Lopez *et al.* [122].

I.2.4.2.1.2. Les mécanismes intracellulaires

La membrane plasmique a été la seule cible envisagée jusqu'à la découverte tardive d'AMPs capables de traverser passivement la membrane sans l'endommager et qui s'accumulait dans le cytoplasme [123, 124]. La buforine II fut le premier peptide isolé possédant cette caractéristique et l'hypothèse d'une action intracellulaire a été aussitôt avancée pour expliquer son activité [124]. Le fait que, dans certains cas, la mort de la cellule bactérienne intervienne bien plus tard qu'au moment de la perméabilisation de sa membrane a donné du crédit à cette hypothèse [125].

Les mécanismes et cibles intracellulaires sont variés : l'indolicidine, qui est capable de former des pores dans les membranes bactériennes, peut se fixer et inhiber la synthèse d'ADN [126]. La buforine II a démontré une affinité avec l'ADN *in vitro* bien que le lien entre l'activité antimicrobienne et cette connexion n'ait pas été formellement démontré encore [125]. Les peptides peuvent également agir à d'autres niveaux comme sur la traduction, la transcription ou encore la synthèse des protéines [75, 109].

Il faut retenir que si la plupart des AMPs sont capables d'induire la mort en perméabilisant la membrane plasmique d'une cellule, une bonne part va agir à l'intérieur de la cellule et causer des dégâts irréversibles. Il ne faut toutefois pas perdre de vue que de nombreuses cibles sont encore inconnues et que le mécanisme d'action de certains peptides est, en conséquence, encore indéterminé. D'autre part, il a été démontré que quelques AMPs ont des effets intracellulaires à faible concentration mais présentent toutes les caractéristiques des mécanismes membranaires à concentration plus élevée. Il se pourrait fort bien que de nombreux peptides possèdent des mécanismes à la fois intracellulaires et membranaires mais, étant donné que les mécanismes membranaires causent la mort cellulaire de manière très rapide (quelques minutes), les premiers pourraient être régulièrement masqués aux différents expérimentateurs [125].

I.2.4.2.2. Les mécanismes antifongiques

Les mécanismes antifongiques ne sont que rarement le centre de l'attention. Lorsqu'ils le sont, les efforts sont souvent fournis sur des modèles de levure tel *Candida albicans* ce qui n'est pas forcément judicieux pour les champignons filamenteux. Toutefois, il apparaît que

les AMPs agissent de plusieurs manières différentes. La première est une action sur la membrane qui, comme pour les bactéries, sera perméabilisée avec la formation de pores selon les mécanismes présentés ci-dessus [127]. La seconde est une action sur la paroi fongique, en limitant ou inhibant sa synthèse, ce qui provoque une perte de la rigidité pariétale. La paroi fongique est très variable selon l'espèce et même selon la souche de champignon étudiée, toutefois certains composés comme la chitine, les glucanes et les mannanes sont communément retrouvés [128] même si certaines exceptions s'appliquent, comme le groupe des oomycètes qui ne contient pas de chitine dans la paroi. Certains peptides auront une action soit sur la synthèse d'une de ces molécules, soit sur sa liaison avec un autre composant de la paroi compromettant ainsi la structure pariétale. Ainsi les nikkomycines inhibent la synthèse de la chitine alors que l'échinocandine inhibe la synthèse du glucane [128, 129]. L'activité sporicide découle probablement d'une activité sur la paroi, mais aucune étude ne vient le confirmer et les modes d'action restent ainsi nébuleux. Par exemple, l'hepcidine 25 est capable de retarder la germination des spores d'*Aspergillus niger* sans affecter leur viabilité alors que l'hepcidine 20 est lui sporicide [130]. De manière similaire, la drosomycine présente une activité sporicide à l'encontre des spores de *Neurospora crassa* [131]. Enfin, certains peptides antifongiques seront capables, une nouvelle fois comme chez les bactéries, d'agir au niveau intracellulaire et de bloquer certains mécanismes [132]. Par exemple, l'hisatine-5 est un peptide qui s'accumulera dans les mitochondries et stoppera la synthèse de l'ATP mitochondrial ce qui cause la mort de la cellule et à terme, du microorganisme sensible, en l'occurrence, *C. albicans* [133, 134].

1.2.4.3. L'activité et les modes d'action des peptides antimicrobiens laitiers

1.2.4.2.1. Les mécanismes antimicrobiens observés

1.2.4.2.1.1. Les mécanismes membranaires

Il a été démontré que la majorité des AMPs laitiers ont une action sur les membranes bactériennes, même si les peptides les plus étudiés restent la lactoferricine bovine (LFCine B) et ses peptides apparentés. Ainsi, Yamauchi et ses collaborateurs [135] ont démontré, par microscopie électronique, la capacité de la LFCine B à altérer rapidement la membrane interne d'*Escherichia coli* en provoquant sa dépolarisation, ce qui conduit à un effondrement du potentiel transmembranaire, après avoir perméabilisé la membrane

externe. Ce mode d'action a été confirmé pour d'autres peptides dérivés de la LFcine B sur *Penicillium digitatum* [136], pour le peptide analogue chez l'humain HLP2 sur *E. coli* [137] et pour le fragment dérivé de la lactoferrine humaine f(17-39) [138]. Des études plus récentes ont cependant indiqué que la LFcine B agit sur la membrane d'*E. coli* en la dépolarisant mais sans induire la formation de pores [139-141]. A l'inverse, le fragment f(183-207) de la sous unité de caséine α_2 a démontré sa capacité à perméabiliser la membrane interne d'*E. coli*, entraînant une fuite du contenu cytoplasmique [139]. En outre, la LFcine B induit une agrégation du matériel cytoplasmique d'*E. coli* après seulement 2 heures d'incubation, en raison de l'entrée massive d'ions H^+ [135, 142]. Ce phénomène d'agrégation avait également été observé chez des levures et des champignons filamenteux [142-144]. Des résultats similaires ont été rapportés pour le fragment f(183-207) de la sous unité α_2 de caséine toujours chez *E. coli* [139]. Il est à noter que l'addition de cations en quantité suffisante semble exercer un effet répressur sur l'action de la LFcine B [135, 143].

En dépit de sa charge anionique, la kappacine possède un effet de perméabilisation sur les membranes, démontré grâce à l'utilisation de liposomes synthétiques [107]. Elle provoque un afflux d'ions H^+ dans les cellules bactériennes ce qui entraîne une baisse du pH et la mort cellulaire. Ce mécanisme permet d'expliquer son efficacité dans des conditions acides [145]. En outre, Dashper *et al.*, [107] ont rapporté que la combinaison de kappacine et de cations divalents (Zn^{2+} ou Ca^{2+}) augmente l'efficacité antimicrobienne, probablement en raison de modification et/ou de stabilisation dans la structure du peptide. Des observations similaires ont déjà été faites avec d'autres peptides anioniques tels que les peptides anioniques associés au surfactant ou les peptides d'activation du trypsinogène [106].

Lors de la découverte de ses propriétés antimicrobiennes, il a été immédiatement supposé que la lactophoricine (LPcine; LP f(13-135)) possédait un mode d'action qui induisait la formation de pores [146]. Cela est dû à sa conformation en α -hélice dans un environnement membranaire et à sa capacité à induire des fluctuations du potentiel transmembranaire, cependant cette hypothèse n'a toujours pas été confirmée pour le moment. En revanche, la structure en hélice α de la LPcine et de deux peptides apparentés a été confirmée dans des modèles ou dans des environnements membranaires [147-149]. Récemment, Pedersen *et al.*, [149] ont montré que le peptide dérivé de la LPcine (f(110-135)) reste orienté de

manière parallèle à la membrane ce qui impliquerait d'autres mécanismes que la formation de pores classique.

Le mode d'action de la lactoferrampine (LFampine) bovine et d'un de ses peptides apparentés a été déterminé par microscopie confocale. Il s'agit du modèle en tapis puisque des structures de types vésicules ont été observés sur les membranes cytoplasmiques d'*E. coli* et de *C. albicans* [141]. En outre, des études sur des vésicules synthétiques ont montré que la partie C-terminale de la LFampine contribue à son attraction électrostatique avec la membrane microbienne bien que sa forme soit non structurée [150]. Cette observation a été récemment confirmée pour la LFampine humaine [151]. A l'inverse, les régions N-terminales des LFampines humaine et bovine adoptent une structure en hélice α dès qu'elles sont en présence de membrane, ce qui facilite leurs insertions (26, 27).

I.2.4.2.1.2. Les mécanismes intracellulaires

L'hypothèse de mécanismes intracellulaires a été formulée depuis longtemps, mais n'était justifiée que par des observations indirectes [152, 153]. Récemment, quelques-unes des cibles intracellulaires de la LFcine bovine ont été identifiées [154]. Les auteurs ont indiqué qu'elle perturbe le fonctionnement du système à deux composants, en empêchant la phosphorylation de ses régulateurs de réponse, et interagit avec certaines protéines impliquées dans le cycle de Krebs, ce qui provoque des conséquences mortelles d'un point de vue métabolique [155]. Cependant, des résultats préalables avaient montré qu'un peptide dérivé de la LFcine humaine avait peu de chances d'avoir un effet sur le métabolisme de la bactérie *E. coli*, ce qui nécessite d'être très prudent dans la transposition de mécanismes intracellulaires de la LFcine bovine à ses peptides dérivés ou apparentés [137]. La kaliocin-1 est un peptide ayant un impact limité sur la membrane des bactéries et des levures [156], mais elle a probablement une interaction avec une protéine de la membrane mitochondriale impliquée dans les phénomènes de la respiration [156, 157]. Toutefois, le mécanisme dans son ensemble est encore inconnu [158].

I.2.4.2.1.2. Les autres modes d'action observés

Un autre aspect très important des peptides dérivés de la lactoferrine et de la LFcine B, est leur capacité à se lier aux lipopolysaccharides (LPS) [159]. En fait, la membrane externe de

bactéries gram-négatives est composé en majorité par des LPS, qui est composé par un antigène O spécifique, un noyau oligosaccharidique et d'un composant lipidique appelé lipide A qui permet d'ancrer la molécule dans la membrane [159]. Même si la libération des LPS de la membrane externe provoque la mort bactérienne, ils peuvent continuer à exercer des activités endotoxiques chez les mammifères, causant de la fièvre, de la tachycardie et des chocs septiques [160]. Toutefois, plusieurs peptides dérivés des lactoferrines humaine [159, 161, 162] et bovine [135] ont démontré leur capacité à neutraliser les LPS en se liant à eux, empêchant ainsi l'inflammation. De même, le fragment f(183-207) de la sous unité α_2 de caséine bovine a montré cette capacité de se lier aux membranes externes par le biais des LPS chez *E. coli* ATCC 25922 et des acides lipotéichoïques chez *Staphylococcus carnosus* CECT 4491T [139].

En plus de leur activité antimicrobienne, certains peptides dérivés des protéines laitières semblent exercer un effet immunostimulateur *in vivo*. A titre d'exemple, l'isracidine est plus efficace *in vivo* qu'*in vitro*, ce qui suggère un effet immunostimulateur [163]. De manière similaire, le fragment f(1-11) de la lactoferrine humaine présente de meilleurs résultats *in vivo* chez la souris, sans doute à cause d'interactions avec son système immunitaire [164].

1.2.4.2.2. L'activité en synergie

Au cours de la dernière décennie, l'efficacité d'un certain nombre d'AMPs laitiers a été évaluée en combinaison avec d'autres traitements ou agents antimicrobiens. Le tableau I.2 répertorie les différents effets synergiques rapportés dans la littérature. À ce jour, les synergies de seulement 7 peptides laitiers différents ont été étudiées, ce qui montre une véritable lacune dans ce champ d'information. Pour le moment, des effets synergiques ont été observés uniquement avec des composés antimicrobiens tels que les antibiotiques ou antifongiques, à l'exception des traitements physiques, notamment les hautes pressions. Au total, 10 antibiotiques ont un effet synergique avec des AMPS laitiers contre *E. coli* et *Staphylococcus aureus*. Par exemple, les combinaisons pénicilline ou streptomycine avec l'isracidine démontrent un effet synergique contre des souches de *S. aureus* résistantes aux antibiotiques [163]. Plus récemment, Flores-Villaseñor et ses collègues [168] ont rapporté

Tableau I.2: Effets synergiques référencés dans la littérature, obtenus avec des AMPs laitiers en combinaison avec d'autres traitements antimicrobiens.

Peptides	Effet synergique obtenu en combinaison avec:	Espèce cible	Ref
Istracidine	Penicilline, streptomycine	<i>Staphylococcus aureus</i>	[163]
Kappacine	Zn ²⁺	<i>Streptococcus mutans</i>	[107]
α ₂ -Caseine f(183-207)	Lactoferrine	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	[165]
	Nisine	<i>S. epidermidis</i> , <i>L. monocytogenes</i>	[165]
LF f(1-11)	Fluconazole	<i>Candida</i> sp.	[166]
LF f(17-26)	Amphotericine B, itraconazole	<i>Candida albicans</i>	[167]
LF f(17-30)	Ampicilline	<i>S. aureus</i>	[168]
Hydrolysats de lactoferrine	EDTA, lysozyme	<i>Salmonella enteritidis</i>	[169]
	Erythromycine	<i>E. coli</i>	[170]
Lactoferrine B	Ciprofloxacine, ceftiazidime, gentamicine	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	[171]
	Ciprofloxacine, norfloxacine	<i>E. coli</i>	[172]
	Cecropine A, aureomycine	<i>E. coli</i>	[173]
	Aureomycine	<i>S. aureus</i>	[173]
	Minocycline, acide cholique, différents alcools, cysteine, différents acylglycerols, β-cyclodextrine	<i>S. aureus</i>	[174]
	Metronidazole	<i>Entamoeba histolytica</i>	[175]
	Clotrimazole, ketoconazole, itraconazole, fluconazole	<i>C. albicans</i>	[176]
	Fluconazole, itraconazole	<i>C. albicans</i>	[177]
	Hautes pressions	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> sp., <i>S. aureus</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>	[178]
	Nisine	<i>E. coli</i>	[165]
Lactoferrampine	Ampicilline	<i>S. aureus</i>	[168]

des effets synergiques entre l'ampicilline (50 ug/ml) et certains peptides de la LF bovine (LFampine et LF f(17-30)). Les combinaisons de cet antibiotique avec l'un de ces deux peptides (10 uM chacun) inhibe plus de 90% de la croissance d'une souche d'*E. coli* multi-résistante (EPEC E2348/69), alors que les trois composés n'ont aucun effet séparément. De même, la LFcine B semble être plus efficace en combinaison avec un des sept antibiotiques suivants : l'érythromycine, la ciprofloxacine, la ceftazidime, la gentamicine, la norfloxacine, l'auréomycine, et la minocycline [171-174]. De la même manière, la LFcine B présente des effets synergiques en combinaison avec certains composés anti-candida à base d'azoles tels que le fluconazole, le métronidazole, le clotrimazole, le kétoconazole ou l'itraconazole [176, 177]. Des résultats similaires ont été rapportés pour le fragment f(1-11) de la lactoferrine humaine qui a un effet synergique avec le fluconazole [166] et pour le fragment f(17-26) de lactoferrine bovine avec l'itraconazole [167]. L'amphotéricine B, un médicament antifongique à base de polyène, a révélé un effet synergique fort en combinaison avec le fragment f(17-26) de lactoferrine bovine contre *C. albicans* [167]. En outre, la combinaison de LFcine B et de métronidazole a montré un effet synergique sur le parasite *Entamoeba histolytica* [175]. D'autres composés, comme des acylglycérols, certains sucres, des alcools et des acides divers, y compris l'EDTA, ont montré des effets synergiques en combinaison avec la LFcine B [174].

De manière générale, peu d'études se sont intéressées à d'éventuels effets synergiques entre peptides ou protéines antimicrobiens d'origine laitière. Cependant, la LFcine B et le fragment f(183-207) de la sous unité α_2 de caséine possèdent tous les deux un effet synergique avec la LF contre *E. coli* et *S. epidermidis* [165]. De même, la combinaison entre le fragment f(183-207) de la sous unité α_2 de caséine et la nisine est synergique contre *S. epidermidis* et *Listeria monocytogenes*. En revanche, la combinaison entre la nisine et la LFcine B n'est pas synergique contre *E. coli*. Toutefois, un tel résultat est prévisible puisque la nisine n'est active que contre les bactéries Gram-positives. Bien que, le lysozyme ne soit pas actif contre *Salmonella enteritidis*, il possède un effet synergique en combinaison avec la LFcine B, qui est variable selon le milieu utilisé [169]. Plus récemment, Liu et ses collègues [173] font état d'une synergie entre la cécropine A et la LFcine B linéaire (c'est à dire sans ponts disulfures) contre *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Dans ces deux cas, seul le quart des concentrations minimales inhibitrices pour

chacun des peptides a été nécessaire pour obtenir une inhibition totale des deux souches. Les effets synergiques des AMPs laitiers en combinaison avec des traitements physiques (température, pression ou pH) restent sous-exploités, bien que des premiers résultats positifs aient été obtenus en combinant la LFcine B avec des hautes pressions contre plusieurs souches de bactéries [178].

Les synergies entre les antimicrobiens et/ou des traitements dépendent à la fois des espèces testées et des composés utilisés. Par exemple, la LFcine B agit en synergie avec l'érythromycine contre *E. coli* mais la même combinaison ne présente aucun effet synergique contre *S. aureus* [170]. Récemment, des résultats similaires ont été observés au niveau intra-espèce avec la ciprofloxacine et la norfloxacine en combinaison avec la LFcine. Ainsi des effets synergiques, partiellement synergiques ou non synergiques ont été obtenus selon la souche d'*E. coli* testée [172]. Au final, seuls quelques effets synergiques sont rapportés dans la littérature et ils sont encore largement sous-exploités. Les combinaisons entre les AMPs du lait et d'autres agents antimicrobiens ou traitements sont non négligeables car ils fournissent de nouvelles orientations pour la lutte contre les agents pathogènes. Par conséquent, ces lacunes devront être comblées avant d'envisager des applications cliniques ou agro-alimentaires.

1.2.4.2.3. Les modifications chimiques

Plusieurs sortes de modifications chimiques ont été réalisées et testées dans le but d'améliorer l'activité antimicrobienne des AMPs laitiers ; elles sont présentées dans le tableau I.3. Comme vu précédemment, l'activité biologique est influencée par diverses caractéristiques physico-chimiques telles que l'hydrophobicité, la longueur de la chaîne ou la charge globale. À titre d'exemple, l'énantiomère D de la LFcine B est plus résistante aux protéases que l'énantiomère L, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, ce qui la rend plus efficace [137, 179, 180]. De même, une acétylation ou une amidation des extrémités d'un peptide va stabiliser et renforcer sa résistance envers la digestion dû aux aminopeptidases [181]. En outre, une amidation en C-terminale augmente la charge nette et positive du peptide, ce qui améliore ses interactions électrostatiques avec la membrane bactérienne. En conséquence, un peptide avec une amidation en C-terminale peut afficher des valeurs de CMI deux fois plus faible que le même peptide sans amidation [181]. De même, l'acylation terminal

augmente la lipophilie d'un peptide ainsi que sa capacité à se lier aux LPS, ce qui augmente son activité et provoque une chute drastique des valeurs de CMI [159, 182]. Ainsi, Majerle et ses collègues ont observé une diminution très importante des valeurs de CMI, d'un facteur compris entre 25 à 130 fois, après la laurylation en C-terminale de la LFcine H, selon la souche testée [182].

Tableau I.3: Modifications chimiques, testées sur les AMPs laitiers et référencées dans la littérature, qui ont contribué à accroître l'activité antimicrobienne.

Modification chimique	Peptide modifié	Référence
	LF humaine f(21-31)	[137]
Énantiomère D	LF bovine f(17-31)	[179]
	bLF f(20-28)	[180]
Acylation C-terminale	hLF f(21-31)	[182]
Acylation N-terminale	hLF f(21-31) ^a	[159]
	bLF f(20-28)	[180]
Énantiomère D + acylation N-terminale	bLF f(20-28)	[180]
Amidation C-terminale	bLF f(17-27) ^a	[181]
	bLF f(20-25)	[183]
Par des a.a. aromatiques et artificiels	bLF f(17-31)	[184, 185]
	hLF f(18-32)	[101, 186]
Substitution Par des tryptophanes	bLF f(17-31)	[101, 186]
	gLF f(14-42)	[101, 186]
	pLF f(17-31)	[101, 186]
	hLF f(18-32)	[186]
Autre(s)	hLF f(20-31)	[187]
	hLF f(16-40)	[187]
	LFcine de souris	[188]
Addition d'acides aminés	hLF f(25-31)	[161]
Synthèse de chimère	bLF f(17-30) and bLF f(265-284)	[189]
	bLF f(17-30) and LFampine	[190]
Synthèse de multimère	hLF f(21-31)	[191]

^a Peptides déjà modifié par rapport à la séquence originale

Une autre façon de modifier les caractéristiques physico-chimiques d'un peptide est de changer sa structure primaire en substituant un ou plusieurs acides aminés. A titre d'exemple, la substitution du tryptophane par d'autres acides aminés aromatiques plus grands, non naturels et dérivés de l'alanine, a été testée pour améliorer l'activité

antimicrobienne de peptides [184, 192, 193]. Dans le cas du peptide FKRRWQWRMKKLG, dérivé de la LFcine B, que ce soit les simples substitutions de tryptophane (en position 6 ou 8) par Tbt (β -(2,5,7-tri-tert-butyl-indole-3-yl) alanine) ou Tpc (β -[2 - (2,2,5,7,8-pentaméthylchroman-6-sulfonyl)-indol-3-yl] alanine), ou que ce soit les doubles substitutions des deux tryptophanes avec Dip (β -diphénylalanine), Bip (β -(4,4'-biphényl)-alanine) ou Ath (β -(anthracen-9-yl) alanine), une diminution significative des valeurs de CMI est obtenue pour tous les peptides ainsi créés. D'autre part, Strøm *et al.* ont démontré que la corrélation entre la charge et le contenu en acides aminés aromatique et hydrophobe est responsable de l'activité de différents peptides dérivés des LFcines et ont modulé ces deux paramètres pour réussir à augmenter l'activité des peptides [181, 188, 194]. Les résultats les plus intéressants ont été obtenus avec des peptides contenant des doubles substitutions d'acides aminés par des tryptophanes, qui ont montré une activité jusqu'à 10 fois supérieure à celle du peptide d'origine [101]. Plus récemment, l'importance de l'équilibre entre la charge et l'hydrophobicité a été confirmée sur deux peptides dérivés de la LFcine H [187]. Dans ce cas, les auteurs ont montré que la substitution de la glycine et/ou l'asparagine, deux acides aminés neutres, par des acides aminés chargés et/ou hydrophobes augmente l'activité des peptides par un facteur d'au moins deux.

D'autres stratégies consistent en une chimérisation ou une multimérisation des AMPs. A titre d'exemple, Bolscher *et al.* [189] ont synthétisé un peptide chimère, composé des peptides f(17-30) (c'est-à-dire un peptide dérivé de la LFcine) et du fragment f(265-284) (LFampine) de la lactoferrine bovine, qui conserve une activité même dans des milieux avec une concentration élevée en sel (NaCl, 100 mM) qui inhibent normalement les deux séquences natives. Le peptide chimérique développé présente des CMI inférieures à celles des deux séquences natives contre des parasites, des levures et certaines bactéries résistantes aux antibiotiques [168, 195, 196]. Un travail similaire a été réalisé avec la séquence f(268-284) au lieu de f(265-284) et a montré des résultats comparables avec des valeurs de CI_{50} qui ont diminué d'un facteur trois contre *P. aeruginosa* comparativement aux deux séquences natives [190]. La multimérisation de copie d'un peptide actif peut également induire une augmentation significative de son activité. Dans une étude, Azuma *et al.* [191] ont utilisé le peptide FQWQRNMRKVR sous forme multimérique en reliant plusieurs fois cette séquence (2, 4, 8 ou 16 fois) et ont observé une diminution

impressionnante des valeurs de CMI. Par exemple lorsqu'ils ont multimérisé 16 fois la séquence, la CMI a diminuée de près de 1000 fois contre *P. aeruginosa* par rapport au peptide original. Dans une autre étude, en utilisant 2 séquences non actives obtenues à partir des LFcines B et H, Farnaud et ses collègues ont réussi à développer deux peptides chimériques avec une activité antimicrobienne contre plusieurs souches d'*E. coli* [161]. Néanmoins, les deux peptides synthétisés restent moins actifs que le peptide f(17-31) issu de la LFcine B. D'autres voies n'ont pas encore été suffisamment étudiées. Par exemple, le rôle indispensable de la phosphorylation et la glycosylation de l'activité de certains AMPs comme la kappacine [145] présente une nouvelle possibilité pour concevoir des AMPs plus actifs. Il semble que dans tous les cas, la création de nouveaux peptides (ou composés) atteint sa limite lorsque le coût de production du peptide (ou l'ajout de modifications chimiques) devient trop élevé par rapport à l'activité obtenue.

I.2.5. Les mécanismes de résistance

Aux prémices des études sur les AMP, il a été supposé que le fait que la membrane soit la cible privilégiée rendrait difficile l'apparition de phénomènes de résistance. En effet, un microorganisme aurait dû modifier sa membrane en jouant sur la composition et/ou l'organisation de ses lipides, ce qui demeure une solution très coûteuse en énergie pour la plupart des espèces microbiennes [64]. Toutefois, il était irréaliste de penser que les microorganismes étaient totalement incapables de se défendre contre les AMPs, ni de limiter leurs effets. D'autant plus depuis que leur rôle dans l'immunité innée est acquis, ce qui implique que les microorganismes soient en contact avec eux depuis très longtemps. Très tôt, dès 1992, Groisman *et al.* avaient déjà démontré l'implication de gènes dans la résistance de *Salmonella* Typhimurium envers plusieurs AMPs [197], ce qui pourrait indiquer une co-évolution entre les AMPs et les mécanismes de résistance comme cela a été proposé par Peschel *et al.* en 2006 [110].

L'émergence des nombreuses résistances aux antibiotiques aura au moins servi à rendre les scientifiques prudents vis-à-vis de l'utilisation de nouvelles molécules antimicrobiennes. Ainsi, Perron *et al.* ont démontré que l'utilisation systématique du pexiganan (voir le paragraphe sur les applications thérapeutiques) sur des souches d'*E. coli* et de *Pseudomonas fluorescens* conduisait à l'émergence de souches résistantes après seulement

600 à 700 générations *in vitro* [198]. De même, Zhang *et al.* ont démontré qu'après seulement 30 générations, *Pseudomonas aeruginosa* présente des concentrations minimales inhibitrices (CMI) beaucoup plus élevées qu'initialement, et ce, après exposition à long terme de concentrations sub-CMIs pour huit peptides [199]. Il paraît donc important d'en apprendre plus sur les mécanismes de résistance, afin d'évaluer le risque de voir apparaître des souches résistances, avant d'utiliser les AMPs à grande échelle.

Conventionnellement, les mécanismes passifs ou constitutifs se réfèrent aux propriétés inhérentes d'un microorganisme, qui lui confèrent une résistance et sont normalement exprimées même en l'absence du ou des AMPs. À l'inverse, les mécanismes de résistance inductible ou adaptative comprennent ceux déclenchés par la présence du peptide antimicrobien et ceci, en réponse au stress de la cellule cible [200].

1.2.5.1. Les phénomènes de résistance passive

1.2.5.1.1. La résistance inhérente à chaque microorganisme

Il ne s'agit pas à proprement parler de mécanismes de résistance mais plutôt de caractéristiques intrinsèques à chaque genre, espèce ou même souche de microorganismes qui vont lui conférer une certaine résistance aux AMPs. Par exemple, parmi tous les microorganismes, il serait très surprenant de ne pas en trouver possédant des membranes plasmiques faiblement chargées voir neutres, ce qui réduirait fortement leur affinité avec les peptides cationiques. Il a été démontré que la composition membranaire du genre *Staphylococcus* contient un type de phospholipide particulier qui réduit nettement la charge négative de la membrane. D'autres bactéries, notamment à Gram négatif, présentent également des modifications de la partie supérieure de leur membrane ce qui leur confère une résistance aux AMPs [200]. D'autres facteurs comme la présence de capsule bactérienne et la composition de la paroi vont contribuer à la résistance passive, en limitant l'accès à la membrane ou en capturant une partie des AMPs. Il faut cependant noter que si ces structures sont fortement chargées, elles risquent également de jouer un rôle dans l'attraction des peptides cationiques [109].

Toutefois, si des microorganismes possèdent ce genre de mécanismes de manière innée, d'autres vont les mettre en place uniquement lors de la présence d'AMPs. Il n'est donc pas

surprenant de les retrouver aussi dans les mécanismes acquis. Pour cette raison, les mécanismes seront plus développés dans les paragraphes suivants.

1.2.5.1.2. La résistance de niches

Il s'agit de mécanismes qui vont accroître la résistance des microorganismes selon des circonstances précises. Par exemple, les cultures bactériennes dont la phase de croissance est achevée, vont diminuer légèrement leur potentiel transmembranaire, ce qui diminue leur sensibilité à certains peptides, notamment ceux agissant sur des cellules ayant un métabolisme fort [200]. De même, des expérimentations, sur des mutants de *Candida albicans* possédant des déficiences respiratoires limitant la production d'énergie par rapport aux cellules non mutées, ont révélé qu'ils étaient beaucoup moins sensibles aux AMPs que la souche native [201]. Enfin, les capacités d'un microorganisme à coloniser un milieu défavorable aux AMPs, comme les tissus avec de fortes concentrations en cations mono- et divalents, sont autant de facteurs de résistance qui rentrent dans les mécanismes passifs [200].

1.2.5.2. La résistance acquise

1.2.5.2.1. La production de protéases

Le mécanisme qui vient spontanément à l'esprit, pour empêcher l'action de peptide, est la production de protéases pour détruire les AMPs avant qu'ils atteignent la membrane. C'est probablement pour cette raison que des travaux ont rapidement démontré la capacité de nombreuses bactéries à produire ces protéases [202-204]. Toutefois, il a tout aussi rapidement été démontré que de nombreux peptides sont résistants à l'action des protéases. En guise d'exemples, les peptides avec des structures rigides, stabilisées avec des ponts disulfures, sont très peu sensibles [110], les peptides riches en proline sont également résistants et il existe de nombreuses modifications post-transcriptionnelles qui vont bloquer ou prévenir l'action des protéases [205]. D'après ces constatations, les peptides à hélice α sont les seuls peptides contre lesquels ce type de mécanisme semble véritablement efficace. En théorie, les protéases libérées par les bactéries pourraient même être la cause de la génération de nouveaux AMPs à partir de peptides plus grands. Toutefois, cette possibilité n'a jamais été observée.

I.2.5.2.2. La production de matériel de capture ou de rejet

Certaines espèces bactériennes sécrètent ou expriment, au niveau de leur membrane plasmique, des protéines qui sont capables de se lier à certains AMPs avec une très haute affinité et bloquent ainsi leur accès à la membrane plasmique. Ce type de protéines est aussi rapporté pour permettre l'extrusion d'AMPs qui aurait atteint le cytoplasme ou simplement pour permettre aux peptides ou bactériocines produits d'être expulsés de la cellule [206]. Ce mécanisme est très efficace mais son gros désavantage est que l'affinité de la protéine de capture doit être suffisamment forte pour permettre la capture du peptide cible. Il a été établi que des peptides, qui diffèrent de quelques acides aminés seulement, peuvent ne pas être capturés et avoir une action sur le microorganisme cible. Une étude sur *Streptococcus pyogenes* a mis en évidence une liaison très forte entre les β -défensines humaines 2 et 3 et une protéine inhibitrice du complément excrétée par la bactérie, empêchant ainsi l'action de ces dernières, alors que cette même protéine n'a démontré aucune affinité pour la β -défensine 1 [207]. De nombreuses espèces produisent de grandes collections d'AMPs, parfois avec de subtiles modifications de séquence, résultant probablement de la duplication du gène et de mutation. Il suffit de noter que 300 défensines différentes ont été détectées dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* [208] pour se convaincre que cette stratégie ne peut pas être énergétiquement efficace.

Plus récemment, une étude a démontré que la présence d'une capsule polysaccharidique, uniquement mise en place en présence d'AMPs, conférait une résistance à *Klebsiella pneumoniae*. En effet, les souches sans capsule étaient nettement plus sensibles que les souches avec capsule. L'ajout d'un plasmide codant pour la capsule dans les premières, permettait de réduire fortement leur sensibilité [209]. Si la capsule est reconnue depuis longtemps comme un facteur de virulence chez les bactéries, c'était la première observation de leur utilité contre les AMPs. Il semblerait que seules les capsules de polysaccharides anioniques aient une efficacité contre les AMPs cationiques [210], ce qui indiquerait que les capsules interagissent avec les AMPs de manière électrostatique [211]. En revanche, aucune information n'est présente vis-à-vis des peptides anioniques. Depuis, un tel mécanisme a également été observé chez *Neisseria meningitidis* [212] et d'autres encore, incluant *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella bronchiseptica* et *Salmonella Typhimurium* [211].

I.2.5.2.3. Les modifications des membranes bactériennes

I.2.5.2.3.1. Les modifications de la charge

Tel qu'expliqué précédemment, les interactions entre les AMPs et les bactéries sont gouvernées par des forces majoritairement électrostatiques. La membrane bactérienne contient de nombreux composants anioniques qui attirent les peptides cationiques. Logiquement, tout changement, entraînant une diminution de la charge membranaire, pourrait être un avantage et réduirait l'affinité des AMPs pour la membrane plasmique. La figure I.14 illustre quelques exemples de modifications membranaires [213]. Chez les bactéries à Gram négatif, de nombreuses modifications au niveau de la membrane externe ont été rapportées, notamment au niveau des LPS, avec l'incorporation de L-4-aminoarabinose ou de palmitate chez différentes souches de *E. coli* [214-216], diminuant ainsi le caractère anionique de la membrane externe. Chez les bactéries à Gram positif, ce sont les acides téchoïques et les peptidoglycanes qui sont responsables de l'attraction des peptides. Des mécanismes ont été observés avec la D-alaninisation des acides téchoïques sur des souches de *Staphylococcus* et de *Streptococcus* qui rajoute une charge positive et équilibre un peu la charge nette de la membrane [217, 218]. De même la modification des phosphatidylglycérols avec de la D-lysine pour former des lysylphosphatidylglycérols contribue à réduire l'attraction des peptides en rajoutant des charges positives dans la membrane [218].

I.2.5.2.3.2. Les modifications de la fluidité

Des mécanismes de résistance ayant un autre rôle que celui de modifier la charge de la membrane externe ont également été observés avec la régulation d'au moins 26 protéines membranaires (probablement des protéases) [202] ainsi que l'acylation des lipides A [219] chez *Salmonella Typhimurium*. Dans les deux cas, cela a permis la réduction de la perméabilité ainsi que de la fluidité membranaire, ce qui renforce la structure et diminue la sensibilité.

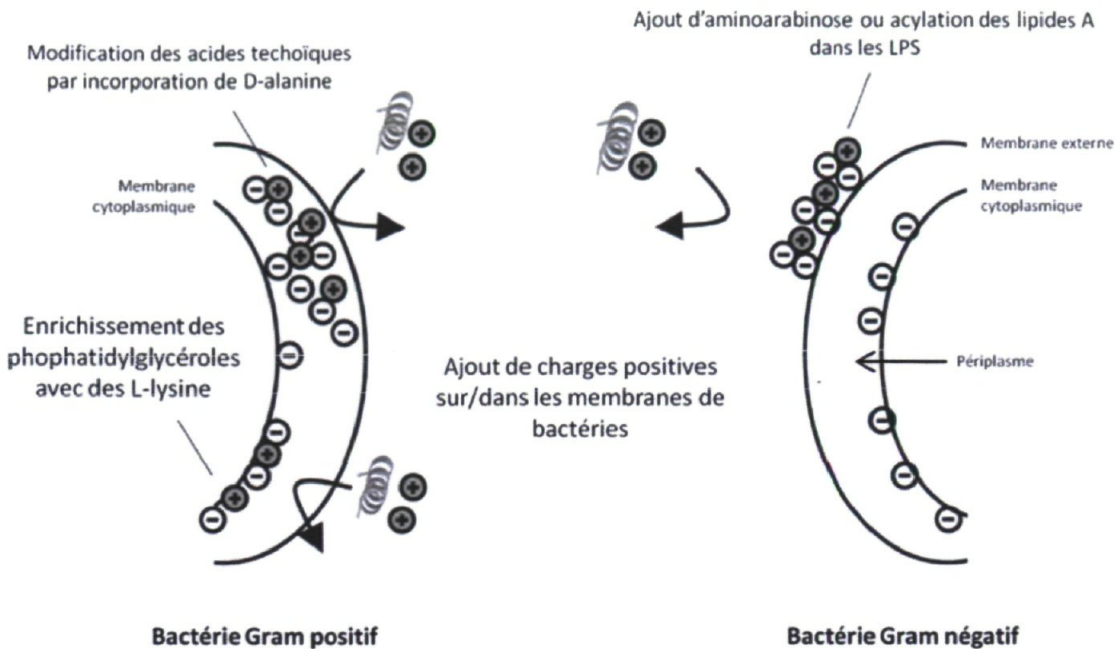


Figure I.14: Insertion de charges positives dans les membranes bactériennes. Traduite de Nizet [213].

I.2.6. Les applications et perspectives

I.2.6.1. Les applications pharmacologiques

Les avancées réalisées sur les AMPs ont renouvelé l'intérêt porté à ces molécules comme agents anti-infectieux et tout particulièrement sur leur mode d'action qui permet l'élimination des microorganismes de manières différentes des antibiotiques conventionnels.

Le tout premier peptide qui a été évalué dans l'optique d'une utilisation thérapeutique est le Pexiganan (Magainin Pharmaceuticals, Philadelphie, États-Unis) qui est un analogue de la magainine [220]. Bien qu'ayant démontré des résultats très prometteurs, comparables à des traitements oraux avec de l'ofloxacine, pour le traitement d'infections cutanées provoquées par le diabète sur des sujets humains [221], la FDA a refusé l'autorisation de mise en marché de crèmes enrichies en Pexiganan. Des études cliniques complémentaires ont depuis enrichi et confirmé les résultats [222]. Toutefois, aucune nouvelle information n'a été présentée depuis le rachat de Magainin Pharmaceuticals par MacroChem Corporation (Lexington, États-Unis). Malgré l'échec tout relatif du Pexiganan, d'autres peptides anti-

infectieux ont été développés et sont susceptibles d'être exploités cliniquement dans les années à venir [223]. Parmi eux, il convient de mettre en avant l'Isegran développé par Intrabiotics Pharmaceuticals (Mountain View, États-Unis) pour traiter les infections pulmonaires entraînées par la mucoviscidose ou la ventilation mécanique, les peptides MBI de Micrologix Biotech (Vancouver, Canada) pour traiter les infections causées par les cathéters et les peptides dérivés de l'histatine de Periondotix (Pittsburgh, États-Unis) pour lutter contre les gingivites et affections périodontales qui sont trois produits en cours de phase clinique 3 [223]. Toutefois de nombreux autres AMPs font actuellement l'objet d'études cliniques à des stades moins avancés. Seuls quelques AMPs provenant des protéines laitières ont pu atteindre le marché, alors que de nombreuses études ont confirmé leur potentiel *in vitro* et *in vivo* contre plusieurs infections. Par exemple, la combinaison de la kappacine et de Zn^{2+} a démontré une capacité à supprimer à long terme la croissance des bactéries responsables de caries, y compris lorsqu'elles se présentent sous la forme de biofilms *in vitro* [224]. Plus récemment, des essais réalisés sur des volontaires ont mis en évidence leur efficacité en tant que bain de bouche, ce qui a débouché sur la création d'un produit nommé KappaZinc™ pour traiter les infections buccales [225, 226].

Il est clair que la caractérisation de molécules naturelles ayant des propriétés anti-infectieuses représente toujours une stratégie de découverte prometteuse, mais il faut s'attendre à ce que leur utilisation prenne de l'ampleur dans les années à venir. Dans une récente phase préclinique réalisée sur des sujets humains, le fragment de lactoferrine humaine f(1-11) apparaît sain et parfaitement toléré pour des doses allant jusqu'à 5 mg par jour [227]. Actuellement, l'étude clinique est en cours de phase 2 sur des patients dits à risque, susceptibles de développer des infections suite à une transplantation [228]. D'autres applications comme leur utilisation dans le traitement d'infections bactériennes telle l'ostéomyélite sont étudiées et menées sur des modèles animaux [229, 230].

Toutefois, de nombreuses études s'arrêtent au niveau animal mais présentent des résultats qui pourraient éveiller l'intérêt des compagnies pharmaceutiques sur le long terme. Ainsi, l'effet anti-clostridium de plusieurs peptides issus de la LF a été confirmé chez des souris [231, 232] et la LFcine B et l'isracidine ont démontré leur potentiel dans la lutte contre la mammite chez différents modèles animaux [163, 233, 234].

Le développement des AMPs doit encore faire face à plusieurs défis dont le principal est technologique, et concerne la production à grande échelle à des coûts compatibles avec les exigences de l'industrie pharmaceutique.

I.2.6.2. Les applications agroalimentaires

Les AMPs peuvent intervenir aux différents stades de la conception du produit, c'est-à-dire avant ou après transformation. Avant transformation, à titre d'exemple, l'impact des AMPs sur l'agriculture mondiale est considérable avec la mise sur la marché de nombreux plants transgéniques, produisant certains AMPs de diverses origines et présentant ainsi des résistances à certaines bactéries et champignons phytopathogènes [235]. Cela va à la fois contribuer à réduire l'utilisation de pesticides et augmenter la production, mais également réduire l'incidence des pertes après récolte [236]. Les applications pré-transformation se limitent actuellement à l'agriculture mais les AMPs possèdent indéniablement le potentiel pour de futures utilisations dans d'autres secteurs de l'alimentation. Ainsi, plusieurs études les scrutent afin d'augmenter la qualité des troupeaux d'élevage, de même que celle des poissons dans les aquacultures et résoudre certains problèmes de santé animale qui entraînent de lourdes conséquences au niveau financier. Plusieurs succès ont été obtenus chez des souris [237, 238], mais ce sont évidemment les résultats sur les troupeaux laitiers qui focalisent le plus d'attention et plus particulièrement les résultats sur les mammites [239]. Dans ce cadre, les applications sont plutôt pharmaceutique qu'alimentaire [236].

Lors de la transformation du produit, l'utilisation des AMPs comme conservateur alimentaire est perçue comme une alternative prometteuse et présente certains avantages comme la réduction des conservateurs chimiques ou le développement de nouveaux produits alimentaires (moins de sels, moins d'acides, etc...) qui satisfont à la fois les demandes des consommateurs et des industriels. Du fait de leur origine, ce sont principalement les peptides issus d'aliments qui restent les plus étudiés. Ainsi, les peptides issus de protéines (du lait ou autres) et de la même manière les bactériocines de bactéries lactiques cristallisent beaucoup d'espoir [236]. Pour le moment, seule la nisine A, produite par *Lactococcus lactis*, a reçu l'approbation de l'agence américaine Food and Drug Administration (FDA) pour une utilisation alimentaire. Le plus souvent, elle est utilisée dans les produits laitiers (surtout des fromages) et les légumes en boîtes [240], mais

d'autres applications possibles sont en cours d'étude comme dans les jus de tomate [241] ou dans les viandes [242]. Dans les pays européens, elle est également utilisée dans les aliments pour bébés, les produits de boulangerie, les mayonnaises et les laits frappés (« milk-shakes ») [240]. Elle est autorisée dans plus de 50 pays du monde mais le Canada ne fait pas partie de cette liste. La formule commerciale la plus utilisée est le NisaplinTM qui contient 2,5 % de principe actif même si d'autres compagnies produisent des produits à base de nisine [243]. Bien entendu, bon nombre d'autres bactériocines comme la pediocine, la lacticine ou encore la sakacine sont étudiées en vue d'applications éventuelles [244, 245]. Concernant les AMPS d'eucaryotes, quelques études ont examiné le potentiel des AMPs issus des protéines laitières, notamment la lactoferricine B, et ont révélé un effet antimicrobien limité dans diverses matrices alimentaires parmi lesquelles le lait [246], le jus de carottes [247], le vin [248-250] et la viande [251, 252]. Contrairement à ce que les résultats *in vitro* ne laissent présager, il semble que la lactoferrine donne de meilleurs résultats que ses peptides dérivés dans différentes matrices alimentaires [253, 254], ce qui détourne l'attention des scientifiques vers cette dernière. De rares études ont testé le potentiel des AMPs provenant d'autres origines. Par exemple des peptides de batraciens, dérivés de la dermaseptine S4 [255] et la magainine 2 [256], ont été testés dans des matrices alimentaires et ont démontré des effets antimicrobiens tout à fait satisfaisants avec des réductions supérieures de trois logarithmes par rapport au témoin. D'autres possibilités sont progressivement en émergence comme leur utilisation après transformation, lors du conditionnement, avec leur ajout dans l'emballage des produits. La nisine fait l'objet d'une étude démontrant la possibilité d'utiliser une telle approche pour contrôler la flore microbienne du lait ou de jus d'orange [257]. Les résultats sont prometteurs mais nécessitent encore un certain nombre de mises au point et la confirmation avec d'autres molécules antimicrobiennes. Le potentiel des AMPs provenant d'organismes eucaryotes, comme conservateur alimentaire, semble donc toujours intact mais semble véritablement sous-exploité par rapport aux immenses possibilités envisageables [258].

CHAPITRE II. Problématique, hypothèses et objectifs de recherche

II.1. Problématique

De plus en plus d'études s'intéressent à l'identification de nouvelles molécules antimicrobiennes pour des applications alimentaire, médicale ou vétérinaire. Parmi les alternatives envisagées, les AMPs représentent une des solutions des plus prometteuses. Des AMPs ont été identifiés dans différentes sources, et parmi celles-ci les protéines laitières se sont révélées être particulièrement intéressantes et ont déjà conduit à l'identification de plusieurs AMPs [259, 260]. D'autre part, la disponibilité en grande quantité et à bas prix de nombreux coproduits issus de l'industrie laitière, ouvre de plus en plus la porte pour de futures applications industrielles. À notre connaissance, peu d'études se sont intéressées à cette thématique de recherche. Des travaux exploratoires, réalisés au sein de notre équipe, ont établi que les isolats de protéines du lactosérum constituaient de bonnes sources de peptides microbiens. De même, puisque les peptides proviennent des protéines laitières, il y a de fortes probabilités que certains peptides puissent être identifiés directement à partir de produits finis. Leur présence pourrait les impliquer dans l'évolution des caractéristiques rhéologiques et microbiologiques des produits alimentaires et pourrait aboutir à la mise en marché de produits enrichis en peptides antimicrobiens. Dans le cadre de cette thèse de doctorat, il est proposé d'aborder cette thématique de recherche en essayant de répondre aux trois questions de recherche suivantes :

- 1) Quels sont les AMPs d'origine laitière déjà identifiés et quelles sont leur caractéristiques principales?
- 2) Est-il possible de produire des AMPs à partir d'un matériel disponible en grand volume, tels que des concentrés ou des isolats de protéines de lactosérum ?
- 3) Des AMPs sont-ils naturellement produits dans des produits laitiers fermentés suite à une protéolyse microbienne, et peuvent-ils avoir une influence sur les flores microbiennes d'altération et pathogène ?

II.2. Hypothèse de recherche

L'état actuel des connaissances nous a permis d'émettre l'hypothèse suivante : une meilleure connaissance des caractéristiques physicochimique et biologique des AMPs dérivés des protéines laitières devrait faciliter l'extraction et l'identification de nouveaux peptides antimicrobiens, directement à partir de produits industriels.

II.3. Objectifs de recherche

L'objectif général de ce travail de doctorat vise à utiliser des approches différentes mais complémentaires en bioinformatique, en physicochimie et en microbiologie pour l'identification, la caractérisation et l'étude des AMPs à partir des protéines laitières. Les objectifs spécifiques sont les suivants:

Objectif 1 : Rassembler dans une nouvelle base de données, les informations taxonomiques, microbiologiques et physico-chimiques relatives aux AMPs d'origine laitière;

Objectif 2 : Extraire, purifier et caractériser des AMPs à partir d'un mélange de protéines sériques, ayant une activité inhibitrice contre des pathogènes d'origine alimentaire.

Objectif 3 : Identifier, évaluer l'activité antimicrobienne et comparer la prévalence des AMPs dans différents fromages : Mozzarella, Gouda, Suisse, Cheddar moyen et Cheddar fort vieilli.

CHAPITRE III. Peptides antimicrobiens dérivés des protéines laitières : mise en place d'une base de données

Transition contextuelle

Comme le démontre largement la littérature scientifique, de nombreux peptides antimicrobiens ont été identifiés et étudiés. Les protéines laitières sont de bonnes pourvoyeuses en peptides bioactifs en général et antimicrobiens en particulier. Cependant, à la connaissance des auteurs, aucun recensement de ces peptides n'a jamais été effectué de manière complète. Ainsi, cette étude avait pour but de : 1) référencer tous les peptides antimicrobiens provenant de protéines laitières; 2) de monter une base de données accessibles à tous contenant toutes les informations susceptibles d'avoir un intérêt pour chaque utilisateur et 3) de résumer toutes les informations obtenues sous la forme d'une revue.

Ce chapitre a fait l'objet d'un article intitulé : «**MilkAMP: a comprehensive database of antimicrobial peptides of dairy origin** » soumis pour publication dans « International Dairy Journal ».

Résumé

Le nombre de peptides bioactifs recensés et caractérisés, dérivés de protéines du lait, augmente continuellement. Bien qu'un grand nombre d'entre eux soient maintenant assez bien connus, une grande partie de l'information est encore manquante ou non accessible pour les utilisateurs potentiels. La centralisation de ces informations dans une seule source comme une base de données devrait faciliter l'étude de ces peptides comme alternative naturelle aux conservateurs alimentaires ou encore, pour aider à contrecarrer la résistance de certaines bactéries pathogènes aux antibiotiques. Pour atteindre cet objectif, nous avons établi MilkAMP, une nouvelle base de données qui contient des informations précieuses, y compris des données microbiologiques et physico-chimiques, sur l'ensemble des peptides antimicrobiens d'origine laitière. Actuellement, MilkAMP contient 371 entrées dont 9 hydrolysats, 299 peptides antimicrobiens, 23 peptides dont l'activité antimicrobienne est soupçonnée mais reste à être démontrée et 40 peptides qui ont été testés mais qui sont non actifs. Cette base de données est librement accessible à l'adresse suivante <http://milkampdb.org/> et devrait être utile pour le développement de peptides actifs biologiquement dans les secteurs pharmaceutiques et alimentaires.

Mots clés: MilkAMP; peptides laitiers; peptides antimicrobiens; mammifères; hydrolysats laitiers

Abstract

The number of identified and characterized bioactive peptides derived from milk proteins is increasing. Although many antimicrobial peptides of dairy origin are now well known, important structural and functional information is still missing or unavailable to potential users. The compilation of such information in one centralized resource such as a database would facilitate the study of the potential of these peptides as natural alternatives for food preservation or to help thwart antibiotic resistance in pathogenic bacteria. To achieve this goal, we established MilkAMP, a new database that contains valuable information on antimicrobial peptides of dairy origin, including microbiological and physicochemical data. The current release of MilkAMP contains 371 entries, including 9 hydrolysates, 299 antimicrobial peptides, 23 peptides predicted as antimicrobial and 40 non-active peptides. Freely available at <http://milkampdb.org/>, this database should be useful to help develop uses of biologically active peptides in both the pharmaceutical and food sectors.

Keywords: MilkAMP database; dairy peptides; antimicrobial peptides; mammals; milk hydrolysates

III.1. Introduction

In addition to providing nitrogen in the form of amino acids, dairy proteins contain encrypted within their primary structures an array of bioactive peptides, which may be released upon hydrolysis. The number of such peptides identified in caseins and whey proteins continues to grow [261]. Some of these have been shown to possess opioid, immunomodulatory, antimicrobial, antithrombotic, growth-stimulating or antihypertensive properties, as previously reviewed [262, 263]. Jones and Simms in 1930 reported the first dairy-protein-derived antibacterial factor (lactenin), which slowed the growth of streptococci [39]. Antimicrobial peptides (AMPs) derived from casein were first reported by Hill et al,[264] who isolated the antibacterial glycopeptides known as casecidins. Isracidin (α_{s1} -casein f[1-23]), a positively charged AMP, was shown to have a broad spectrum of activity against Gram-positive bacteria and to prevent mastitis in sheep and cows [163, 264]. A minor fraction of whey, lactoferrin contains within its primary sequence several bioactive peptides that are released upon enzymatic hydrolysis [27, 151, 265] and which appear in some cases to possess much more potent antimicrobial activity than does the parent protein [266].

One of the principal motivators of AMP research has been the observation that resistance to their broad-spectrum activity develops more slowly than in the case of conventional antibiotics [64]. The majority of AMPs display physicochemical similarities that appear to be essential for activity, including small molecular size (10 to 50 amino acids), cationic character and amphipathic character. Most AMPs interact specifically with the bacterial membrane and kill the cell by causing leakage of its contents. Although membrane interaction might be essential, alternative mechanisms are increasingly considered as components of AMP action against microbes [267]. To date, physicochemical features such as net charge, amphipathicity, hydrophobicity, polar angles and so on have been shown to influence interaction with and insertion into membrane bilayers. Although several AMPs of dairy origin are well characterized, much information (e.g. amino acid sequence and antimicrobial spectra) is still missing, scattered in the scientific literature or otherwise unavailable to potential users. This deficiency could be improved by a central resource such

as a database that could be analyzed to generate new useful information. The concentration of such information would facilitate the study of the potential of these peptides as natural alternatives for food preservation or to counteract increasing antibiotic resistance among bacterial pathogens. MilkAMP contains valuable information on AMPs of dairy origin, including microbiological and physicochemical data. Information is very easy to extract from this database and allows rapid prediction of structure/function relationships and target organisms and hence should lead to better use of the biological activities of peptides in both the pharmaceutical and food sectors.

III.2. Materials and methods

III.2.1. Data sets

An exhaustive literature search was carried out to extract the relevant articles from databases such as PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) and Google Scholar (www.scholar.google.com). The keywords used were milk peptide(s), antimicrobial peptide(s), and common milk protein names, aliases and abbreviations (e.g. lactoferrin, LFCIN, etc.). All peer-reviewed papers thus found were screened for relevant content, such as minimal inhibitory concentration (MIC) and sequence annotations. A physicochemical dataset was designed containing peptide mass, length, isoelectric point, net charge, number of basic, acidic, hydrophobic or polar amino acid residues, hydropathy index, Boman index, aliphatic index, instability index, absent and most prevalent amino acids, extinction coefficient, absorbance at 280 nm and tertiary structure (when available).

III.2.2. Implementation

The MilkAMP database was implemented on the Linux platform with MySQL (v5.1.62) and Apache (v2.2.2.1), while the Web interface was implemented with PHP (v5.2.17). Sequences were retrieved in SciDBMaker[268], compiled and the resulting tables exported to the MySQL server. MilkAMP includes numerous tools for sequence analysis, such as homology search (BLAST v2.2.15 [269], FASTA v35.04 [270] and Smith–Waterman v35.04 [270]), multiple sequence alignment (ClustalW v2.10 [271], MUSCLE v3.6 [272]), Hidden Markov Models (HMMER v2.3.2 [273]), and physicochemical profile analyzer.

Generated multiple sequence alignments are displayed graphically using the embedded JalView applet [274].

III.3. Results & discussion

III.3.1. General description of the graphical user interface

Information is easy to extract from the database using various tabs such as “Advanced search”, “Explore data”, “References” and “Statistics” (see Figure III.1). The “Explore data” interface allows querying of a peptide based on various parameters, including accession number, name, producer organism, native protein of origin, activity, and method of production. The physicochemical characteristics (length, mass, sequence, pI, net charge, etc.) of each peptide are also listed and it is possible to retrieve and view them the same way as for the general information. Each record has specific characteristics and is unique. Multiple inputs may thus correspond to a given name. For example, lactoferricin H has five different records in this database. Two different sequences (LFH0005 and LFH0006) derived from recombinant bovine lactoferrin expressed in insect cells are proposed. A third entry corresponds to the human lactoferricin H sequence originally and most commonly cited in the literature (LFH0008). Another provides an alternative conformation proposed in subsequent works (LFH0009), while the remaining entry combines works lacking data on peptide origin (LFH0007).

Data can be extracted in various formats including Excel, Word, XML, CSV, FASTA, or printer-friendly. More detailed data, particularly on the inhibition of sensitive organisms, lists of non-sensitive organisms and experimental MIC can be obtained by clicking on the accession number of the entry or on its behalf. Any peptide can be found using the search bar by name or accession number. The ability to search for entries using a single keyword for general parameters (producer, native protein, method of production and antimicrobial activity) is also included in this search bar. The remaining displayed data allow quick searches of all related data simply by clicking on them. For example, clicking on "cow" in the column of producer organisms will automatically display all bovine entries. More detailed searches are requested using the "advanced search" tab, which offers additional

o Physicochemical data (sequence, mass, charge, Boman index...)
 o Literature
 o Producer organism, native protein, production method
 o Activity, target organism

MilkAMP database
 A database dedicated to milk antimicrobial products

Welcome

Home Advanced search Explore data References Statistics Tools

View: [Reset view](#) [View Physico-chemical data](#)
 Export: [Excel](#) [Word](#) [XML](#) [CSV](#) [Fasta](#) [Printer Friendly](#) Search

Filter by

Accession	Name	Producer Organism	Native Protein	Production Method	Activity
CAA0002	Isracidin	Cow	os1-casein	Acetic acid treatment and Purification	Antibacterial
LAP0001	Lactophorin	Cow	PP3 = lactophorin	Synthetic	Antibacterial

o Similarity search (BLAST, FASTA)
 o Multiple sequence alignment
 o Hidden Markov Models
 o Physicochemical profile

o Producer organisms
 o Target organisms
 o Physicochemical data
 o Bibliography

o Authors, journal, year
 o Related entries
 o Export citation, DOI

o Length, mass, structure, sequence, pl, various index...

Figure III.115: Database contents and tools

possibilities by cross-checking data with a variety of both general and physicochemical settings as well as the opportunity to search for a peptide sequence appearing in different entries or to search the literature of reference (using author name, journal title, etc.). The "reference" tab provides tracing of all sources cited in the database and highlights the entries extracted from each cited source. Data accessibility will make possible to produce a variety of works by combining different tools such as BLAST, and to compare sequences by alignment with sequences imported by the user. The "Statistics" tab provides data on AMP producer organisms referenced previously and on target organisms, and compiles all species that have shown sensitivity to at least one related peptide or hydrolysate. These statistics therefore do not include resistant strains. Physicochemical statistics provide data on average peptide length (entire database or by producer organism), net charge and isoelectric point (pI). Statistics on amino acid presence and percentage are also provided, as well as acidic and basic amino acid content. Year of publication, related newspaper articles and number of peptides discussed are provided among the statistics on references. All statistics are updated automatically as new sequences are added.

III.3.2. Data summary

III.3.2.1. Animal of origin

The database currently includes peptides derived from 10 animal species (Table III.1). Although more than half of the peptides are of bovine origin, virtually all mammals are potential providers of AMP sequences. In the coming years, AMPs could be isolated from new origins such as domesticated mammals of which the milk is already part of the human diet (camel, horse, yak, donkey, etc.). Although only large animals provide enough milk for industrial-scale AMP production, peptides associated with smaller species could provide useful information for understanding and optimizing AMP action, as well as the possibility of activities for specific applications justifying production using recombinant technology.

Table III.1: Origin of the antimicrobial peptides entered in the MilkAMP database.

Producer Organism	Current number of peptides
Buffalo	2
Camel	1
Cow	244
Goat	16
Human	105
Mouse	21
Pig	5
Rabbit	4
Rat	1
Sheep	6
Total	405

III.3.2.2. Protein of origin

Since caseins are the major proteins of milk in general (82% of cow milk protein and 40% of human milk protein), many AMPs correspond to casein amino acid sequences. These have been identified in the four casein subunits (α -s1, α -s2, β , and κ) of various animals (cow, rabbit, human and sheep). Their presence in caseins of animals such as goat or buffalo is presumed but has not yet been confirmed.

The composition of whey proteins varies widely across species. The most studied are lactoferrin, β -lactoglobulin and α -lactalbumin, with mixed results. Several AMPs with broad-spectrum activity have been found in lactoferrin, while peptides derived from β -lactoglobulin and α -lactalbumin appear to be active only against Gram-positive bacteria. Lactoferrin of all origins accounts for 291 entries and is the most studied protein because of the presence of the two antimicrobial clusters named lactoferricin and lactoferrampin (see Figure III.2). Bovine lactoferrin alone accounts for 165 records in the database, of which 97 are modified sequences by chemical means. Most of these peptides were synthesized for the purpose of studying the structure/function relationship of lactoferricin, the best-known antimicrobial peptide of dairy origin. Other proteins considered as minor components of milk (proteose peptone, lysozyme, etc.) also show potential as sources of antimicrobial

peptides, but their low concentrations limit interest in them. Dairy substances such as whey acidic proteins are beginning to attract interest, since they have characteristics suggesting potential antimicrobial activity. All referenced proteins are presented in Table 2. Finally, albumin has not been studied as an AMP source, and to the best of our knowledge, no albumin sequence with antimicrobial activity has been reported.

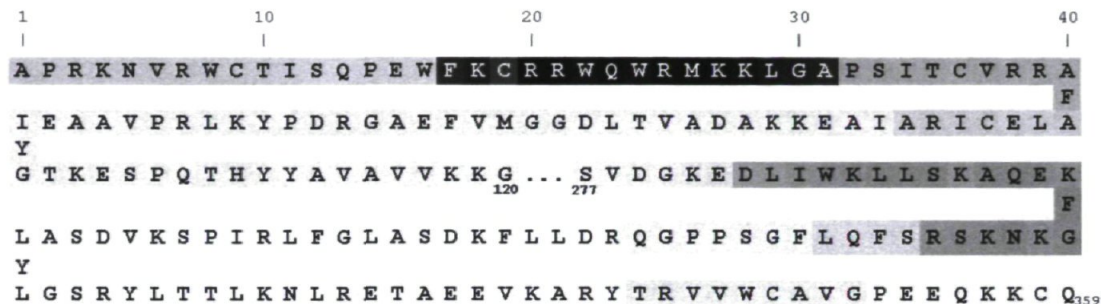


Figure III.2: Amino acid sequence of lactoferrin. The shades of grey represent the occurrence of the amino acid in the milkAMP database. White is for absence and black is used for the most cited amino acids in the database.

Table III.2: Milk proteins providing antimicrobial peptides listed in the MilkAMP database.

	Milk Protein	Current number of peptides
Caseins	Casein hydrolysate	2
	α 1-casein	12
	α 2-casein	22
	β -casein	11
	κ -casein	20
Whey	α -lactalbumin	8
	β -lactoglobulin	6
	PP3 (lactophorin)	4
	Lactoferrin (LF)	308
	Recombinant lactoferrin (rLF)	10
	Whey Acidic Protein	1
	Whey protein hydrolysate	1
	Total	405

III.3.2.3. Peptide production

The identification of bioactive peptides encrypted within the amino acid sequence of a protein usually begins with acid or enzymatic hydrolysis followed by purification by liquid chromatography to separate and purify peptides and identify interesting sequences. These peptides are thus regarded as natural in the sense that they are likely to be found in food or to appear during digestion. In some cases, the use of two different enzymes may lead to the same peptide. This is the case of lactoferricin, which can be obtained using pepsin (LFB0084) or chymosin (LFB0087). However, more than half (291) of the peptides listed in the database were obtained by synthesis. In many cases (122), this was in order to obtain larger amounts and determine the activity spectrum. Many (169) have been modified, usually in order to determine the importance of a specific amino acid in the sequence or to attempt to make the peptide more active. In rare cases, peptides were obtained in other ways, such as treatment with acetic acid or heat.

III.3.3. Antimicrobial activity

The current release of MilkAMP contains 371 records. Of the 272 supported by references, 56 concern antifungal activity and two concern anti-parasitic activity. Thirty concern antifungal activity only. Inclusion of antiviral peptides has also begun. The database also contains seven hydrolysates of interest due to the use of unusual dairy proteins or enzymes. Four of these exhibit antifungal activity. There are also 23 potentially antimicrobial but untested peptides, obtained primarily from studies predicting the antimicrobial activity of peptides derived from proteins. Finally, 39 peptides and one hydrolysate have not been found to inhibit any microbial species, but were added to the database as supplementary information (see Figure III.3).

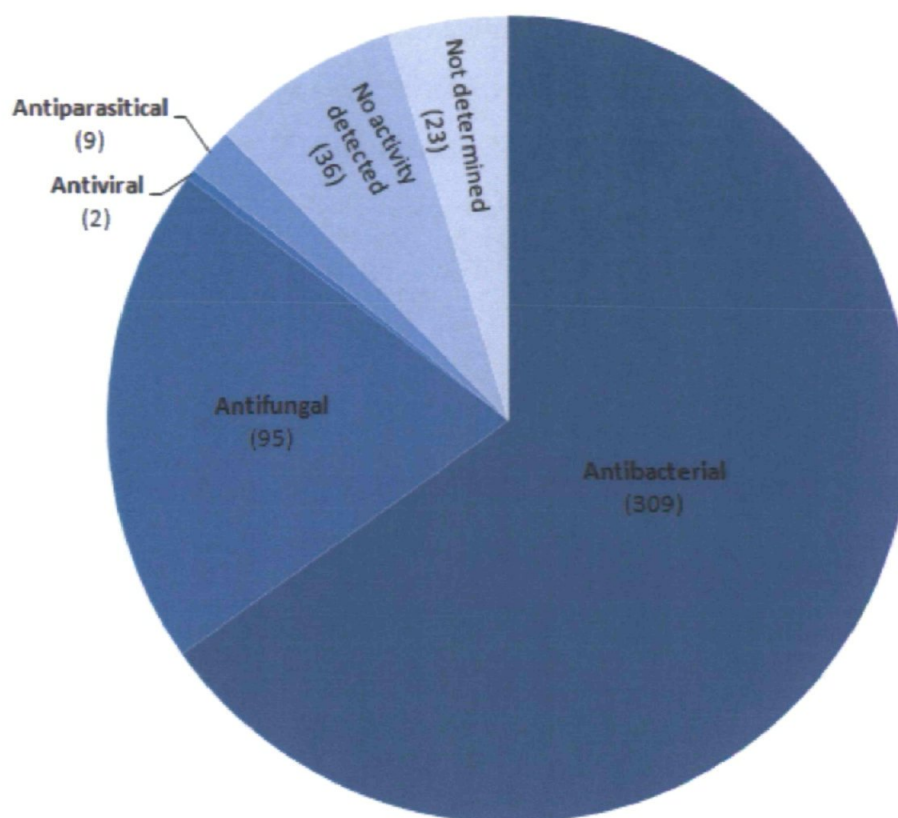


Figure III.3: Distribution of five principal biological activities among the peptides listed in the MilkAMP database (405 AMPs).

Bovine lactoferrin is the most cited dairy protein in the database, probably because lactoferricin is the most studied AMP derived from milk protein. The complete sequence of lactoferricin corresponds to lactoferrin fragment 17-41 (FKCRRWQWRM KKLGAPSITCVRRAF; LFB0084) and sequences from within this fragment are also antimicrobial. Fragment 20-30 (RRWQWRMKKLG; LFB0109) was the first of these to be studied and was produced in several mutant forms in order to characterize the structure-function relationships of lactoferricin [275], the authors examining the role of the α -helical structure in lactoferricin activity. Their results showed inhibition similar to lactoferricin for two tested strains and reduced hemolytic activity. Both N-terminal arginine residues appear to play a role as modulators of inhibitory activity. Subsequent study of fragment 17-31 (FKCRRWQWRMKKLGA; LFB0031) revealed the importance of hydrophobic amino acids, particularly the two tryptophan residues, but also methionine to a lesser degree [194]. Fragments 20-28 (RRWQWRMKK; LFB0028) and 17-27 (RRWQWKMKKLG;

LFB0020) have also been studied and modified in various forms. Using fragment 20-28, it was determined that N-terminal acylation could increase peptide antimicrobial activity as well as simplify synthesis [180]. Study of fragment 17-27 suggested the importance of balance between aromatic and cationic amino acids [188]. The database contains a total of 84 peptides (natural, synthetic and modified) comprising or derived from at least one of these four sequences, while other studies suggest that as many as 111 such sequences are of interest for the complete lactoferricin.

The second reason why lactoferrin is so studied is lactoferrampin, originally identified as fragment 268-284 (WKLLSKAQEKFGKNKSR; LFB0149) [260]. However, several other AMPs longer than the original sequence were later identified. Researchers now refer to an antimicrobial domain corresponding roughly to fragment 259-296 [276]. Its spectrum of action differs from that of lactoferricin, but the sequence has not yet been tested against filamentous fungi, parasites or viruses. The various peptides derived just from the bovine version of this sequence account for 36 entries. In summary, lactoferricin and lactoferrampin account for 147 of the total of 165 entries for bovine lactoferrin. Hydrolysates, chimeras and non-active or untested peptides aside, there remain seven antimicrobial sequences derived from bovine lactoferrin, tested against only 10 different microbial strains.

The bovine form of the caseins is the most studied. Of the 47 casein peptides that have demonstrated antimicrobial activity (two antifungal), 38 are bovine. The α and β subunits have provided peptides that show potential, but the number of microbial strains tested so far is insufficient to conclude pharmacological or food interest, except for fragment 183-207 (CAA0020), which looks promising with its low MIC. The κ subunit has not provided any peptides with low MIC, although many peptides with some antimicrobial activity have been identified in its sequence. Kappacin (CAK0013) might be of interest, but much information is still missing. On the β subunit, casecidins 15 (CAB0007) and 17 (CAB0008) appear inhibitory at low concentrations against a few microbial strains. In this case again, several AMPs of limited interest could become more interesting in light of additional information.

In humans, lactoferricin corresponds to lactoferrin fragment 1-47 but consists of two subunits, namely fragments 1-11 and 12-47 (LFH0009), connected by a disulfide bridge. If this seems quite different from bovine lactoferricin, it is mainly because human lactoferricin does not correspond to the homologous bovine sequence but rather to the peptide obtained under the same experimental conditions. Meanwhile, the sequence corresponding to bovine lactoferrampin has not yielded any peptide with sufficient activity to arouse interest, and studies are therefore few [151]. In summary, peptides derived in the course of studying human lactoferricin and lactoferrampin make up all entries for human lactoferrin, except for kaliocin-I (LFH0060), which is currently specific to human lactoferrin and much less potent than lactoferricin (human or bovine).

Studies of other animal species have been carried out almost exclusively on lactoferrin and specifically on the homologous region corresponding to lactoferricin. Other proteins including caseins have been examined and inhibitory peptides have been found, but none with interesting potency [277, 278].

The database also lists all of the microbial strains (sensitive and insensitive) with which the various sequences and hydrolysates have been tested. A general idea of the genetic diversity of organisms sensitive to at least one peptide in the database is thus provided. Sensitivity to peptides in the database has been observed among 23 genera of fungi including 8 yeasts, 23 genera of Gram-negative bacteria, 15 genera of Gram-positive bacteria and one genus of parasite. The ten most tested target organisms in the MilkAMP database are regrouped in table II.3.

Among the bacteria, two species in particular have been used as reference strains and are tested almost systematically. These are *Escherichia coli* (representing Gram-negative) and *Staphylococcus aureus* (representing Gram-positive). Other Gram-negative genera frequently tested include *Pseudomonas*, *Salmonella*, and to a lesser degree *Klebsiella* and *Serratia*. Frequently tested Gram-positive genera include *Bacillus*, *Listeria*, *Streptococcus*, and to a lesser extent *Enterococcus*, *Micrococcus* and *Lactobacillus*. The overwhelming

majority of the microbial organisms mentioned in the database are pathogenic or food spoilage bacteria. In view of the striking rarity of AMP testing on strains such as *Lactococcus lactis* or *Streptococcus thermophilus*, the possibility of interference with dairy product quality or processes should be studied.

Among the filamentous fungi, *Penicillium* and *Trichophyton* have been found sensitive to several peptides (4 and 11, respectively) and are the most frequently tested. In addition, the genus *Trichophyton*, of which some species are known to infect the skin, has been tested in two studies of susceptibility to lactoferricin B and derivatives. Filamentous fungi are not tested systematically, and information on antifungal activity is limited [136, 142, 144]. The number of entries mentioning an effect on at least one filamentous fungus (dermatophyte or mold) is 14 (12 bovine-derived and two human-derived including one hydrolysate) and includes one hydrolysate. The most often tested yeast is *Candida*, which includes human pathogens. Other yeasts occasionally tested include *Cryptococcus*, *Dekkera* and *Saccharomyces*. The database contains 91 entries that include data on yeasts.

Table III.3: The ten most tested target organisms in the MilkAMP database.

Genus	Number of entries	Strain	Number of entries
<i>Escherichia</i>	320	<i>E. coli</i>	320
<i>Staphylococcus</i>	259	<i>S. aureus</i>	233
		<i>S. epidermidis</i>	29
		<i>S. carnosus</i>	23
<i>Candida</i>	114	<i>C. albicans</i>	110
<i>Listeria</i>	50	<i>L. innocua</i>	33
		<i>L. monocytogenes</i>	24
<i>Streptococcus</i>	42	<i>S. mutans</i>	18
<i>Pseudomonas</i>	54	<i>P. aeruginosa</i>	45
<i>Bacillus</i>	73	<i>B. subtilis</i>	49
<i>Salmonella</i>	43	<i>S. Typhimurium</i>	27
<i>Enterococcus</i>	34	<i>E. faecalis</i>	32
<i>Klebsiella</i>	48	<i>K. pneumoniae</i>	45

Antimicrobial peptides from milk proteins are eclipsed by the success of lactoferricin, which accounts for the majority of studies, while other less studied peptides might have strong potential for pharmacological use.

III.3.4. Other relevant databases

Several antimicrobial peptide databases have been created over the past several years. Some of these list peptides from various sources (APD [279], CAMP [280], DAMPD [281], YADAMP [282], etc.) while others are dedicated to a specific category of peptide (Defensins knowledgebase [283], Peptaibol Database [284], etc.) or phylogenetic origin (PhytAMP [285], BACTIBASE [286], PenBase [287], etc.), as previously reviewed [288].

General databases provide an overview of the world of AMPs but have limitations, particularly for detailed searches. For example, APD and CAMP propose respectively 1 and 4 AMPs derived from lactoferrin. APD contains other lactoferrin-derived peptides, but from poorly specified origins, making it difficult to extract information. Lactoferricin B is noted as originating from "*Bos taurus*" while the peptide derived from its N-terminal portion (LFB0018) is listed as "cow". In addition, synthetic peptides mentioned in the same reference are nowhere to be found in APD [289], which constitutes a significant loss of information (provided as LFB0019, LFB0118, LFB0120 in MilkAMP). The deficiencies of the APD database could be alleviated at least partly by consistent use of unique and specific terminology.

BIOPEP is a database dedicated to bioactive peptides and is the most effective tool for studying AMPs of dairy origin, with 463 referenced antimicrobial peptides [290]. However, most of these peptides are not specific to milk and are found elsewhere in the body. In addition, some are not supported by sufficient documentation, creating in the case of lactoferrampin the erroneous perception of a single peptide rather than a cluster, because of the absence of references and hence other peptides derived from this sequence. Finally, synthetic peptides and information relating to studies thereof, as well as references providing other useful information on the subject, are absent.

The MilkAMP database lists natural and artificial (synthetic or modified) antimicrobial peptides derived from amino acid sequences of dairy proteins of different origins and provides the most complete information possible on peptide structure/function

relationships, inhibitory activity, spectrum of action and MIC determined for each tested microbial strain. It provides a nearly exhaustive list of references relating to each peptide. The information contained in this database will complement general databases by providing missing data.

III.4. Conclusion

The MilkAMP database is freely accessible for query at (<http://milkampdb.org>). It currently contains 371 entries, including nine hydrolysates, 299 antimicrobial peptides, 23 peptides predicted as antimicrobial, as well as 40 non-active peptides, and is expected to grow quickly with the rapid development of genomic and proteomic projects. As more information about dairy antimicrobial peptides becomes available, the database will be expanded and improved. Researchers in this field are invited to use the database, to make suggestions and to submit their peptides.

MilkAMP allows all AMP sequence data and other information to be accessed via a user-friendly, web-based interface. Queries may be based on a variety of criteria to retrieve specific structural, physicochemical or microbiological data. We expect this to allow better and more comprehensive structural and functional analysis and ultimately better understanding of milk AMPs. This will certainly be useful in food preservation or food safety applications, but also has implications for the development of new drugs for medical use.

Acknowledgements

This work is supported by the Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT). JT was receipt of a Ph.D. fellowship from FQRNT.

Atteinte des objectifs et avancement des connaissances

Les objectifs qui étaient de développer une nouvelle base de données, contenant des informations taxonomiques, microbiologiques et physico-chimiques, pour mieux cerner les peptides antimicrobiens générés à partir des protéines laitières ont été atteints. La variété des peptides antimicrobiens identifiés est telle qu'elle ne permet pas réellement de mettre en avant des caractéristiques précises qui permettraient de confirmer ou d'infirmer le potentiel antimicrobien d'un peptide sans études plus poussées. Toutefois, la base de données met en lumière le fait que les études restent majoritairement fondamentales. Bien que la prudence soit parfaitement compréhensible pour ce qui est des applications pharmacologiques, plusieurs études ont démontré la nécessité de réaliser des tests *in vivo* pour établir les effets réels. Ce constat reste valable pour les applications alimentaires où la matrice semble réellement avoir un rôle déterminant. D'autre part, MilkAMP a permis d'isoler certaines lacunes concernant les origines des peptides. Premièrement, très peu de peptide ont été isolés à partir de mélange de protéines alors que, d'un point de vue industriel, cette option paraît la plus rentable. Et deuxièmement, aucun peptide antimicrobien n'a jamais été formellement isolé à partir de produits laitiers alors que c'est évidemment dans ce type de produit que leur présence devrait être recherché et détecté en premier lieu.

Ces résultats ont contribué à l'avancement des connaissances scientifiques en permettant la mise en place d'un outil qui devrait faciliter l'étude des peptides antimicrobiens. Cette base de données devra être mise à jour continuellement pour la compilation de futurs résultats. Il serait envisageable d'élargir la base de données à l'ensemble des peptides bioactifs d'origine laitière.

CHAPITRE IV. Purification et identification de peptides antimicrobiens obtenus par hydrolyse peptique d'un mélange de protéines du lactosérum

Transition contextuelle

Dans le chapitre précédant, les peptides antimicrobiens provenant des protéines du lait ont été indexés dans une base de données de la manière la plus exhaustive possible. Il en ressort qu'aucune étude ne s'est intéressée à l'isolement de peptides antimicrobiens à partir d'hydrolysats d'isolats de protéines du lactosérum, alors que cette source de protéines coûte beaucoup moins cher que des protéines pures. Voici pourquoi, cette étude avait pour but de démontrer que 1) l'hydrolyse enzymatique d'un isolat de protéines du lactosérum par la pepsine, la trypsine ou la chymotrypsine induit la libération de fractions antibactériennes et 2) d'identifier et caractériser les peptides responsables de cette activité.

Ce chapitre a fait l'objet d'un article intitulé : « **Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate** » publié dans « Journal of Functional Foods ».

Résumé

Les peptides antimicrobiens obtenus à partir de l'hydrolyse des différentes protéines laitières possèdent un bon potentiel pour des applications dans les industries pharmaceutiques et alimentaires. Le but de cette étude est de démontrer le potentiel antimicrobien des hydrolysats d'isolats de protéines du lactosérum obtenus par l'action d'enzymes gastro-intestinales et d'identifier et caractériser les peptides responsables de l'activité. Alors que les hydrolysats obtenus avec la trypsine ou la chymotrypsine n'ont pas révélé d'activité antimicrobienne, les hydrolysats obtenus entre les 45^{ième} et 90^{ième} minutes avec la pepsine démontrent une activité significative. Le fractionnement de l'échantillon prélevé à la 60^{ième} minute de l'hydrolyse par chromatographie liquide haute performance en phase inverse a permis d'obtenir 5 fractions qui ont présenté une activité antibactérienne à des concentrations inférieures à 30 µg/ml. Ces fractions contiennent de petits peptides, jamais référencés dans la littérature comme étant antibactériens. Le fragment 14-18 (KVAGT) de la β -lactoglobuline est néanmoins très proche d'une séquence précédemment identifiée et est également retrouvée dans des séquences antimicrobiennes de diverses origines. Cinq autres peptides dérivés de la β -lactoglobuline et un dérivé de l' α -lactalbumine (le fragment 117-121, KVGIN) ont aussi été identifiés comme antibactériens. Ces peptides ne correspondent pas exactement aux peptides qui auraient dû être obtenus suite à l'hydrolyse des protéines avec de la pepsine, ce qui indique une protéolyse supplémentaire dont l'origine reste inconnue. Au final, les coproduits de l'industrie laitière ont démontré leur potentiel comme pourvoyeur de peptides antimicrobiens.

Mots clés : peptide antimicrobiens; isolat de protéines sériques, hydrolysat, pepsine

Abstract

The antimicrobial potential of whey protein isolate hydrolyzed by gastrointestinal enzymes was determined by attempting to identify and characterize the antimicrobial peptides responsible. While tryptic and chymotryptic hydrolysates did not show antibacterial activity, whey proteins hydrolyzed for 45–90 min by pepsin exhibited significant activity. Fractionation of 60-min hydrolysate by reversed-phase high performance liquid chromatography yielded 5 fractions that were antibacterial, with minimum inhibitory concentrations comprised between 20 and 35 $\mu\text{g/mL}$. These fractions contained short peptides not previously identified as antimicrobial. Fragment 14–18 (KVAGT) of β -lactoglobulin is very close to a sequence previously identified as antibacterial and is found in antimicrobial sequences of diverse origin. Five other peptides derived from β -lactoglobulin, and one fragment from α -lactalbumin (f117–121, KVGIN), were also identified as antibacterial. The identified peptides do not match pepsin action exactly, indicating modified proteolysis of unknown origin. Protein by-products of the dairy industry offer potential for large-scale production of antimicrobial peptides.

Keywords: antimicrobial peptides; whey protein isolate; hydrolysis; pepsin

Abbreviations:

ACE, Angiotensin I Converting Enzyme; APEI, Atmospheric Pressure Electrospray Ionisation; DH, Degree of Hydrolysis; ESI, Electrospray Ionization; HPLC, High Performance Liquid Chromatography; LC/MSD, Liquid Chromatograph/Mass Selective Detector; LF, Lactoferrin; LFampin, Lactoferrampin; LFcin, Lactoferricin B; MS, Mass Spectroscopy; UF, Ultrafiltration; WPI, Whey Protein Isolate; α -la, α -lactalbumin; β -lg, β -lactoglobulin

IV.1. Introduction

Milk proteins are the principal source of bioactive peptides encrypted within primary amino acid sequences and released upon enzymatic hydrolysis during gastrointestinal transit or food processing [261, 291]. A growing number of such peptides is being identified in dairy protein hydrolysates and fermented dairy products. Some of these peptides have been shown to possess opioid, immunomodulatory, antimicrobial, antithrombotic, growth-stimulating or antihypertensive properties, as previously reviewed [262, 263]. Despite the notable successes of lactoferricin (LFcin) and kappacin, very few studies have addressed the antimicrobial properties of peptides released from dairy proteins by enzymatic hydrolysis. In response to evolving consumer values, the food industry is now showing an increasing interest in milk-derived peptides as alternatives to conventional antimicrobial preservatives. The possibility of adding them to foods as bioactive supplements is also under investigation.

During the 1930s, Jones and Simmons conducted pioneering research that led to the discovery of the lactoperoxidase system, which was destined to provide the basis for numerous works on the antimicrobial properties of milk [292]. While native proteins such as casein, β -lactoglobulin (β -lg), α -lactalbumin (α -la) and serum albumin (SA) are apparently inactive [293], a few milk proteins, primarily lactoferrin (LF) and lysozyme, appear to have antimicrobial properties. Meanwhile, numerous reports have confirmed the release of antimicrobial peptides by hydrolysis of the caseins of several animal species [277, 294, 295]. Beside caseins, few works demonstrated the presence of antimicrobial peptides within sequences of whey proteins with the exception of LF. Bellamy *et al.* were the first to describe the antimicrobial peptide LFcin, released from the N-terminal domain of bovine LF hydrolyzed by pepsin *in vitro* [296] and found later *in vivo* [297]. LFcin displays a broad spectrum of activity against bacteria, fungi, viruses and parasites [142, 259, 298, 299] and is now being used in the food processing industry and cosmetics [300]. The antimicrobial activity of another domain of LF, named lactoferrampin (LFampin), has also been described, but its spectrum differs little from that of LFcin [260]. The list of LF-derived antimicrobial peptides is growing and is expected to continue to do so [301]. In comparison, other whey proteins have so far provided relatively few antimicrobial peptides.

Notable works performed by Pellegrini *et al.* described negatively charged domains isolated from α -la and β -lg using trypsin and/or chymotrypsin and active against Gram-positive bacteria [302, 303]. Finally, some whey-derived peptides that have no demonstrable antimicrobial activity *in vitro* stimulate certain immune system functions *in vivo* and appear thus to increase resistance to gastrointestinal pathogens [304, 305].

The potential of bovine β -lg and α -la to yield antimicrobial peptides appears under-exploited. Whey protein isolates (WPI) are widely used as dietary supplements and functional ingredients in food products and are composed mainly of these two proteins. They are inexpensive and thus appear suitable as starting material for the production of natural bioactive agents. The objective of the present study was to identify and characterize potentially antimicrobial peptides derived from whey proteins by hydrolysis using digestive enzymes and to describe the kinetics of their release.

IV.2. Materials and methods

IV.2.1. Materials and microorganisms

A commercial WPI from dairy cows (Bipro) was obtained from Davisco Foods International (Le Sueur, MN, USA). Its protein portion consisted primarily of β -lg (74.0 %, w/w), α -la (12.5 %, w/w), bovine serum albumin (BSA) (5.5 %, w/w) and immunoglobulin (5.5 %, w/w). The powder contained 93.4 % (w/w) protein and 0.12 % (w/w) calcium. HPLC-grade acetonitrile, analytical grade trifluoroacetic acid (TFA), porcine pepsin A (570 units/mg), trypsin (16700 units/mg) and chymotrypsin (≥ 40 units/mg) were all purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Microbial growth inhibition assays were performed using *Listeria ivanovii* HPB28, and *Escherichia coli* MC4100. Both bacteria strains were grown aerobically in Tryptic Soy Broth with 0.6 % yeast extract (w/v) (TSB; Difco Laboratories, Sparks, MD). *L. ivanovii* was incubated at 30 °C and *E. coli* was incubated at 37 °C.

IV.2.2. Hydrolyses of whey proteins

The method described in a previous paper was used [306]. A solution of WPI 4 % (w/v) was prepared and held at 37 °C for 15 min before use. The pH was then adjusted to 2.0 prior to adding pepsin or to 6.5 for trypsin and chymotrypsin. Enzymes were added at a

final enzyme/substrate ratio of 1:250 (w/w) and hydrolysis was conducted at 37 °C with stirring. Samples were taken at the start and then every 15 min for a total of 2.5 hours. Hydrolysis was stopped by heating at 85 °C for 10 min. The samples were then filtered on Whatman No. 41 paper (Whatman International, Ltd., Maidstone, UK) using a Buchner funnel. Samples were then stored at -20 °C for subsequent analysis. For each sample, degree of hydrolysis (DH) was determined using the *o*-phthaldialdehyde method described previously [307].

IV.2.3. Purification of peptides

The samples of hydrolyzed WPI were filtered on Centricon membrane (10 kDa molecular mass cut-off; Millipore, Billerica, MA, USA), followed by adjustment to pH 7.0 using 0.5 M NaOH. Protein concentrations were determined in triplicate using the Dumas method using a Leco FP-528 device (Leco Corp., St. Joseph, MI, USA). All samples were stored at -20°C until testing. Peptides were separated using a Gold HPLC system (Beckman-Coulter, Brea, CA, USA) with an analytical reversed-phase C18 column (150 × 4.6 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA). Linear gradients were conducted from 2% to 60% solvent B (0.1% TFA in acetonitrile) over solvent A (0.1% TFA in water) in 60 minutes with a flow rate of 1 mL/min. Elution was monitored by UV absorbance at 214 nm. Concentrations of protein in the fractions were estimated by the bicinchoninic acid (μ BCA) method (BCA, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA).

IV.2.4. Identification of peptides by ESI mass spectrometry

The mass spectra of the compounds were recorded with an electrospray ionization mass spectrometer (Agilent series 1100, Agilent Technologies, Inc., Loveland, Colorado, USA) connected to the reversed-phase chromatography unit. The ESI spectrometer was operated in positive ion mode. Conditions were spray voltage of 4.5 kV; sheath gas (nitrogen) flow rate of 1.05 L/min; capillary voltage of 14.0 V; heated capillary temperature of 190 °C; tube lens offset voltage of 35.0 V; octapole 1 offset of -3.0 V; octapole 2 offset of -5.0 V; lens voltage of -16.0 V; octapole RF amplitude of 400.0 V; trap DC offset of -10.0 V. The fractions were dissolved in a 4:2 (v/v) blend of acetonitrile and 50 % formic acid and were injected into the electrospray source using a syringe pump at a flow rate of 5 μ L/min.

Within the ion trap, dry nitrogen was used as the nebulizing gas at 12 psi, 4 L/min and 325 °C.

Each fraction was analyzed in MS/MS full scan acquisition mode to determine major peptides with m/z range scanned from 150 to 3,000. Since many sequences corresponded to a specific m/z ratio, a second run discriminated each ratio of interest by filtering m/z in MS² mode to study ion fragmentation and determine the amino acid sequences of the peptides. Full scan spectra of the fragments (daughter ions) with m/z scanned from 150 to peptide m/z ratio were obtained. The composition of Bipro being known, the sequences of the peptides present in the fractions were obtained by comparing the experimental m/z with theoretical m/z of sequences obtained using an ion fragment calculator (<http://db.systemsbiology.net:8080/proteomicsToolkit/FragIonServlet.html>). The proteins selected as peptide origin were β -lg, α -la, bovine SA, LF, glycomacropeptide and pepsin. Lactoperoxidase and lysozyme were not considered because of their low concentration.

IV.2.5. Determination of antibacterial activity

Antibacterial activity was first evaluated using an agar well diffusion method and then assayed using a microtest polystyrene micro-plate method (96-well Microtest, Becton Dickinson Labware, Sparks, MD, USA) described previously [308]. Briefly, micro-plates were loaded with twofold serial dilutions of peptide samples in tryptic soy broth and seeded with approximately 1×10^4 cfu per well using log-phase culture diluted in tryptic soy broth to $0.5\text{--}1.0 \times 10^6$ cfu/mL. The *L. ivanovii* or *E. coli* suspension brought the final volume in each well to 175 μ L. The micro-plates were then incubated at 30 °C (*L. ivanovii*) or 37 °C (*E. coli*) for 24 h and absorbance at 595 nm was measured every 20 minutes using an Infinite[®] F200 PRO photometer (Tecan US inc., Durham, NC, USA). Microbial counts were determined in each well after 24 h.

IV.2.6. Statistical analysis

Data were subjected to ANOVA using the GLM procedure of SAS (SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina, USA). The means were compared two by two using Student's t test. $P < 0.05$ was the threshold of statistical significance.

IV.3. Results

IV.3.1. Protein hydrolysis and extraction of peptide fractions

The aim of this portion of the study was to extract peptides released from WPI hydrolyzed by pepsin, trypsin and chymotrypsin. The DH obtained with each protease during the 2.5 hours of treatment is shown in Figure IV.1. The highest DH was obtained with trypsin and chymotrypsin, averaging respectively 11 % and 12%, while pepsin produced an average DH of only 3.7 % (reached at 1.5 h). The hydrolysates were heated and then separated into aggregating and non-aggregating peptides by filtering. As shown in Figure IV.2, the total soluble protein concentration was fairly constant for samples treated with pepsin. In contrast, WPI hydrolysed with trypsin and especially with chymotrypsin gradually became more soluble. The maximum concentration of dissolved matter was reached after 75 minutes for trypsin and 135 minutes for chymotrypsin. Ultrafiltration further decreased the protein concentration, indicating that a portion of the soluble peptides had masses above 10 kDa. The concentrations in these filtrates were 22.23 mg/mL, 22.31 mg/mL and 16.08 mg/mL after 15 minutes of respectively peptic, tryptic and chymotryptic hydrolysis. These concentrations increased progressively over time and reached plateaus after 105, 75 and 120 minutes at 33.03 mg/mL, 28.75 mg/mL and 38.75 mg/mL for pepsin, trypsin and chymotrypsin respectively.

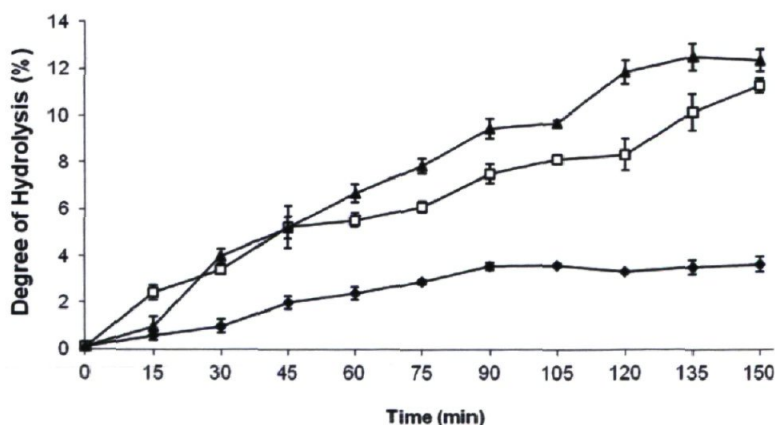


Figure IV.1: Degree of hydrolysis obtained during digestion of Bipro WPI with pepsin (diamond), trypsin (square) and chymotrypsin (triangle).

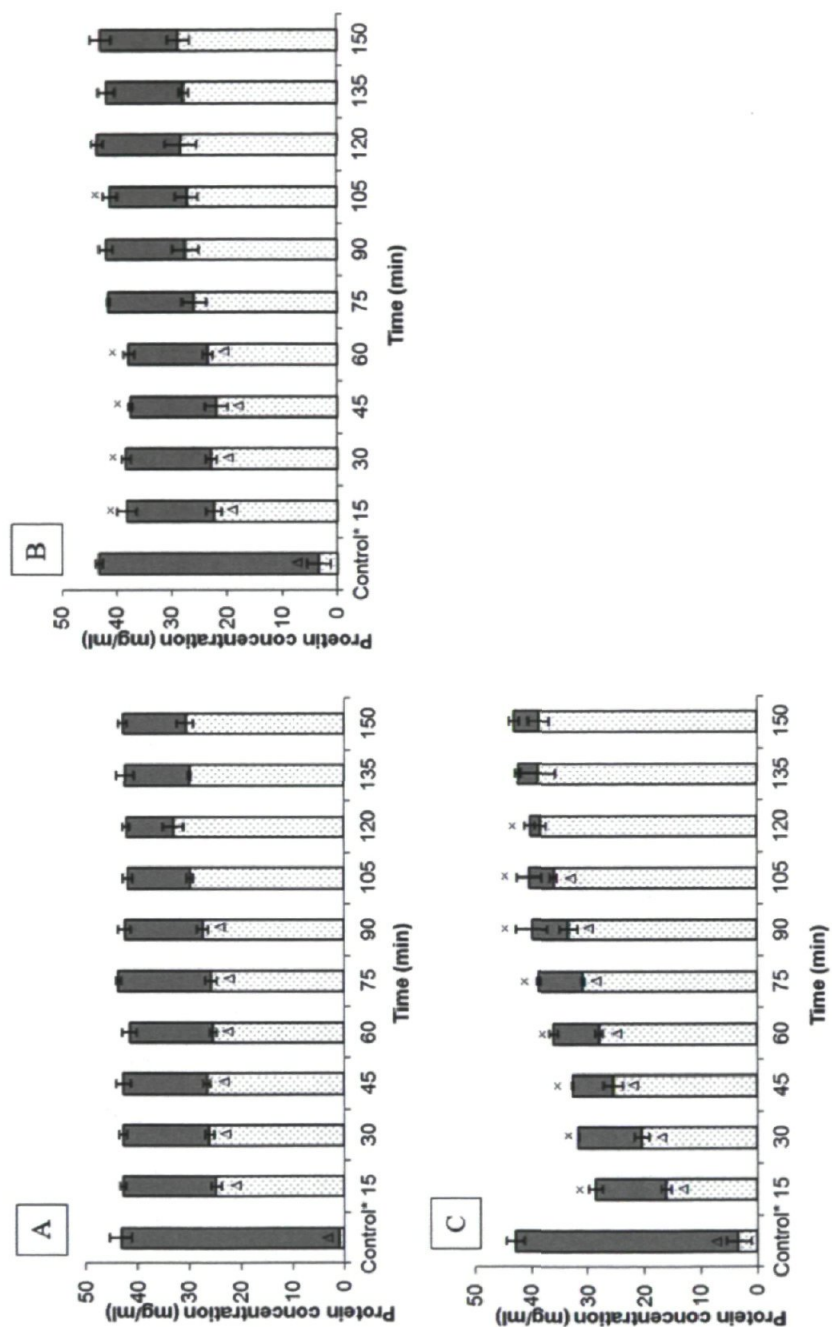


Figure IV.2: Protein concentration measured after heating and filtration (▨) and after ultrafiltration on 10 kDa cut-off membrane (□) for Bipro WPI hydrolyzed by (A) pepsin, (B) trypsin and (C) chymotrypsin. *Control before ultrafiltration corresponds to 150 minutes of hydrolysis without heating; control after ultrafiltration corresponds to non-denatured WPI. “x” indicates differing significantly ($P < 0.05$) from the control; Δ indicates differing significantly ($P < 0.05$) from the value obtained after 150 minutes of hydrolysis.

IV.3.2. Antimicrobial activity of the peptide fractions

The inhibitory activities of the three ultra-filtered hydrolysates were evaluated using food-borne pathogens in agar diffusion tests (results not shown) and micro-dilution assays. At 75 mg/ml, peptic hydrolysate produced a zone of inhibition of *L. ivanovii*. No activity was observed at lower concentrations. Tryptic and chymotryptic hydrolysates did not produce a zone of inhibition. These results were confirmed using the microplate assay, only peptic hydrolysate being active against both tested pathogens. No tryptic or chymotryptic hydrolysate showed any significant activity against either organism (results not shown). Both the crude WPI and the > 10 kDa fractions were inactive against these bacteria (results not shown). The counts of both organisms in the presence of 37.5 mg/ml of ultrafiltered peptic digest collected between 45 and 90 min of hydrolysis are shown in Table IV.1. *L. ivanovii* decreased by 2.33–2.44 log units, while *E. coli* was not affected. Fractions collected before or after this time range did not show any significant activity against either organism.

IV.3.3. Purification and identification of antibacterial peptides

The material of mass < 10 kDa recovered after 1 h of peptic digestion was further separated using reversed-phase HPLC. The chromatogram is shown in Figure IV.3. Each fraction was assayed for inhibition of the two bacterial strains using the micro-plate method. Fractions 1 (13–13.9 min), 5 (18.4–19.8 min), 6 (19.8–21 min), 9 (22.6–23.4 min) and 12 (25.0–25.8 min) were thus found inhibitory. Their concentrations were estimated at below 40 µg/mL by the µBCA method. Fractions 1, 9 and 12 presented the strongest inhibitor against *L. ivanovii* with complete inhibition of bacterial growth (Figure IV.4). Minimal inhibition concentrations were determined at 35, 20 and 25 µg/mL, respectively. However, fractions 1 and 12 were weak inhibitors of *E. coli*. Fractions 5 and 6 were less active, slowing growth and decreasing the duration of the exponential phase in the case of *L. ivanovii*, although fraction 5 showed strong activity against *E. coli*. Fraction 6 had similar activity against both bacteria. Fractions 5 and 9 showed total activity against *E. coli* with equal minimal inhibition concentration determined at 20 µg/mL. The fractions were then analyzed using LC MS/MS. Their detailed compositions are summarized in Table IV.2.

Tableau IV.1: Antibacterial activity of ultrafiltered peptic hydrolysates as time function.

Bacterial species	Antibacterial activity, expressed as log reduction ¹									
	0 ²	15	30	45	60	75	90	105 ³		
<i>L. ivanovii</i> HPB28	0.32 ± 0.05	0.11 ± 0.34	0.25 ± 0.34	2.34 ± 0.05*	2.36 ± 0.03*	2.33 ± 0.06*	2.44 ± 0.18*	0.15 ± 0.23		
<i>E. coli</i> MC4100	0.04 ± 0.03	0.06 ± 0.05	0.16 ± 0.10	0.42 ± 0.09	0.36 ± 0.08	0.13 ± 0.02	0.08 ± 0.10	0.02 ± 0.02		

For each individual peptide, * indicated a significant difference ($p < 0.05$) between the mean values tested at 37.5 mg/ml.

¹ Calculated as $\log N_0/N_1$, where N_0 and N_1 are the number of colonies in respectively the absence and presence of hydrolysate.

² Test with Bipro before hydrolysis.

³ No difference was observed between the presence and absence of hydrolysate obtained at 120 minutes.

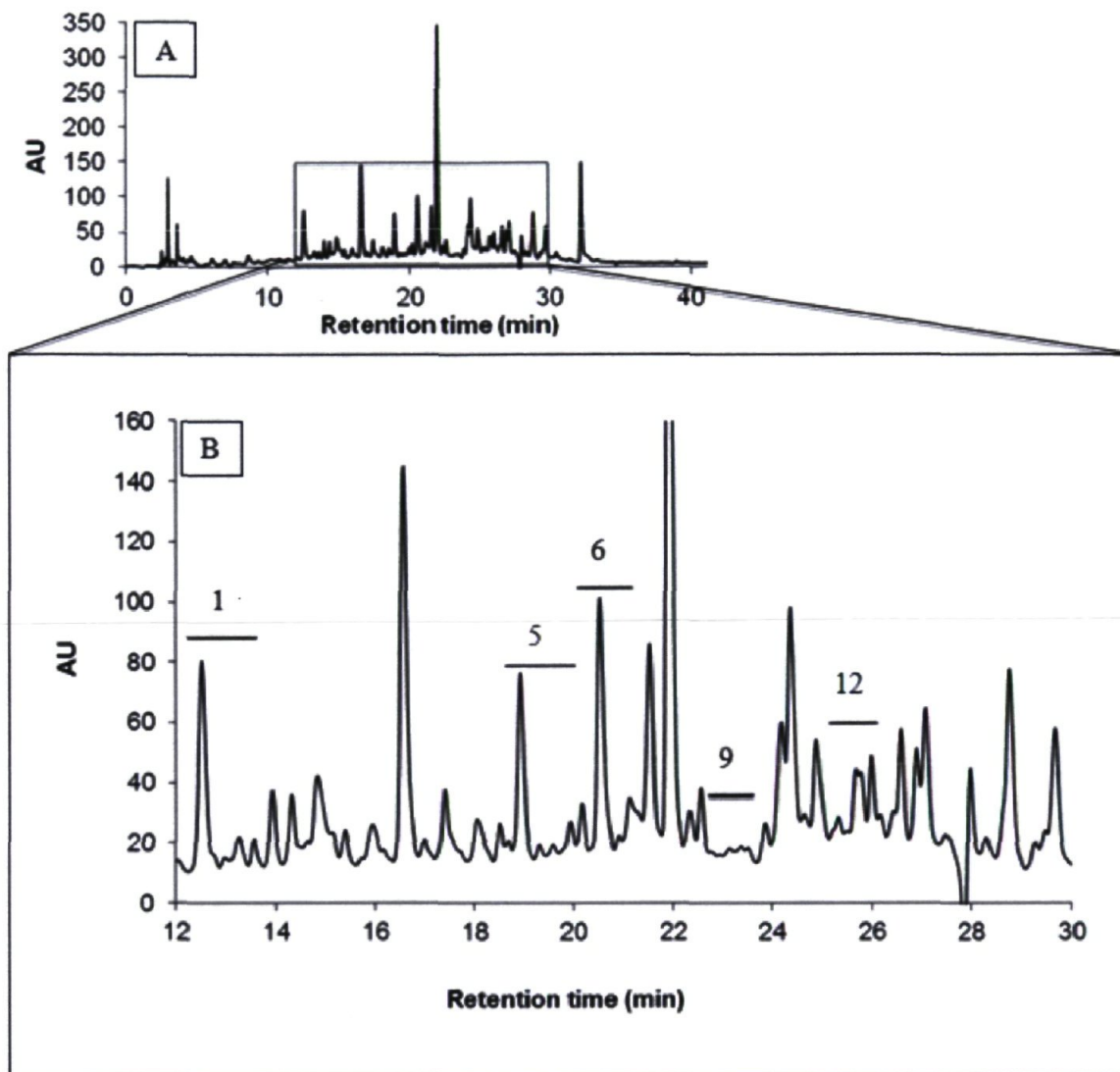


Figure IV.3: Reversed-phase HPLC profile of Bipro WPI hydrolyzed for 60 minutes by pepsin (A) and identification of antimicrobial fractions (B).

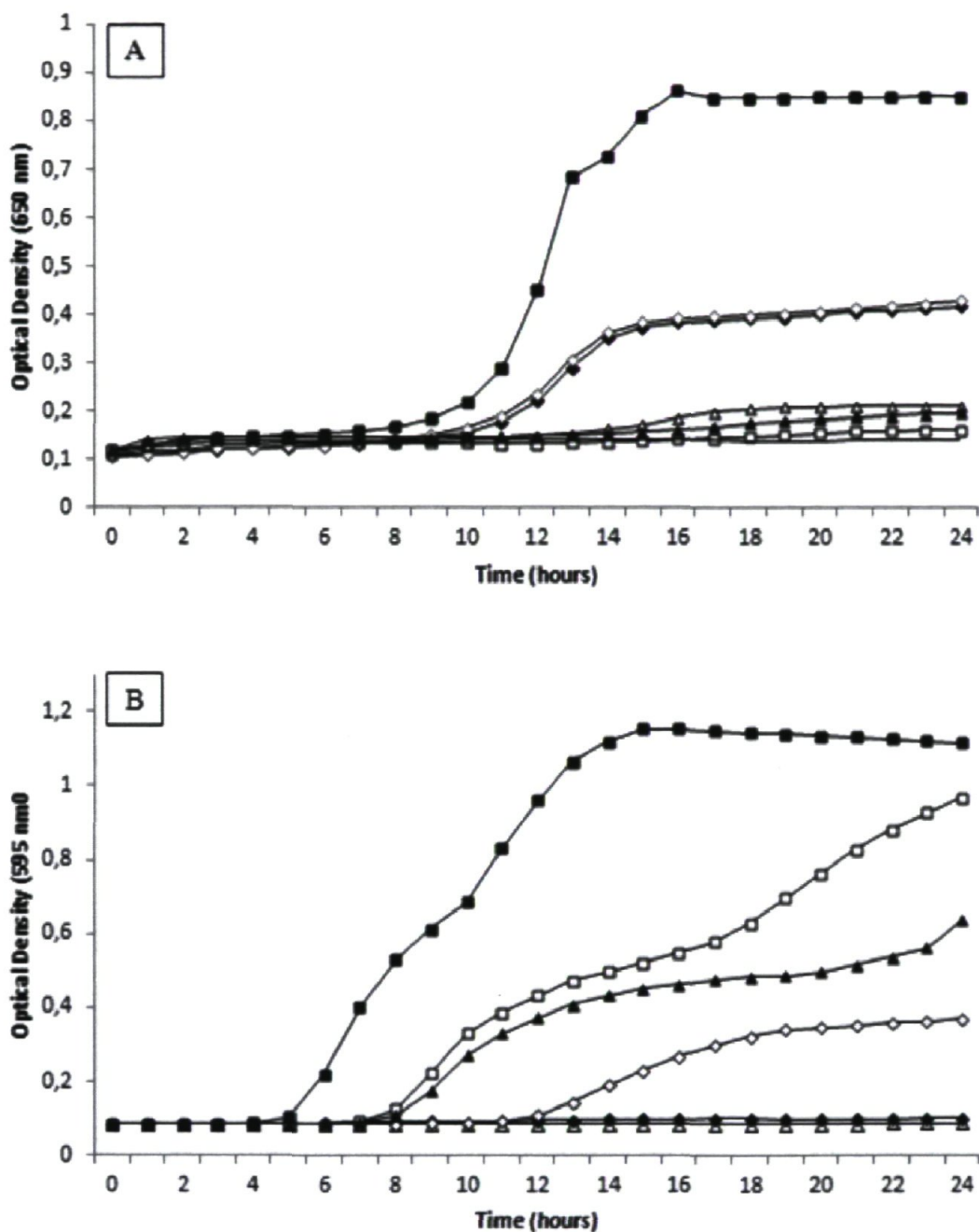


Figure IV.4: Determination of the antimicrobial activity of reversed-phase HPLC fractions 1 (open square), 5 (filled diamond), 6 (open diamond), 9 (open triangle) and 12 (filled triangle) obtained from Bipro WPI hydrolyzed for 60 minutes by pepsin. Activity against *L. ivanovii* (A) and *E. coli* (B) compared with negative (no mark) and positive bacterial (filled square) controls. Protein concentrations of added fraction are below 30 $\mu\text{g/ml}$.

Tableau IV.2: Amino acid sequence (based on MS/MS spectra) and corresponding macromolecular fragment of antibacterial peptides found in reversed-phase HPLC fractions of WPI after 60 minutes of hydrolysis by pepsin.

Fraction	Sequence	Theoretical mass	Observed mass	Fragment	Ions assigned to peptide fragment in [M+H] ⁺ mode
1	KVAGT	474.5	475.3	β -lg f(14-18)	457.2 b5 ; 413.3 a5-NH₃ ; 183.1 a2-NH₃ ; 329.2 y2-H₂O ; 228.1 b2 ; 230.1 y3-H₂O ; 356.2 b4 ; 210.1 b2-H₂O ; 299.2 b3 ; 339.2 b4-NH₃ ; 396.2 a5-NH₃-H₂O ; 281.2 b3-H₂O ; 439.2 b5-H₂O
	VRT	374.4	375.3	β -lg f(123-125)	239.1 b2-NH₃ ; 274.1 c2 ; 256.1 b2 ; 357.2 b3 ; 197.1 b2-59 ; 340.2 b3-H₂O ; 313.2 a3-NH₃
5	PEGDL	529.3	530.3	β -lg f(50-54)	513.2 z5 ; 398.3 b4 ; 370.3 a4 ; 495.3 z5-H₂O ; 485.3 a5 ; 416.3 z4 ; 380.3 b4-H₂O ; 353.3 a4-NH₃ ; 270.1 z3-H₂O ; 228.1 b2 ; 246.1 y2 ; 267.1 b3-H₂O ; 199.1 a2 ; 285.2 b3
	KVGIN	529.6	530.3	α -la f(98-102)	513.2 z5 ; 398.3 b4 ; 370.3 a4 ; 495.3 z5-H₂O ; 385.2 z4 ; 402.2 y4 ; 485.3 z4 ; 416.3 c4 ; 380.3 b4-H₂O ; 353.3 a4-NH₃ ; 228.1 z2 ; 246.1 y2 ; 267.1 b2-H₂O ; 199.1 a2 ; 285.2 b3 ; 210.1 b2-H₂O ; 477.2 b5-H₂O-NH₃ ; 467.3 a5-NH₃
6	LPMH	496.6	497.2	β -lg f(143-146)	479.2 b4 ; 269.1 z2 ; 287.1 y2 ; 360.2 c3 ; 324.3 b3-H₂O ; 384.2 y3 ; 410.2 x3 ; 342.2 b3 ; 462.2 b4-NH₃ ; 366.2 z3 ; 451.2 a4
	EKF	422.5	423.2	β -lg f(134-136)	240.1 b2-H₂O ; 405.2 z3 ; 387.2 z3-H₂O ; 195.0 a1-H₂O-NH₃ ; 166.0 y1
12	IRL	400.5	401.3	β -lg f(147-149)	288.2 y2 or c2 ; 253.1 b2-NH₃ ; 270.2 b2 ; 175.1 [R+H]⁺ ; 138.0 a2-H₂O-87 ; 211.1 b2-59 ; 229.1 y2-59 ; 366.2 z3-H₂O ; 156.0 a2-87 ; 183.1 b2-87 ; 384.2 z3

All identified peptides had a mass lower than 1000 Da and were released from β -lg, except for one derived from α -la. The identified peptides in fraction 1 (KVAGT and VRT), fraction 5 (KVGIN) and fraction 12 (IRL) are positively charged at neutral pH, with isoelectric points above 10 and are composed mainly of basic or aliphatic amino acids. LPMH and EKF, both identified in fraction 6, are uncharged and have isoelectric points close to 7. The MS/MS spectrum of the m/z 497.2 ion, corresponding to the sequence LPMH, selected from the MS full-scan chromatogram of fraction 6, is presented in Figure IV.5. KVGIN and PEGDL were proposed because they display the same m/z ratio. PEGDL, which contains glutamic and aspartic acids, is acidic and has a distinctly negative charge at

neutral pH. Identification of the peptides in fraction 9 was not possible because of insufficient quantities.

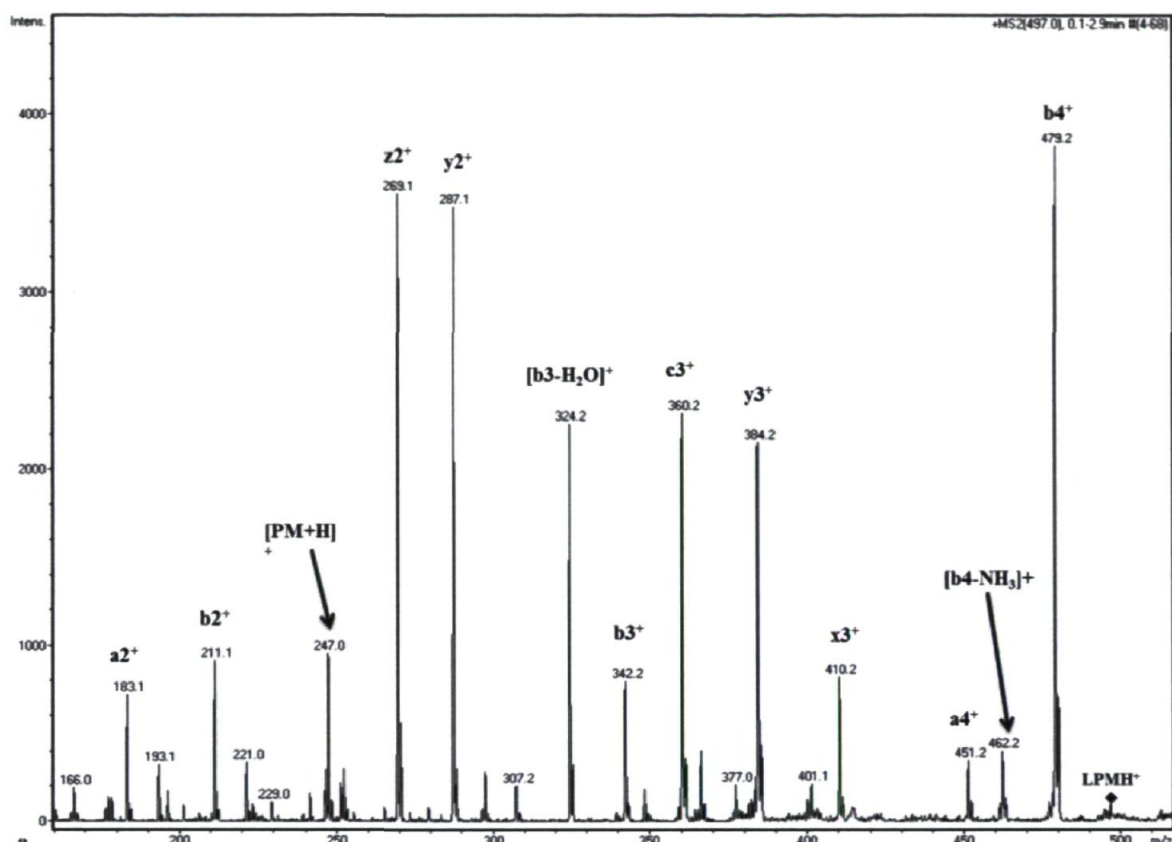


Figure IV.5: Identification of daughter ions consistent with whey protein sequences corresponding to the mass determined by MS/MS and using the Fragment Ion Calculator; peak assignments are shown for the corresponding peptide sequence (LMPH).

IV.4. Discussion

In addition to providing nitrogen in the form of amino acids, dairy proteins contain encrypted within their primary structures an array of bioactive peptides, which may be released upon hydrolysis. The number of such peptides identified in caseins and whey proteins is growing continuously [261]. This study reports the isolation and identification of antibacterial peptides obtained from hydrolysis of WPI with gastrointestinal enzymes. According to manufacturer, WPI is composed primarily of β -lg (74%) and α -la (12.5%). Tryptic and chymotryptic hydrolysates of WPI did not exhibit antibacterial activity, although previous studies have revealed the presence of antimicrobial peptides corresponding to sequences of β -lg and α -la [302, 303] **Erreur ! Signet non défini.** Pihlanto-Leppälä *et al.* were also unable to obtain β -lg or α -la chymotryptic hydrolysates

able to inhibit *E. coli* [309]. In the present study, we observed an inhibitory effect of peptic hydrolysates against *L. ivanovii*. Similar effects have been reported previously for peptic hydrolysates of pure β -lg or α -la on *E. coli*. It is noteworthy that peptic hydrolysates exhibited antimicrobial activity in spite of their weak degree of hydrolysis. With only about 3.7 % of its peptide bonds hydrolysed after 2.5 h, whey proteins appear to be a poor substrate for pepsin. High percent of native β -lg, what is well-known to be very resistant to peptic attack [24], in WPI can explain this weak DH. This value is attained after 90 minutes of proteolysis. The active peptide or peptides appeared between 45 and 90 minutes and then disappeared, which suggests that they contained susceptible peptide bonds.

Antimicrobial peptides from hydrolysates of β -lg or α -la have been identified in previous studies. Pellegrini *et al.* described several bactericidal domains liberated by hydrolysis of α -la and β -lg by trypsin and/or chymotrypsin [302, 303]. Four peptides were released by trypsin from β -lg, namely VAGTWY (fragment 15-20), AASDISLLDAQSAPLR (fragment 25-40), IPAVFK (fragment 78-83) and VLVLDTDYK (fragment 92-100), and two were released from α -la: EQLTK (fragment 1-5) and GYGGVSLPEWVCTTF/ALCSEK (fragments 17-31 and 109-114 held together by a disulfide bridge). Chymotrypsin released the antimicrobial peptide CKDDQNPH/ISCDKF (fragment 61-68 and 75-80, bridged by a disulfide bond) from α -la. These peptides are negatively charged and active mostly against Gram-positive bacteria, but their mode of action remains unknown. The action of pepsin on these two proteins had not yet been tested as means of obtaining antimicrobial sequences.

In the present study, antimicrobial peptides were found in some fractions of WPI hydrolyzed by pepsin. No identified sequence was longer than 5 amino acids. Although β -lg is an anionic protein, all of the antibacterial peptides except PEGDL are cationic, which is the case of the majority of antimicrobial peptides. Similar peptides have been reportedly derived from milk proteins such as κ -casein [295, 310] and β -casein [295]. Based on our ESI-MS results, these < 3000 Da fractions contained no other peptides in significant amounts. The sequences of the antibacterial peptides isolated are not exact matches with theoretical sequences expected from pepsin hydrolysis. Degradation is a likely explanation, due to the heating employed for stopping the hydrolysis. For example, fragments LPMH

and IRL were found instead of the theoretical sequence LPMHIRL. However, the presence of exopeptidases in the WPI could also explain why longer peptides were not found. This would explain the presence of sequences VRT and KVAGT instead of VRTPEVDDEA and LDIQKVAGT respectively.

The MS/MS results leave little room for doubt with respect to the identified sequences, except in the case of fraction 5, in which two sequences matched the mass and the corresponding daughter ion mass spectrum with a reasonable doubt (± 1 Da). PEGLD corresponds to fragment 50-54 of β -lg and has a negative charge, which makes it an unlikely antimicrobial peptide. The other matching sequence corresponds to fragment 98-102 of α -la (KVGIN) and is positively charged, but does not resemble any peptide found in antimicrobial peptide databases. In other specific cases, theoretical and actual results did not match. As shown in Table IV.2, the masses of the two tripeptides containing arginine, identified in antimicrobial fractions 1 and 12, differ by 87 and 59 Da from the theoretical mass of some daughter ions. This difference could be attributed to the loss of $N(CH_3)_3CO$ or $N(CH_3)_3$ groups as previously described [311]. Although identification of the peptide present in fraction 9 was unsuccessful even after concentration, the data clearly indicated that the observed antibacterial activity was due to a peptide at very low concentration (less than 30 μ g/mL). The synergistic effect between identified peptides could be possible in the case of fractions 1 and 6, which contain two peptides at similar concentrations.

Six of the sequences identified in the present study have never been reported to be antimicrobial. VRT (fraction 1), PEGDL or KVGIN (fraction 5), LPMH and EKF (fraction 6) and IRL (fraction 12) are thus new antimicrobial sequences. However, some of them have already been cited as bioactive peptides. For instance, Hernández-Ledesma *et al.* found that the extended sequence LVRT possesses a low level of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity [312]. The sequence LPMH is a fragment of β -lactokinin, which reportedly has high ACE inhibitory [313] activity but whose antimicrobial character was not noted. Finally, the sequence IRL is already recognized in the ACE inhibitor HIRL [314] and in MHIRL, which has antioxidant activity attributed to the presence of methionine [315]. Extended comparison with known antimicrobial peptides revealed that KVAGT (fraction 1) has been found in antimicrobial sequences, namely maculatin 2.1,

isolated from the skin of a tree frog [316] and hedistin, expressed in NK-like cells of a marine annelid [100]. Both of these peptides are active against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Similarly, the tripeptide EKF (fraction 6) is found in many antimicrobial peptides of larger size (> 30 amino acids), such as LFampin. However, the presence of the fragment EKF does not seem sufficient to explain the antifungal effect of LFampin, although the substitution of lysine by glycine drastically reduces its antifungal activity [317].

Food proteins may now be regarded not only in terms of nutritional value but also as a possible resource for identifying antimicrobial peptide sequences. This article describes the isolation and identification of antimicrobial peptides released from whey proteins after peptic hydrolysis. Since whey proteins are by-products of cheese making, the volume available would allow production on a significant scale. Since short peptides have the advantage of being easily synthesized, promising sequences will be broken down into several derivatives to allow optimization of antibacterial activity and to determine their spectrum of action. Although neither the effectiveness of antimicrobial peptides as food preservatives nor their safety for use as food additives has been sufficiently demonstrated, they offer the advantage of being derivable from generally recognized as safe (GRAS) substances. Their use in medicine and in the food industry should meet with less consumer resistance and easier regulatory approval, on the basis of their natural occurrence.

Atteinte des objectifs et avancement des connaissances

Les objectifs de ce chapitre consistant à générer et purifier des peptides antimicrobiens à partir d'un mélange de protéines sériques ont été atteints. En effet, il a été démontré que l'utilisation de la pepsine permettait la production d'hydrolysats avec un potentiel antimicrobien au cours du temps. La caractérisation microbienne des hydrolysats a permis la sélection des hydrolysats peptiques prélevés entre la 45^{ème} et la 90^{ème} minute de l'hydrolyse car ils étaient les seuls à exhiber une activité antibactérienne significative. Le fractionnement de l'échantillon prélevé à la 60^{ème} minute a permis d'isoler 5 fractions antimicrobiennes qui ont montré des activités souches dépendantes. Ce fractionnement a mis en évidence le fait que l'activité initiale observée était due à une combinaison de peptides (Table IV.2). Une caractérisation de la composition de ces fractions a révélé la présence d'au moins 7 peptides. L'identification de ces peptides a permis leur caractérisation physicochimique. Un seul de ces peptides provient de l' α -lactalbumine alors que tous les autres proviennent de la β -lactoglobuline. La comparaison avec la littérature met en lumière que 6 des 7 peptides identifiés n'avaient jamais été reportés comme antimicrobiens.

Ces résultats ont contribué à l'avancement des connaissances scientifiques, d'une part en démontrant qu'il est possible d'obtenir des peptides antimicrobiens à partir de coproduits de l'industrie fromagère, et d'autre part en permettant l'identification de nouvelles séquences antimicrobiennes. Idéalement, ces travaux pourraient être complétés en synthétisant ces peptides ainsi que de nombreux mutants afin d'étudier leur mode d'action et d'élargir leur spectre d'action.

**CHAPITRE V. Activité antimicrobienne d'extraits
hydrosolubles de fromages produits au Canada**

Transition contextuelle

Dans le chapitre précédant, des peptides antimicrobiens provenant d'un mélange de protéines sériques ont été isolés, identifiés et caractérisés. Cela permettra d'obtenir des peptides antimicrobiens à partir d'un coproduit alimentaire peu coûteux. Toutefois, tel que mentionné dans le chapitre 3, très peu d'études ont tenté d'isoler des peptides antimicrobiens à partir d'un produit laitier alimentaire alors que ce sont des peptides qui présentent de gros avantages car, outre le fait qu'ils sont consommés régulièrement et donc facilement considérés comme sains, ils auraient déjà démontré leur résistance aux protéases forcément présentes dans la matrice. Par conséquent, l'objectif principal de cette étude a été de : 1) déterminer la présence ou l'absence de peptides antimicrobiens dans les fromages et 2) caractériser leur impact contre des microorganismes retrouvés dans les industries alimentaires.

Ce chapitre a fait l'objet d'un article intitulé : «**Antimicrobial activities of water-soluble extracts from cheeses produced in Canada** » soumis pour publication dans «Journal of the Science of Food and Agriculture ».

Résumé

Les produits laitiers sont de bonnes sources de peptides bioactifs. Toutefois, comparativement aux autres bioactivités, il y a peu de travaux ayant porté sur l'activité antimicrobienne des peptides dans les produits laitiers comme le fromage. L'activité antimicrobienne de cinq extraits hydrosolubles préparés à partir de fromage canadiens, nommés Mozzarella, Gouda, Suisse, Cheddar fort vieilli et Cheddar moyen, a été testée contre des bactéries (*Listeria ivanovii* HPB28, *Listeria monocytogenes* Scott A3, *Escherichia coli* MC4100 et *Escherichia coli* O157:H7) et des champignons filamenteux (*Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium* et *Penicillium*). Après purification de la fraction peptidique, les fromages Mozzarella et Gouda ont permis la réduction de 3 log de *Listeria ivanovii* et *Escherichia coli*. Cependant, les réductions observées sur *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli* O157:H7 ne se sont pas révélées significatives. Les extraits provenant des Cheddars et du fromage Suisse n'ont pas révélé d'activité antimicrobienne. En plus de l'activité antibactérienne, les cinq extraits ont retardé la germination des spores de manière significative sans pour autant avoir un effet sur leur viabilité. Les résultats ont démontré le potentiel des extraits hydrosolubles de fromages comme source de peptides antimicrobiens et ouvre la possibilité de leur utilisation comme conservateurs alimentaires ou de leur exploitation dans les domaines pharmaceutiques et cosmétiques.

Mots clés: Fromage canadien, peptide antimicrobien, extrait hydrosoluble.

Abstract

Dairy products are a great source of bioactive peptides. Compared to other bioactivities, there are few studies of antimicrobial activities of peptides in dairy products such as cheese. Five water soluble extracts (WSE) prepared from Canadian cheeses, namely Mozzarella, Gouda, Swiss, old Cheddar and medium Cheddar were assessed for their antimicrobial activity against bacteria (*Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* MC4100 and *Escherichia coli* O157:H7) and filamentous fungi (*Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium* and *Penicillium*). After purification of the peptidic fraction, Mozzarella and Gouda produced 3-log reductions of *Listeria ivanovii* and *Escherichia coli*. Reductions are not significant on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. Cheddars and Swiss extracts did not induce antimicrobial activity. All five extracts delayed mold spore germination significantly. Results demonstrated the potential of cheese extracts as source of antimicrobial peptides and a promising alternative for food preservation.

Keywords: Canadian cheese, antimicrobial, water-soluble extract

V.1. Introduction

Contamination by microbial spoilage is one of the most serious problems in the dairy products industry. Chemical preservatives such as sorbates and propionates are currently used in most cheese products. Consumer demand has put pressure on manufacturers to replace these with more natural agents. This is a challenge for the industry, since natural alternatives (such as salting) may alter the quality of cheeses and are not currently acceptable. Among the natural alternatives, lactic acid bacteria (LAB) are particularly interesting because of their capacity to synthesize a range of antimicrobial compounds such as phenyllactic acid, cyclic dipeptides, short or medium-chain fatty acids and bacteriocins. These compounds are attractive because they are naturally present in food products and are produced by bacteria that are considered GRAS or “generally recognized as safe” [49, 318]. This gives them a certain appeal for manufacturers, but cheese already contains bacteria as lactic ferments and adding LAB can influence cheese quality by altering rheological characteristics or microbial composition [319]. Antimicrobial peptides (AMPs) from plants, animals, fungi or other sources [64] have also been suggested as alternative agents for food preservation. AMPs are small molecules with a molecular mass of 1 to 10 kDa. Most of them are positively charged but some studies have demonstrated the presence of anionic AMPs as well [105]. AMPs have been isolated recently from dairy products. Milk proteins hydrolyzed by digestive enzymes have been shown to possess antimicrobial activity. Lactoferricin B, obtained by the action of pepsin on lactoferrin, has been shown to have a broad range of activity and is the best known milk-derived antimicrobial peptide [259]. More recently, Pellegrini *et al.* [302, 303] showed bactericidal domains in native α -lactalbumin and β -lactoglobulin hydrolyzed with trypsin and/or chymotrypsin. Peptides obtained from these whey proteins are negatively charged and are active mostly against Gram-positive bacteria, although their mode of action remains unknown. There are few studies of the antimicrobial effects of cheeses and we have little means of predicting the impact of antimicrobial fractions produced by bacteria in cheeses or by enzymatic hydrolysis of dairy proteins [320, 321]. Rizzello *et al.* [321] have demonstrated that water-soluble extracts of Italian cheese contain several AMPs with inhibitory activity against Gram-positive and Gram-negative bacterial species, including spoilage and foodborne

pathogenic bacteria. Further evidence for the release of short AMPs by fermentation of milk caseins by LAB has been provided by Hayes *et al.* [322].

Release of antimicrobial peptides depends on the enzymatic activity of the starter culture during initial fermentation and maturation. For example, Gouda contains mesophilic *Leuconostoc* sp. as a starter culture, Swiss cheese contains *Propionibacterium* sp. and Mozzarella contains yoghurt starters. Furthermore successful production of the cheeses depends on a precisely controlled warming step. Ripening time is also important in the case of medium and old Cheddars. All of these parameters likely have an impact on the quality and the quantity of antimicrobial compounds produced [323, 324]. The aim of the present study is to measure antibacterial and antifungal activities of the water-soluble extract obtained from five cheeses manufactured in Canada.

V.2. Material and methods

V.2.1. Preparation of water-soluble extracts

Five cheese varieties, namely Swiss (Selection Eco; Metro, Toronto, ON, Canada), Gouda (Selection Eco; Metro, Toronto, ON, Canada), hard Mozzarella (Saputo, Montréal, QC, Canada) and old and medium Cheddar (Cracker Barrel; Kraft, Don Mills, ON, Canada) were purchased from a local supermarket. The procedure described by Kuchroo and Fox [325] was followed with some modifications. Samples (300 g) were grated and dispersed in distilled water (1/3, w/w) using an Ultra-Turrax (Janke & Kunkel, Staufen, Germany) for 10 min at room temperature. Cheese homogenates were then stirred for 1 h at 40°C. The resulting suspensions were centrifuged at 3000 \times g for 30 min at 4°C then filtered on Whatman n°2 paper. The supernatants were subjected to ultrafiltration (10 kDa cut-off, Millipore, Bedford, MA) and the resulting permeate was lyophilized. The lyophilized material was dissolved in sterile water, filtered on 0.22 μ m membrane (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), concentrated and stored at -20°C until testing. Permeates of cheese water-soluble extracts (pWSEs) were performed in triplicate with independent production lots. Salts and organic acids removal was executed with a Sep-pak cleanup column (Waters Corporation, Millford, MA, USA).

V.2.2. Chemical analysis of the extracts

The extract pH was measured using an IQ150 pH meter (IQ Scientific Instruments Inc, Carlsbad, CA). Dry extract and moisture were determined using a drying oven (100°C) and mineral content was determined by ashing the dry extract at 550°C. Lipid content was determined using the method of Bligh & Dyer [326]. Carbohydrates were measured using the colorimetric method of Dubois *et al.* [327] and water-soluble nitrogen concentrations were determined using a Leco FP-528 nitrogen analyzer (Leco Corp., St. Joseph, MI). Each test was done in triplicate. Concentrations of lactic, acetic, propionic, butyric, iso-butyric, valeric and iso-valeric acids in pWSEs were determined using a Waters chromatograph connected to a differential refractometer Waters 410 and equipped with an ION-300 ion exclusion column (300 × 7.8 mm) (Interaction Chemicals, Mountain View, CA). Sulfuric acid (H₂SO₄, 5 mM) was used as mobile phase and flowed at 0.4 mL/min and 37°C.

V.2.3. Bacteria and molds

Listeria ivanovii HPB28, *Listeria monocytogenes* Scott A3, *Escherichia coli* MC4100, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150 as bacteria and *Fusarium oxysporum*, *Mucor racemosus* LMA-425, *Aspergillus versicolor* LMA-370, *Penicillium camemberti* ATCC 4845 and *Penicillium commune* LMA-212 as fungus were used as target microorganisms for the microbial growth inhibition assays. The bacteria were all grown in Tryptic Soy Broth with 0.6% (w/v) yeast extract (TSB; Difco Laboratories, Sparks, MD). *L. ivanovii* and *L. monocytogenes* were incubated aerobically at 30°C and *E. coli* strains were incubated aerobically at 37°C. All the fungi were grown aerobically on Potato Dextrose Agar (PDA, Difco, Sparks, MD) and were incubated at 25°C for one week.

V.2.4. Agar diffusion assay

The method described previously by Hammami *et al.* for bacteria was used [308]. This method was adapted to fungi. Briefly, Potato Dextrose Broth (PDB, VWR, Ville Mont-Royal, QC) supplemented with 0.9% agar was autoclaved and poured into sterile Petri plates. After solidification, wells were made using the wide end of a sterile pipette and filled with 80 µl of each pWSE at 68 mg/ml. All plates were kept up at 4°C for 1 h and a mycelium disk carefully scraped from the surface of a potato-dextrose agar plate was placed in the center. The plates were incubated at 25°C for 7 days (2 days for *Mucor*

racemosus) to develop inhibition zones. Natamycin (United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD) was used as positive antifungal control (20 mg/l).

V.2.5. Critical dilution method and minimal inhibitory concentration determination

This bioassay was done using polystyrene micro-assay plates (96-well Microtest, Becton Dickinson Labware, Sparks, MD, USA) as described by Hammami *et al.* [308]. Briefly, microplates loaded with two-fold serial dilutions of pWSE (starting at 34 mg/ml) in TSB were seeded with approximately 1×10^4 CFU per well using log-phase culture diluted in TSB to $0.5\text{--}1.0 \times 10^6$ CFU/ml. Microplates were incubated at 30°C (or 37°C for *E. coli*) for 24 h and absorbance at 595 nm was measured hourly using an Infinite[®] F200 PRO photometer (Tecan US inc., Durham, NC). Minimal inhibitory concentration (MIC) was expressed in mg/ml and corresponds to the lowest concentration that limited the development of turbidity after 16 to 20 h. Microbial counts were determined after 24 h for the highest concentration (34 mg/ml) of pWSE. For fungi, TSB was replaced by PDB and wells were seeded with approximately 1×10^4 spores/ml prior to incubation at 25°C for 48 h. Dichloran Rose Bengale Chloramphenicol Agar (DRBC agar, EMD chemicals, Gibbstown, NJ) was used for viability count after 48 h.

V.3. Results

V.3.1. Water-soluble extract production and physicochemical characterization

Table V.1 shows the starter cultures, curdling temperatures and ripening times involved in the production of Gouda, Swiss, Mozzarella and medium and old Cheddar cheeses. These factors have a major impact on the quality and the quantity of fat, carbohydrate and protein in cheeses. The WSE preparation procedure was designed to recover and concentrate nitrogenous compounds smaller than 10 kDa. The analysis of the different extracts is shown in Table V.2. Before sep-pak purification, they were composed mainly of nitrogenous compounds ($52.04 \pm 2.13\%$) and mineral salts ($40.62 \pm 2.25\%$), while fat and carbohydrates were present at much lower concentrations (less than 5%). Mozzarella and medium Cheddar had a slightly higher percentage of carbohydrate probably because of the short ripening time. The natural organic acids identified in pWSE were lactic and propionic

acids. Lactic acid was present in amount comprised between 0.06 and 0.49 M in all cheese pWSEs with minimal and maximal values found in old Cheddar and Swiss, respectively. Propionic acid concentration was found to be low as 0.32 M in Swiss type cheese. Besides, cheese pWSEs presented similar pH values, which ranged from 5.23 to 5.82 (Table V.2). Lactic and propionic acid were active against all the tested strains with MICs values of 0.06 and 0.12 M, respectively. Noticeably, no organic acids were detected in peptidic extracts after cleanup with Sep-pak column, and mineral salts concentration was dropped (about 5%).

Table V.1: Characteristics of the cheese varieties tested in this study.

Cheese	Starter ¹	Cooking temperature ¹	pH ²	% Moisture ³
Medium Cheddar	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> and <i>Streptococcus salivarius</i> spp. <i>thermophilus</i> [328, 329]	38°C	5.23	36
Old Cheddar	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> and <i>S. salivarius</i> spp. <i>thermophilus</i> [328]	38°C	5.25	36
Gouda	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> and <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> and <i>Leuconostoc</i> spp. [330, 331]	35-38°C	5.47	41
Swiss	<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> (ratio 1:1) and <i>Propionibacterium freudenreichii</i> [332, 333]	51-58°C	5.82	40
Mozzarella	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. helveticus</i> or <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (ratio 2:1 or 3:1) [324]	40-44°C	5.31	42

¹Theoretical data; ²Experimental values; ³According manufacturers.

Table V.2: Chemical composition of the water-soluble extracts of used cheeses (mg/ml).

	Cheese	<i>Mozzarella</i>	<i>Gouda</i>	<i>Swiss</i> ^a	<i>Old Cheddar</i> ^a	<i>Medium Cheddar</i> ^a
Before sep-pak purification	Dry content	147.59 ± 2.42	155.40 ± 8.08	176.06 ± 0.00	170.63 ± 2.41	184.48 ± 11.19
	Minerals salts (ash)	55.13 ± 0.50	57.95 ± 0.67	62.37 ± 0.00	65.12 ± 0.54	58.20 ± 0.37
	Fat	6.35 ± 0.71	5.21 ± 0.13	3.36 ± 0.15	6.42 ± 0.13	5.43 ± 0.61
	Carbohydrate	9.37 ± 2.65	4.13 ± 2.44	1.77 ± 0.18	3.12 ± 1.47	8.87 ± 5.90
	Water-soluble nitrogen	68.35 ± 1.45	68.07 ± 2.56	77.07 ± 0.83	88.00 ± 1.92	81.28 ± 0.39
	Total (ash+fat+CHO+N)	139.21	135.37	144.57	162.65	153.78
	% identified dry matter	94.32	87.11	82.11	95.33	83.36
	Lactic acid (M)	0.18 ± 0.02	0.32 ± 0.09	0.29 ± 0.01	0.40 ± 0.05	0.06 ± 0.00
	Propionic acid (M)	-	-	0.32 ± 0.07	-	-
After sep-pak purification	Dry content	82.78 ± 1.02	78.25 ± 6.65			
	Minerals salts (ash)	4.26 ± 0.21	3.94 ± 0.31			
	Fat	2.25 ± 1.32	1.78 ± 1.63			
	Carbohydrate	2.56 ± 1.05	1.13 ± 0.44			
	Water-soluble nitrogen	67.85 ± 0.63	67.99 ± 3.12			
	Total (ash+fat+CHO+N)	76.92	74.84			
% identified dry matter	92.92	95.64				

^aPurification was not realized because of a lack of activity before organic acids and salts removal.

V.3.2. Antibacterial activity

Evaluation of the inhibitory activities of pWSEs by the agar diffusion method indicates that at the same concentration (68 mg/ml), only Gouda and Mozzarella pWSEs present a significant bacterial inhibition against *L. ivanovii* (Figure V.1). The micro-dilution indicated that all extracts could inhibit both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Growth inhibitions in the presence of each pWSE are summarized in Table V.3. In the absence of pWSEs, bacterial counts after 24 h were 10.70 ± 0.02 log CFU/ml for *L. ivanovii*, 9.56 ± 0.12 log CFU/ml for *L. monocytogenes*, 10.43 ± 0.05 log CFU/ml for *E. coli* MC4100 and 10.00 ± 0.01 log CFU/ml for *E. coli* O157:H7 (data not shown). In the presence of 34 mg/ml of pWSE, *L. ivanovii* counts were decreased by more than three log cycles for medium Cheddar, Gouda and Mozzarella and about 1 log CFU/ml for old Cheddar and Swiss. Although Gouda and Mozzarella pWSE inhibited *L. monocytogenes*

significantly, with respective reductions of 2.93 ± 0.33 and 3.83 ± 0.15 log, extracts of the other cheeses did not inhibit this strain significantly (less than one log reduction). Reductions of almost 4- log cycles were obtained for *E. coli* MC4100 in the presence of Gouda and Mozzarella pWSE and close to 1.5 log cycles in the presence of Cheddar and Swiss pWSE. *E. coli* O157:H7 was also inhibited by Mozzarella pWSE (reduction of 2 log CFU/ml) and to a lesser extent by medium Cheddar and Gouda (1.42 ± 0.24 and 1.35 ± 0.25 log CFU/ml). With pWSE from Old Cheddar and Swiss cheese, 1-log reduction of *L. ivanovii* and *E. coli* MC4100 was obtained, while no significant reduction (less than 1-log) was observed with *L. monocytogenes* and *E. coli* O157:H7. With medium Cheddar pWSE, a 3-log reduction of *L. ivanovii* was obtained while only a moderate or weak inhibition of *E. coli* and *L. monocytogenes* was obtained. It is noteworthy that Gouda and Mozzarella pWSE strongly affected cell viability, with Mozzarella pWSE being the most active against *E. coli* O157:H7 (1-log versus 2-log reduction).

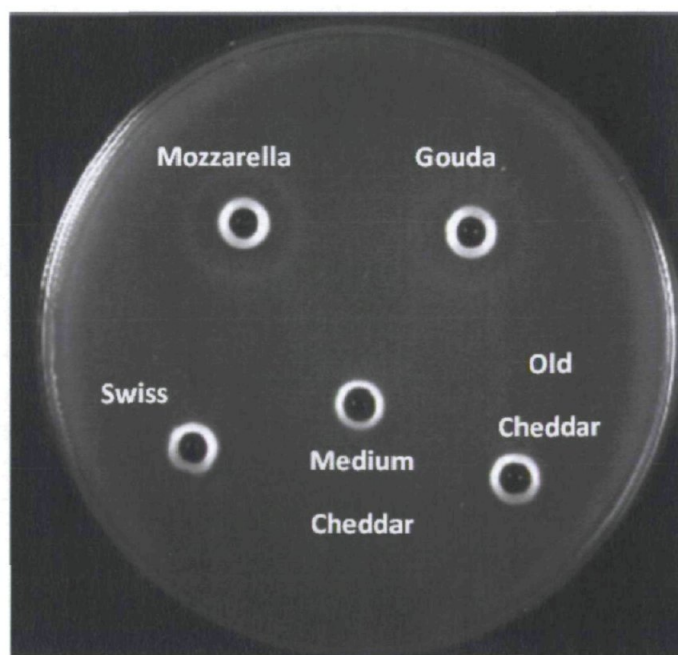


Figure V.1: Agar diffusion assay showing inhibition of *Listeria ivanovii* HPB28 by cheese water-soluble extracts.

Table V.3: Logarithmic reductions of the growth of *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *E. coli* MC4100 and *E. coli* O157:H7 in the presence of 34 mg/ml of each water-soluble extract.

Bacterial strains	Log Nc/Ni ¹				
	Mozzarella	Gouda	Swiss	Old cheddar	Medium Cheddar
<i>L. ivanovii</i> HPB28	4.66 ± 0.28*	4.46 ± 0.59*	1.42 ± 0.04*	1.19 ± 0.24*	3.05 ± 0.22*
<i>L. monocytogenes</i> Scott A3	3.83 ± 0.15*	2.93 ± 0.33*	0.52 ± 0.01	0.68 ± 0.64	0.59 ± 0.50
<i>E. coli</i> MC4100	3.67 ± 0.33*	3.93 ± 0.50*	1.59 ± 0.24*	1.49 ± 0.08*	1.40 ± 0.06*
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 35150	2.01 ± 0.11*	1.35 ± 0.25	0.43 ± 0.29	0.77 ± 0.33	1.42 ± 0.24*
Before purification					
<i>L. ivanovii</i> HPB28	3.36 ± 0.52*	3.05 ± 0.22*			
<i>L. monocytogenes</i> Scott A3	0.31 ± 0.11	0.02 ± 0.13			
<i>E. coli</i> MC4100	2.88 ± 0.18*	3.02 ± 0.51*			
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 35150	1.08 ± 0.03*	NI ²			
After purification					

¹ NC and NI are the 24 h increase in the number of colony-forming units in wells without and with peptidic extract respectively, respectively.

² No inhibition.

Values (mean ± SEM, n = 3) are significantly different (* $P < 0.01$) from the mean for control

After organic acids and salts removal, Mozzarella and Gouda peptidic extracts demonstrated a significant bacterial activity. Growth inhibitions of tested strains in presence of Gouda or Mozzarella extracts are shown in Figure V.2, which illustrate a dose-dependent inhibition. Further, both Gouda and Mozzarella presented MICs values against *L. ivanovii* (8.50 mg/ml), as summarized in Table V.4. Additionally, both Gouda and Mozzarella peptidic extracts at 34 mg/ml reduced *L. ivanovii* counts by more than 3 logs CFU/ml. Noticeably *L. monocytogenes* was the less sensitive among the four bacterial strains, with none of the five extracts were active. Although Gouda and Mozzarella pWSE demonstrated activity against *L. monocytogenes*, their extracts did not inhibit significantly this pathogen (less than one log reduction). While, *E. coli* MC4100 was inhibited by Mozzarella extract at MIC value similar to those of *L. ivanovii*, Gouda extract was less potent with a MIC value of 17 mg/ml. Furthermore, *E. coli* MC4100 cell counts were decreased by almost three log cycles by Mozzarella or Gouda peptidic extract. Conversely, *E. coli* O157:H7 presented a very weak sensitivity to these pWSEs, as its partial inhibition required a concentration at least 34 mg/ml of extract. While, peptidic extract of Mozzarella induced one log CFU/ml reduction of *E. coli* O157:H7, Gouda did not induce a significant cell counts reduction. Besides, Swiss and Cheddars peptidic extracts did not exhibited antibacterial activity (data not show).

Table V.4: Minimal inhibitory concentrations (MIC) of water-soluble extracts of cheeses in the case of foodborne bacteria.

	Bacterial strain	Minimal inhibitory concentration (mg/ml)	
		Mozzarella	Gouda
After purification	<i>L. ivanovii</i> HPB28	8.50	8.50
	<i>L. monocytogenes</i> Scott A3	> 34	> 34
	<i>E. coli</i> MC4100	8.50	17
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 35150	34	34

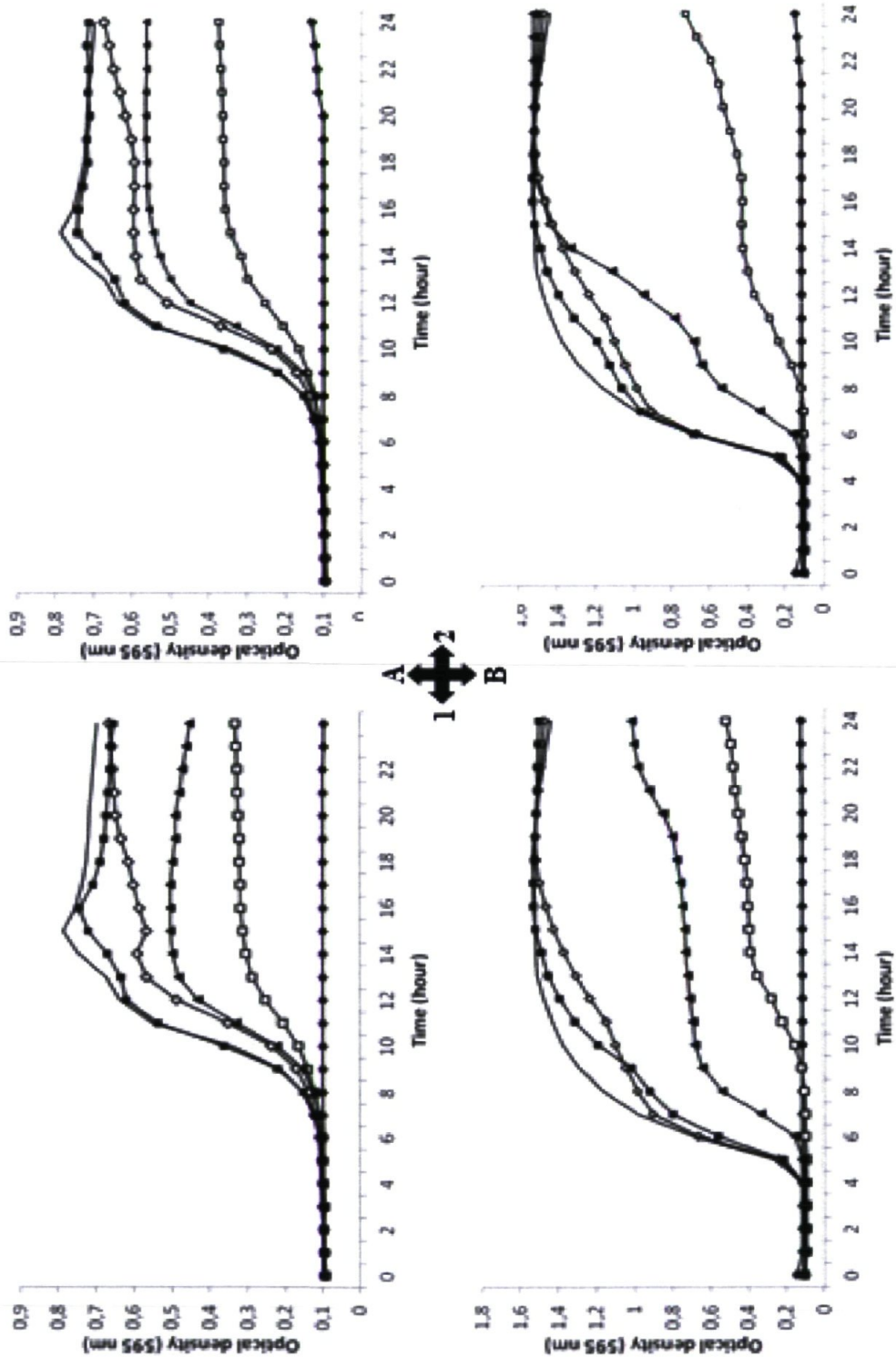


Figure V.2: Growth of *Listeria ivanovii* HPB28 (A) and *Escherichia coli* MC4100 (B) in the presence of WSE of Mozzarella (1) and Gouda (2) in tryptic soy broth. Concentrations (mg/mL) of extract were 34 (solid diamond), 17 (open square), 8.5 (solid triangle), 4.25 (open diamond), 2.13 (solid square) and 0 (none).

V.3.3. Antifungal activity

The same pWSEs were tested for antifungal activity using agar plates. Hyphal growth was not inhibited in the presence of cheese pWSEs (data not shown). However, after organic acids and salts removal, at a concentration of 34 mg/ml, all cheese pWSEs induced a delay in spore germination, as shown in Table V.5. All pWSEs were equally active against *F. oxysporum*, with a minimal concentration of 17 mg/ml. Gouda, Mozzarella and medium Cheddar pWSE were the strongest inhibitors in the case of *A. versicolor* and *M. racemosus* (17 mg/ml), whereas these spores were less sensitive to old Cheddar and Swiss pWSE (34 mg/ml). The lowest concentration values causing delay in germination were obtained against *Penicillium* strains, with Swiss, Gouda and Mozzarella pWSE being the most active (8.50 mg/ml). *Penicillium commune* was the most sensitive mold to all pWSEs except for medium Cheddar, which exhibited a lower inhibitory concentration value (17 mg/ml) against *A. versicolor*, *M. racemosus* and *F. oxysporum*. It was observed that pWSEs delayed germination significantly but did not affect spore viability (data not shown).

Table V.5: Minimal inhibitory concentrations of water-soluble extracts of cheeses causing a delay in spore germination of foodborne molds, after purification.

Fungal strain	Minimal inhibitory concentration (mg/ml)				
	Mozzarella	Gouda	Swiss	Old Cheddar	Medium Cheddar
<i>A. versicolor</i> LMA-370	17	17	34	34	17
<i>M. racemosus</i> LMA-425	17	17	34	34	17
<i>F. oxysporum</i>	17	17	17	17	17
<i>P. camemberti</i> ATCC 4845	8.5	8.5	8.5	34	34
<i>P. commune</i> LMA-212	8.5	8.5	8.5	8.5	34

V.4. Discussion

Milk proteins are a great source of bioactive peptides with antimicrobial, antihypertensive, antithrombotic, immunomodulatory or opioid activities [293]. These peptides are released mainly by proteolytic activities of milk native proteases or microbial proteases. Cheese

ripening is a process characterized by extensive proteolysis. Compared to other biological activities, the antimicrobial activities of peptides isolated from cheese or other dairy products have not been widely reported. Several authors have isolated and purified AMP from pure whey proteins [259, 260, 301-303], but the same procedures performed on whole food matrices have so far failed to corroborate these results. Rizzello *et al.* [321] and Losito *et al.* [320] demonstrated the presence of casein-derived antimicrobial peptides in Italian cheeses, but no antimicrobial peptides derived from whey proteins were identified. However, these studies suggest that known antibacterial peptides derived from caseins should be found in cheese pWSE. In our case, peptide fractions used during this study contain both whey-derived and casein-derived substances. Since peptidic fractions contain only small amounts of fat and carbohydrate and no organic acids, its antimicrobial activity was likely due to peptides. Antimicrobial tests with similar salt concentrations showed no antimicrobial activity against the tested strains (data not shown). The cheeses in this work were all made from cow milk using similar manufacturing processes. Differences between them stem primarily from the amount and type of starter culture used, curdling temperature and ripening time.

In this study, Old Cheddar was the cheese with the longest ripening time and the weakest antimicrobial activity. Likewise, Medium Cheddar, with a shorter ripening time, did not exhibit antimicrobial activity. In contrast, Mozzarella cheese is made with a very short ripening time and exhibits strong activity against bacteria and fungi. These results suggest that AMPs are produced early in the cheese-making process and/or during the first hours of ripening. These results suggest that extended ripening time (several months) may result in a greater degree of proteolysis and peptidase activity, which may lead to hydrolysis of produced AMPs into shorter inactive peptides. O'Shea *et al.* [334] showed that the increase in the complexity of the peptide profile of cheddar cheese can be correlated with ripening time and the gradual appearance of new peptides derived from larger peptides.

In comparison with previous work, MIC values of active extracts were low, indicating a high specific antimicrobial activity. Rizzello *et al.* did not see any activity for pWSE in the range of concentrations up to 60 mg/ml [321]. Fractionating of these pWSEs revealed antimicrobial activities with MIC values lower than 200 µg/ml [321]. Further peptide

purification led to higher antibacterial activities with MIC values a thousand times lower. In the present study, peptidic fractions prepared from both Canadian Mozzarella and Gouda were active at lower concentration (34 mg/ml) and may therefore be considered more potent. These two extracts presented strain-dependent activity and reached MIC values against *E. coli* strains and *L. ivanovii* HPB28. These results suggest different mechanisms of action against the tested strains. This can be due to the production of various antimicrobial substances by fermented bacteria and/or because of the inhibitory action of milk-derived antimicrobial peptides. However, according to the Canadian regulation, no identified bacteriocins were present in studied cheeses (http://laws-lois.justice.gc.ca/PDF/C.R.C.,_c._870.pdf). Besides, this study report on antimicrobial activity against Gram-negative bacteria, which are usually resistant to bacteriocins from dairy microorganisms. Thus, the observed activity was probably due to a range of different peptide sequences. In our study, all the tested cheeses were made from cow milk and it is likely that the same peptides may be present in other pWSE, such as observed by Losito *et al.* [320]. Further investigations are currently in progress in order to determine sequences and mode of action of identified peptides.

To our knowledge, no antifungal peptides derived from cheese pWSE have been reported in the literature. However, hydrolysis of some whey proteins has been shown to release peptides with both antibacterial and antifungal properties [142, 144, 163, 317]. Furthermore, pure lactoferrin and lactoferricin B have been shown to inhibit filamentous fungi [142, 144]. Working with crude fractions gives a less clear picture of antimicrobial activity than pure peptides, since peptide mixtures may also stimulate bacterial cell growth. For example, using pWSE fractionated with a 5-kDa cutoff membrane, Pritchard *et al.* demonstrated very different activities in the permeate and retentate, one antibacterial and the other increasing the growth of bacterial cells [335]. Rizzello *et al.* showed earlier that although a total of five Italian cheeses contained antibacterial peptides, only two crude fractions were active among the nine tested [321]. The absence of measurable activity in crude extracts therefore does not negate the presence of antimicrobial peptides in those fractions.

The present study demonstrated that two tested peptidic fractions contained significant activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Mozzarella and Gouda cheeses yielded active extracts but not Swiss or Cheddars extracts. Thus, antibacterial activity seems depending on cheese variety. Commercial cheese samples have been used, therefore the species listed in Table V.1 are only indicative, since the practice may vary among cheese manufacturers and an indigenous bacterial population originating from milk and/or from the dairy plant can also grow in cheese during ripening. However, the results presented were produced in triplicate from independent production batch, which indicate a stable activity.

This paper is the first report of antifungal activity in water-soluble extracts of cheeses. All five pWSEs delayed the germination of spores of foodborne molds to a significant degree. Cheese pWSE may offer a promising alternative for purposes of food preservation. Further studies in progress aim to identify and examine the mode of action of the active agents in these extracts within the scope of challenge tests in foodstuffs.

Atteinte des objectifs et avancement des connaissances

Les objectifs de ce chapitre consistant à vérifier la présence de peptides antimicrobiens sur différents fromages ont été atteints. Les extraits hydrosolubles de cinq fromages (Mozzarella, Gouda, Suisse, Cheddar moyen et Cheddar fort vieilli) ont été obtenus et la fraction peptidique de chacun a été isolée. La caractérisation microbienne de ces fractions a révélé un potentiel antimicrobien inégal. Ainsi les fractions peptidiques de Mozzarella et de Gouda ont révélé un potentiel antibactérien avec des réductions logarithmiques de près de 3-log pour deux des quatre souches testées. Les trois autres fractions n'ont pas montré d'effet antibactérien. En plus de l'activité antibactérienne, les cinq fractions ont permis de retarder la germination de spores de champignons filamenteux, sans toutefois démontrer un effet sporicide.

Ces résultats ont contribué à l'avancement des connaissances scientifiques en démontrant la présence de peptides antimicrobiens dans les fromages. Idéalement, ces travaux devraient être complétés en identifiant les peptides responsables de l'activité en utilisant la méthode vue dans le chapitre précédant. Il faudrait également élargir ces travaux et étudier l'impact des peptides antimicrobiens sur la flore fromagère ainsi que leur évolution au cours de l'affinage.

CHAPITRE VI. Discussion et conclusion générale

VI.1. Discussion générale

Devant la variété des peptides antimicrobiens décrits dans la littérature, une analyse bibliographique simple n'aurait sans doute pas été suffisante pour obtenir une vue d'ensemble sur la diversité de ces peptides ou sur leurs applications possibles. Une base de données apparaît comme un outil suffisamment puissant pour rapporter toutes les informations nécessaires et pertinentes et permettre en même temps une exploitation optimale des données. Certes, plusieurs bases de données sur les peptides antimicrobiens existent déjà mais sont, pour la plupart, générales et présentent de fait certains défauts inhérents à leur non spécificité. Ainsi, ces bases ne recèlent que des informations fragmentaires et pas suffisamment complètes pour être utilisées à des fins spécifiques. Le regroupement centralisé des informations issues des peptides antimicrobiens provenant des protéines laitières est donc une priorité à développer, ce qui a conduit à la construction d'une base de données lors de la réalisation du premier objectif de ce travail. Pour ceci, de nombreuses informations sur les propriétés des peptides notamment les séquences en acides aminés et les concentrations minimales inhibitrices ou autres données microbiologiques ont été extraites des publications scientifiques et complétées afin de regrouper le plus d'informations physicochimiques et microbiologiques intéressantes. La compilation de ces informations dans une ressource centralisée facilitera l'étude de ces peptides particuliers, que ce soit pour les industriels ou les universitaires, puisqu'elle est disponible gratuitement sur internet. Toutefois, et même si la base de données est exhaustive concernant les informations physicochimiques, certaines informations, comme le mode d'action d'un peptide en particulier ou les différents effets synergiques obtenus avec d'autres composés antimicrobiens, devront être identifiées par l'utilisateur lui-même. De la même manière, les informations présentées dans MilkAMP sont toutes obtenues *in vitro*. C'est-à-dire que les données *in vivo* ou *in situ* ne sont donc pas accessibles directement. Toutefois, l'ensemble des références susceptibles de contenir ces informations sont directement accessibles à partir de MilkAMP. Un tel outil devrait favoriser de nouvelles approches et permettre la synthèse de nouveaux peptides directement à partir des séquences de protéines. Une telle approche est déjà utilisée, comme le démontre le nombre de peptides antimicrobiens non confirmés, contenus par la base de données, et pourrait devenir la norme dans les années futures. En capitalisant sur les travaux préexistants, il paraît effectivement probable de

déterminer de nouvelles séquences antimicrobiennes encore insoupçonnées dans les séquences de protéines natives. À l'avenir, cet outil pourrait être complété en rajoutant d'autres fonctions biologiques connexes comme des peptides avec des activités anticancer ou immunostimulante.

Pour compléter ces observations, une approche expérimentale a été utilisée dans le but d'évaluer le potentiel d'un isolat de protéines sériques en tant que fournisseur de peptides antimicrobiens. Le choix de ce matériel de départ a été dicté par son faible coût ainsi que son grand volume de production qui le rend facilement utilisable en industrie. L'utilisation d'enzymes gastro-intestinales pour libérer des peptides antimicrobiens s'inscrit dans cette même démarche de limitation des coûts. Les résultats obtenus ont démontré une activité significative uniquement pour certains hydrolysats obtenus avec la pepsine et qui dépend du temps d'hydrolyse. Cette étude établit clairement le lien entre l'enzyme utilisée et le potentiel des hydrolysats comme source d'agents antimicrobiens, ce qui laisse la possibilité de réaliser d'autres hydrolysats avec des enzymes plus exotiques pour obtenir des peptides antimicrobiens. Toutefois, l'utilisation d'enzymes avec des seuils de coupure connus semble présenter plus d'intérêt, principalement pour faciliter l'identification des peptides intéressants. Cependant, et comme c'est le cas dans cette étude, l'identification de séquences peptidiques est quelque chose d'envisageable lorsque la matrice de départ n'est pas trop complexe. Ainsi, une étude poussée a été entreprise pour étudier et caractériser les peptides d'un des hydrolysats antimicrobiens. Le fractionnement de cet échantillon a permis de purifier cinq fractions avec une activité antibactérienne contre *Listeria ivanovii* et *Escherichia coli*. Il aurait été intéressant d'élargir le spectre d'action à un plus large panel de microorganismes comme des pathogènes ou des microorganismes appartenant aux flores d'altération des aliments et même ouvrir vers d'autres domaines, comme la virologie, pour cerner de façon plus précise un contexte possible d'utilisation (agroalimentaire ou médical). L'identification des peptides contenus dans ces fractions a démontré la présence de plusieurs peptides. Ainsi, six peptides provenant de la β -lactoglobuline ont été identifiés ainsi qu'un peptide de l' α -lactalbumine. La comparaison avec la littérature met en lumière que six des sept peptides identifiés n'avaient jamais été reportés comme antimicrobiens. Il paraît nécessaire de passer par une étape de synthèse chimique pour déterminer l'activité

véritable de chacun des peptides identifiés. Il est tout à fait possible que l'activité soit due à l'activité de peptide par synergie même si le fait de fractionner les échantillons par HPLC réduit cette possibilité. En effet, pour que l'activité des fractions soit due à une synergie, il faudrait que les deux peptides se retrouvent dans la même fraction ce qui indiquerait qu'ils aient exactement la même hydrophobicité. La récupération de ces peptides s'avère être importante pour le secteur des produits laitiers car elle ouvre de nouvelles questions, notamment sur leur activité et leur stabilité dans différentes matrices, leur éventuelle toxicité, l'apparition de résistance bactérienne suite à leur utilisation, leur mode d'action etc.

En parallèle, la recherche de peptides antimicrobiens dans certains fromages a été effectuée, ce qui constitue une approche originale. Sachant qu'il existe des interactions métaboliques complexes entre les microorganismes présents dans les fromages, notamment lors de l'affinage, il semble pertinent de rechercher des peptides au sein de ces écosystèmes dont la nature diffère totalement des protéines lactiques purifiées ou non. Toutefois, cette voie rend l'approche beaucoup plus complexe, principalement dû au fait que la composition de la matrice est inconnue. Le choix des fromages a été fait en fonction des ferments utilisés et du mode de fabrication pour accroître les possibilités d'obtenir des fractions antimicrobiennes. L'activité antimicrobienne des fractions peptidiques de Mozzarella, Gouda, Suisse, Cheddar fort vieilli et Cheddar moyen a été évaluée. Les résultats obtenus ont montré la présence d'une activité antibactérienne dans les fractions de Mozzarella et de Gouda, qui sont les fromages les moins affinés parmi ceux sélectionnés. Cette activité semble limitée aux bactéries sensibles puisque la croissance des deux bactéries pathogènes testées n'a pas semblé être affectée par les fractions fromagères. Néanmoins, cette activité relativement faible peut s'expliquer assez facilement par le fait que les peptides actifs ne sont pas purs et ne peuvent donc pas exprimer leur potentiel antimicrobien au maximum. L'activité aurait probablement été plus importante avec des peptides purs et un fractionnement par HPLC aurait pu être fait pour purifier les peptides actifs et affiner l'activité. La possibilité que l'activité antimicrobienne soit la conséquence d'autres composés que les peptides a été envisagée, surtout que les fromages contiennent des composés tels que les acides organiques qui sont eux aussi antimicrobiens. Toutefois, la purification des fractions par Sep-pak réduit fortement cette possibilité, sans l'éliminer

complètement, car les acides organiques sont éliminés et l'activité maintenue. Un effet a également été observé pour toutes les fractions contre des spores de certains champignons sans toutefois se révéler antifongique. Là encore, l'utilisation de fractions peut limiter l'apparition d'une activité. Toutefois, le fait que certaines fractions soient actives contre des spores de champignons et non contre des bactéries dites sensibles pourrait sembler suspect car les activités antifongiques sont en générale plus difficile à obtenir. L'activité obtenue reste cependant minime puisque seul un retard de croissance est observé, ce qui semble bien insuffisant pour une utilisation quelconque. Toutefois, ce retard de croissance pourrait s'avérer suffisant pour favoriser l'implantation de bactéries utiles au dépend de souches fongiques indésirable et ne devrait donc pas être négligé. D'autre part, le fait que l'activité contre les spores soit souche dépendante ne permet pas de tirer de conclusion par rapport à un mécanisme d'action possible. Ce travail, bien que novateur, n'est malheureusement pas complètement abouti et nécessiterait des travaux supplémentaires. Naturellement, la nature exacte des composés actifs, leurs conditions optimales d'utilisation, leur spectre d'activité et leur mode d'action devrait être des priorités dans le cadre de projets futurs. Il faudrait également s'intéresser à l'impact de ces peptides sur le processus d'affinage des fromages et quels seraient les microorganismes impliqués. Toutefois, la complexité de la matrice rend la tâche extrêmement ardue mais pourrait, à terme, aboutir à des résultats très intéressants avec le développement de nouveaux fromages, enrichis en peptides, qui présenteraient des caractéristiques rhéologiques et microbiologiques modulables à volonté.

VI.2. Conclusion

Par conséquent, au terme de ce travail, il apparaît que des informations scientifiques originales ont été générées tout au long de notre étude. Ces connaissances, tant fondamentales qu'appliquées, avec la confirmation de la présence de peptides antimicrobiens dans les fromages, ouvrent des nouvelles perspectives pour une exploration plus approfondie de ce champ d'activité confirmant notre hypothèse de travail. De façon plus spécifique, la création d'une base de données va favoriser et grandement faciliter la recherche sur les AMPs laitiers. Les résultats obtenus relatifs à l'identification et à la caractérisation de nouveaux peptides antimicrobiens à partir d'un isolat de protéines du lactosérum semblent promis à un bel avenir car ces peptides présentent un potentiel

d'exploitation aussi bien dans le secteur agroalimentaire que pharmaceutique. Et quand bien même, les études sur les peptides isolés ici ne seraient pas poursuivies, l'approche expérimentale reste parfaitement valable avec d'autres produits initiaux. Les résultats obtenus à partir des fromages suffisent pour justifier l'intérêt porté aux peptides antimicrobiens principalement vis-à-vis du nombre de questions qu'ils soulèvent. Les industriels devront peut-être en tenir compte dans le futur. En conclusion, notre travail constitue une contribution importante à l'étude des peptides antimicrobiens provenant des protéines laitières.

Bibliographie

1. Mead, P.S., L. Slutsker, V. Dietz, L.F. McCaig, J.S. Bresee, C. Shapiro, P.M. Griffin, and R.V. Tauxe, *Food-related illness and death in the United States*. Emerging infectious diseases, 1999. **5**(5): p. 607-625.
2. Scallan, E., R.M. Hoekstra, F.J. Angulo, R.V. Tauxe, M.-A. Widdowson, S.L. Roy, J.L. Jones, and P.M. Griffin, *Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens*. Emerging infectious diseases, 2011. **17**(1): p. 7-15.
3. MAPAQ, *Bilan annuel. Toxi-infections alimentaires et plaintes requérant des prélèvements alimentaires*, 2007.
4. Parisien, A., B. Allain, J. Zhang, R. Mandeville, and C.Q. Lan, *Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides*. Journal of Applied Microbiology, 2008. **104**(1): p. 1-13.
5. Mercado, L., P. Schmitt, S.H. Marshall, and G. Arenas, *Gill tissues of the mussel *Mytilus edulis chilensis*: a new source for antimicrobial peptides*. Electronic Journal of Biotechnology, 2005. **8**.
6. Nedjar-Arroume, N., V. Dubois-Delval, E.Y. Adje, J. Traisnel, F. Krier, P. Mary, M. Kouach, G. Briand, and D. Guillochon, *Bovine hemoglobin: an attractive source of antibacterial peptides*. Peptides, 2008. **29**(6): p. 969-977.
7. Doyen, A., L. Beaulieu, L. Saucier, Y. Pouliot, and L. Bazinet, *Demonstration of in vitro anticancer properties of peptide fractions from a snow crab by-products hydrolysate after separation by electro-dialysis with ultrafiltration membranes*. Separation and Purification Technology, 2011. **78**(3): p. 321-329.
8. Megías, C., J. Pedroche, M.M. Yust, J. Girón-Calle, M. Alaiz, F. Millán, and J. Vioque, *Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin*. LWT - Food Science and Technology, 2008. **41**(10): p. 1973-1977.
9. Roblet, C., J. Amiot, C. Lavigne, A. Murette, M. Lessard, J. Jean, C. Ramassamy, C. Moresoli, and L. Bazinet, *Screening of in vitro bioactivities of a soy protein hydrolysate separated by hollow fiber and spiral-wound ultrafiltration membranes*. Food Research International, 2012. **46**(1): p. 237-249.
10. Taylor, S., J. Brock, C. Kruger, T. Berner, and M. Murphy, *Safety determination for the use of bovine milk-derived lactoferrin as a component of an antimicrobial beef carcass spray*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2004. **39**(1): p. 12-24.
11. Amiot, J., P. Angers, and L. Bazinet, *Science et technologie du lait: transformation du lait* 2nd ed, ed. C.L. Vignola. 2002, Montréal: Presses internationales Polytechnique
12. Brulé, G., J. Lenoir, and F. Remeuf, *La micelle de caséine et la coagulation du lait*, in *Le fromage: de la science à l'assurance qualité*, A. Eck and J.-C. Gillis, Editors. 1997, Lavoisier/TEC & DOC: Paris, New York. p. 891.
13. Horne, D.S., *Casein micelle structure: models and muddles*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2006. **11**(2-3): p. 148-153.

14. Kinsella, J.E. and D.M. Whitehead, *Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties*, in *Advances in Food and Nutrition Research*, J.E. Kinsella, Editor. 1989, Elsevier: Ithaca, New York. p. 458.
15. Morr, C.V. and E.Y.W. Ha, *Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1993. **33**(6): p. 431-476.
16. Caessens, P.W.J.R., W.F. Daamen, H. Gruppen, S. Visser, and A.G.J. Voragen, β -lactoglobulin hydrolysis. 2. *Peptide identification, SH/SS exchange, and functional properties of hydrolysate fractions formed by the action of plasmin*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999. **47**(8): p. 2980-2990.
17. Chatterton, D.E.W., G. Smithers, P. Roupas, and A. Brodkorb, *Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin--Technological implications for processing*. *International Dairy Journal*, 2006. **16**(11): p. 1229-1240.
18. Farrell Jr, H.M., R. Jimenez-Flores, G.T. Bleck, E.M. Brown, J.E. Butler, L.K. Creamer, C.L. Hicks, C.M. Hollar, K.F. Ng-Kwai-Hang, and H.E. Swaisgood, *Nomenclature of the proteins of cows' milk. Sixth revision*. *Journal of Dairy Science*, 2004. **87**(6): p. 1641-1674.
19. Pierce, A., D. Colavizza, M. Benaissa, P. Maes, A. Tartar, J. Montreuil, and G. Spik, *Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin*. *European Journal of Biochemistry*, 1991. **196**(1): p. 177-184.
20. Cals, M.-M., P. Maillart, G. Brignon, P. Anglade, and B.R. Dumas, *Primary structure of bovine lactoperoxidase, a fourth member of a mammalian heme peroxidase family*. *European Journal of Biochemistry*, 1991. **198**(3): p. 733-739.
21. Papiz, M.Z., L. Sawyer, E.E. Eliopoulos, A.C.T. North, J.B.C. Findlay, R. Sivaprasadarao, T.A. Jones, M.E. Newcomer, and P.J. Kraulis, *The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein*. *Nature*, 1986. **324**(6095): p. 383-385.
22. Caessens, P.W.J.R., S. Visser, H. Gruppen, and A.G.J. Voragen, *β -lactoglobulin hydrolysis. 1. Peptide composition and functional properties of hydrolysates obtained by the action of plasmin, trypsin, and Staphylococcus aureus V8 protease*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999. **47**(8): p. 2973-2979.
23. Stapelfeldt, H., P.H. Petersen, K.R. Kristiansen, K.B. Qvist, and L.H. Skibsted, *Effect of high hydrostatic pressure on the enzymic hydrolysis of β -lactoglobulin B by trypsin, thermolysin and pepsin*. *Journal of Dairy Research*, 1996. **63**(1): p. 111-118.
24. Zeece, M., T. Huppertz, and A. Kelly, *Effect of high-pressure treatment on in-vitro digestibility of β -lactoglobulin*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2008. **9**(1): p. 62-69.
25. Guo, M.R., P.F. Fox, A. Flynn, and P.S. Kindstedt, *Susceptibility of β -lactoglobulin and sodium caseinate to proteolysis by pepsin and trypsin*. *Journal of Dairy Science*, 1995. **78**(11): p. 2336-2344.
26. Polverino de Laureto, P., E. Scaramella, M. Frigo, F. Wondrich, V. De Filippis, M. Zambonin, and A. Fontana, *Limited proteolysis of bovine α -lactalbumin: isolation and characterization of protein domains*. *Protein Science*, 1999. **8**(11): p. 2290-2303.
27. Vogel, H.J., D.J. Schibli, W. Jing, E.M. Lohmeier-Vogel, R.F. Epand, and R.M. Epand, *Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related*

- tryptophan- and arginine-containing peptides*. *Biochemistry and Cell Biology*, 2002. **80**(1): p. 49-63.
28. Cheang, B. and A.L. Zydney, *Separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin using membrane ultrafiltration*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003. **83**(2): p. 201-209.
 29. McDonough, F.E., R.E. Hargrove, W.A. Mattingly, L.P. Posati, and J.A. Alford, *Composition and properties of whey protein concentrates from ultrafiltration*. *Journal of Dairy Science*, 1974. **57**(12): p. 1438-1443.
 30. Ye, X., S. Yoshida, and T.B. Ng, *Isolation of lactoperoxidase, lactoferrin, α -lactalbumin, β -lactoglobulin B and β -lactoglobulin A from bovine rennet whey using ion exchange chromatography*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2000. **32**(11-12): p. 1143-1150.
 31. Gurgel, P.V., R.G. Carbonell, and H.E. Swaisgood, *Fractionation of whey proteins with a hexapeptide ligand affinity resin*. *Bioseparation*, 2000. **9**(6): p. 385-392.
 32. Pierre, A. and J. Fauquant, *Principes pour un procédé industriel de fractionnement des protéines du lactosérum*. *Le Lait*, 1986. **66**(4): p. 405-419.
 33. Muller, A., G. Daufin, and B. Chaufer, *Ultrafiltration modes of operation for the separation of α -lactalbumin from acid casein whey*. *Journal of Membrane Science*, 1999. **153**(1): p. 9-21.
 34. Zydney, A.L., *Protein separations using membrane filtration: new opportunities for whey fractionation*. *International Dairy Journal*, 1998. **8**(3): p. 243-250.
 35. Papp, D., *Histoire des antibiotiques*. *Revue d'histoire des sciences et de leurs applications*, 1954: p. 124-138.
 36. Kong, K.-F., L. Schneper, and K. Mathee, *β -lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology*. *APMIS*, 2010. **118**(1): p. 1-36.
 37. Skarnes, R.C. and D.W. Watson, *Antimicrobial factors of normal tissues and fluids*. *Bacteriological Reviews*, 1957. **21**(4): p. 273-294.
 38. Fleming, A. and V.D. Allison, *Observations on a bacteriolytic substance (Lysozyme) found in secretions and tissues*. *British journal of experimental pathology*, 1922. **3**(5): p. 252-260.
 39. Jones, F.S. and H.S. Simms, *The bacterial growth inhibitor (lactenin) of milk*. *The Journal of Experimental Medicine*, 1930. **51**(2): p. 327-339.
 40. Bentley, R., *Different roads to discovery; Prontosil (hence sulfa drugs) and penicillin (hence β -lactams)*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2009. **36**(6): p. 775-786.
 41. Zeya, H.I. and J.K. Spitznagel, *Antibacterial and enzymic basic proteins from leukocyte lysosomes: separation and identification*. *Science*, 1963. **142**(3595): p. 1085-1087.
 42. Hultmark, D., H. Steiner, T. Rasmuson, and H.G. Boman, *Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora ceropia**. *European Journal of Biochemistry*, 1980. **106**(1): p. 7-16.
 43. Steiner, H., D. Hultmark, A. Engstrom, H. Bennich, and H.G. Boman, *Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity*. *Nature*, 1981. **292**(5820): p. 246-248.

44. Selsted, M.E., D.M. Brown, R.J. DeLange, and R.I. Lehrer, *Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages*. Journal of Biological Chemistry, 1983. **258**(23): p. 14485-9.
45. Zasloff, M., *Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1987. **84**(15): p. 5449-5453.
46. Sessa, G., J.H. Freer, G. Colacicco, and G. Weissmann, *Interaction of a lytic polypeptide, melittin, with lipid membrane systems*. Journal of Biological Chemistry, 1969. **244**(13): p. 3575-3582.
47. Hancock, R.E.W. and D.S. Chapple, *Peptide antibiotics*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999. **43**(6): p. 1317-1323.
48. Hancock, R.E.W., *The end of an era?* Nature Reviews Drug Discovery, 2007. **6**(1): p. 28-28.
49. Joerger, R.D., *Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages*. Poultry Science, 2003. **82**(4): p. 640-647.
50. Boman, H.G., *Antibacterial peptides: key components needed in immunity*. Cell, 1991. **65**(2): p. 205-207.
51. Lehrer, R.I. and T. Ganz, *Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence*. Current Opinion in Immunology, 1999. **11**(1): p. 23-27.
52. Zasloff, M., *Antibiotic peptides as mediators of innate immunity*. Current Biology, 1992. **2**(3): p. 133.
53. Boman, H.G., *Peptide antibiotics and their role in innate immunity*. Annual Review of Immunology, 1995. **13**(1): p. 61-92.
54. Gabay, J.E., *Ubiquitous natural antibiotics*. Science, 1994. **264**(5157): p. 373-374.
55. Boman, H.G., *Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: an update review*. Scandinavian Journal of Immunology, 1998. **48**(1): p. 15-25.
56. Boman, H.G., *Peptide antibiotics: holy or heretic grails of innate immunity?* Scandinavian Journal of Immunology, 1996. **43**(5): p. 475-482.
57. Nissen-Meyer, J. and I.F. Nes, *Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action*. Archives of Microbiology, 1997. **167**(2): p. 67-77.
58. Bulet, P., R. Stöcklin, and L. Menin, *Antimicrobial peptides: from invertebrates to vertebrates*. Immunological Reviews, 2004. **198**(1): p. 169-184.
59. O'Connor, E.M. and R.F. Shand, *Halocins and sulfolobocins: the emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2002. **28**(1): p. 23-31.
60. Boman, H.G., *Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts*. Journal of Internal Medicine, 2003. **254**(3): p. 197-215.
61. Hancock, R.E.W. and G. Diamond, *The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences*. Trends in Microbiology, 2000. **8**(9): p. 402-410.
62. Kimbrell, D.A. and B. Beutler, *The evolution and genetics of innate immunity*. Nature Reviews Genetics, 2001. **2**(4): p. 256-267.
63. Yeaman, M.R. and N.Y. Yount, *Unifying themes in host defence effector polypeptides*. Nature Reviews Microbiology, 2007. **5**(9): p. 727-740.

64. Zasloff, M., *Antimicrobial peptides of multicellular organisms*. Nature, 2002. **415**(6870): p. 389-395.
65. Ganz, T., M.E. Selsted, D. Szklarek, S.S. Harwig, K. Daher, D.F. Bainton, and R.I. Lehrer, *Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils*. The Journal of clinical investigation, 1985. **76**(4): p. 1427-35.
66. Ganz, T., A. Oren, and R.I. Lehrer, *Defensins: microbicidal and cytotoxic peptides of mammalian host defense cells*. Medical Microbiology and Immunology, 1992. **181**(2): p. 99-105.
67. Corzo, G., P. Escoubas, E. Villegas, K.J. Barnham, W. He, R.S. Norton, and T. Nakajima, *Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator**. Biochemical Journal, 2001. **359**(1): p. 35-45.
68. Yan, L. and M.E. Adams, *Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis**. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(4): p. 2059-2066.
69. Blondelle, S.E. and R.A. Houghten, *Hemolytic and antimicrobial activities of the twenty-four individual omission analogs of melittin*. Biochemistry, 1991. **30**(19): p. 4671-4678.
70. Kuhn-Nentwig, L., J. Müller, J. Schaller, A. Walz, M. Dathe, and W. Nentwig, *Cupiennin 1, a new family of highly basic antimicrobial peptides in the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae)*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(13): p. 11208-11216.
71. Ganz, T., *Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity*. Nature Reviews Immunology, 2003. **3**(9): p. 710-20.
72. Bellamy, W., M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, K. Kawase, and M. Tomita, *Identification of the bactericidal domain of lactoferrin*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1992. **1121**(1-2): p. 130-136.
73. Andreu, D. and L. Rivas, *Animal antimicrobial peptides: an overview*. Peptide Science, 1998. **47**(6): p. 415-433.
74. Tasiemski, A.I., F. Vandenbulcke, G. Mitta, J.r.m. Lemoine, C. Lefebvre, P.-E. Sautière, and M. Salzet, *Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid, the leech *Theromyzon tessulatum**. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(30): p. 30973-30982.
75. Brogden, K.A., *Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?* Nature Reviews Microbiology, 2005. **3**(3): p. 238-50.
76. Bulet, P., C. Hetru, J.-L. Dimarcq, and D.I. Hoffmann, *Antimicrobial peptides in insects; structure and function*. Developmental & Comparative Immunology, 1999. **23**(4-5): p. 329-344.
77. Dimarcq, J.-L., P. Bulet, C. Hetru, and J. Hoffmann, *Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates*. Peptide Science, 1998. **47**(6): p. 465-477.
78. Bals, R., *Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection*. Respiratory Research, 2000. **1**(3): p. 141-150.
79. Hancock, R.E.W. and R. Lehrer, *Cationic peptides: a new source of antibiotics*. Trends in Biotechnology, 1998. **16**(2): p. 82-88.

80. Tossi, A., L. Sandri, and A. Giangaspero, *Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides*. Peptide Science, 2000. **55**(1): p. 4-30.
81. Bechinger, B., *Structure and function of membrane-lytic peptides*. Critical Reviews in Plant Sciences, 2004. **23**(3): p. 271-292.
82. Bechinger, B., *The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1999. **1462**(1-2): p. 157-183.
83. Fox, R.O. and F.M. Richards, *A voltage-gated ion channel model inferred from the crystal structure of alamethicin at 1.5-Å resolution*. Nature, 1982. **300**(5890): p. 325-330.
84. Merrifield, R.B., L.D. Vizioli, and H.G. Boman, *Synthesis of the antibacterial peptide cecropin A(1-33)*. Biochemistry, 1982. **21**(20): p. 5020-5031.
85. Steiner, H., *Secondary structure of the cecropins: antibacterial peptides from the moth *Hyalophora cecropia**. FEBS Letters, 1982. **137**(2): p. 283-7.
86. Bechinger, B., M. Zasloff, and S.J. Opella, *Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Protein Science, 1993. **2**(12): p. 2077-2084.
87. Chen, H.-C., J.H. Brown, J.L. Morell, and C.M. Huang, *Synthetic magainin analogues with improved antimicrobial activity*. FEBS Letters, 1988. **236**(2): p. 462-466.
88. Wieprecht, T., M. Dathe, M. Schümann, E. Krause, M. Beyermann, and M. Bienert, *Conformational and functional study of magainin 2 in model membrane environments using the new approach of systematic double-D-amino acid replacement*. Biochemistry, 1996. **35**(33): p. 10844-10853.
89. Oren, Z., J. Hong, and Y. Shai, *A comparative study on the structure and function of a cytolytic α -helical peptide and its antimicrobial β -sheet diastereomer*. European Journal of Biochemistry, 1999. **259**(1-2): p. 360-369.
90. Ladokhin, A.S., M.E. Selsted, and S.H. White, *Bilayer interactions of indolicidin, a small antimicrobial peptide rich in tryptophan, proline, and basic amino acids*. Biophysical Journal, 1997. **72**(2, Part 1): p. 794-805.
91. McManus, A.M., L. Otvos, R. Hoffmann, and D.J. Craik, *Conformational studies by NMR of the antimicrobial peptide, drosocin, and its non-glycosylated derivative: effects of glycosylation on solution conformation*. Biochemistry, 1998. **38**(2): p. 705-714.
92. Staubitz, P., A. Peschel, W.F. Nieuwenhuizen, M. Otto, F. Götz, G. Jung, and R.W. Jack, *Structure-function relationships in the tryptophan-rich, antimicrobial peptide indolicidin*. Journal of Peptide Science, 2001. **7**(10): p. 552-564.
93. Futaki, S., T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, and Y. Sugiura, *Arginine-rich peptides*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(8): p. 5836-5840.
94. Epand, R.M. and H.J. Vogel, *Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1999. **1462**(1-2): p. 11-28.
95. Kondejewski, L.H., S.W. Farmer, D.S. Wishart, C.M. Kay, R.E.W. Hancock, and R.S. Hodges, *Modulation of structure and antibacterial and hemolytic activity by ring size in cyclic gramicidin S analogs*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(41): p. 25261-25268.

96. Gibbs, A.C., L.H. Kondejewski, W. Gronwald, A.M. Nip, R.S. Hodges, B.D. Sykes, and D.S. Wishart, *Unusual β -sheet periodicity in small cyclic peptides*. Nature structural biology, 1998. **5**(4): p. 284-288.
97. Hwang, P.M., N. Zhou, X. Shan, C.H. Arrowsmith, and H.J. Vogel, *Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin*. Biochemistry, 1998. **37**(12): p. 4288-4298.
98. Oren, Z. and Y. Shai, *Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides*. Peptide Science, 1998. **47**(6): p. 451-463.
99. Sablon, E., B. Contreras, and E. Vandamme, *Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. New products and new areas of bioprocess engineering*, in *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. 2000, Springer Berlin / Heidelberg. p. 21-60.
100. Tasiemski, A., D. Schikorski, F. Le Marrec-Croq, C. Pontoire-Van Camp, C. Boidin-Wichlacz, and P.-E. Sautière, *Hedistin: a novel antimicrobial peptide containing bromotryptophan constitutively expressed in the NK cells-like of the marine annelid, Nereis diversicolor*. Developmental & Comparative Immunology, 2007. **31**(8): p. 749-762.
101. Strøm, M.B., B.E. Haug, Ø. Rekdal, M.L. Skar, W. Stensen, and J.S. Svendsen, *Important structural features of 15-residue lactoferricin derivatives and methods for improvement of antimicrobial activity*. Biochemistry and Cell Biology, 2002. **80**(1): p. 65-74.
102. Reddy, K.V.R., R.D. Yedery, and C. Aranha, *Antimicrobial peptides: premises and promises*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2004. **24**(6): p. 536-547.
103. Kim, H.S., H. Yoon, I. Minn, C.B. Park, W.T. Lee, M. Zasloff, and S.C. Kim, *Pepsin-mediated processing of the cytoplasmic histone H2A to strong antimicrobial peptide buforin I*. The Journal of Immunology, 2000. **165**(6): p. 3268-3274.
104. Hancock, R.E.W. and M.G. Scott, *The role of antimicrobial peptides in animal defenses*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(16): p. 8856-8861.
105. Brogden, K.A., A.J. De Lucca, J. Bland, and S. Elliott, *Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for Pasteurella haemolytica*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(1): p. 412-416.
106. Harris, F., S.R. Dennison, and D.A. Phoenix, *Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms*. Current Protein and Peptide Science, 2009. **10**(6): p. 585-606.
107. Dashper, S.G., N.M. O'Brien-Simpson, K.J. Cross, R.A. Paolini, B. Hoffmann, D.V. Catmull, M. Malkoski, and E.C. Reynolds, *Divalent metal cations increase the activity of the antimicrobial peptide kappacin*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005. **49**(6): p. 2322-2328.
108. Lai, R., H. Liu, W. Hui Lee, and Y. Zhang, *An anionic antimicrobial peptide from toad Bombina maxima*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002. **295**(4): p. 796-799.
109. Yount, N.Y., A.S. Bayer, Y.Q. Xiong, and M.R. Yeaman, *Advances in antimicrobial peptide immunobiology*. Peptide Science, 2006. **84**(5): p. 435-458.

110. Peschel, A. and H.-G. Sahl, *The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance*. Nature Reviews Microbiology, 2006. **4**(7): p. 529-536.
111. Huang, H.W., *Action of antimicrobial peptides: a two-state model*. Biochemistry, 2000. **39**(29): p. 8347-8352.
112. Bechinger, B. and K. Lohner, *Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2006. **1758**(9): p. 1529-1539.
113. Bechinger, B., *Rationalizing the membrane interactions of cationic amphipathic antimicrobial peptides by their molecular shape*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2009. **14**(5): p. 349-355.
114. Baumann, G. and P. Mueller, *A molecular model of membrane excitability*. Journal of Supramolecular Structure, 1974. **2**(5-6): p. 538-557.
115. Shai, Y., *Mode of action of membrane active antimicrobial peptides*. Peptide Science, 2002. **66**(4): p. 236-248.
116. Ludtke, S.J., K. He, W.T. Heller, T.A. Harroun, L. Yang, and H.W. Huang, *Membrane pores induced by magainin 2*. Biochemistry, 1996. **35**(43): p. 13723-13728.
117. Matsuzaki, K., O. Murase, N. Fujii, and K. Miyajima, *An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation*. Biochemistry, 1996. **35**(35): p. 11361-11368.
118. Yang, L., T.A. Harroun, T.M. Weiss, L. Ding, and H.W. Huang, *Barrel-stave model or toroidal model ? A case study on melittin pores*. Biophysical Journal, 2001. **81**(3): p. 1475-1485.
119. Leontiadou, H., A.E. Mark, and S.J. Marrink, *Antimicrobial peptides in action*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(37): p. 12156-12161.
120. Rzepiela, A.J., D. Sengupta, N. Goga, and S.J. Marrink, *Membrane poration by antimicrobial peptides combining atomistic and coarse-grained descriptions*. Faraday Discussions, 2010. **144**: p. 431-443.
121. Pouny, Y., D. Rapaport, A. Mor, P. Nicolas, and Y. Shai, *Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogs with phospholipid membranes*. Biochemistry, 1992. **31**(49): p. 12416-12423.
122. Lopez, C.F., S.O. Nielsen, G. Srinivas, W.F. DeGrado, and M.L. Klein, *Probing membrane insertion activity of antimicrobial polymers via coarse-grain molecular dynamics*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2006. **2**(3): p. 649-655.
123. Briolat, J., S.D. Wu, S.K. Mahata, B. Gonthier, D. Bagnard, S. Chasserot-Golaz, K.B. Helle, D. Aunis, and M.H. Metz-Boutigue, *New antimicrobial activity for the catecholamine release-inhibitory peptide from chromogranin A*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2005. **62**(3): p. 377-385.
124. Park, C.B., K.-S. Yi, K. Matsuzaki, M.S. Kim, and S.C. Kim, *Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(15): p. 8245-8250.
125. Nicolas, P., *Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides*. FEBS Journal, 2009. **276**(22): p. 6483-6496.
126. Hsu, C.-H., C. Chen, M.-L. Jou, A.Y.-L. Lee, Y.-C. Lin, Y.-P. Yu, W.-T. Huang, and S.-H. Wu, *Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial*

- peptide, indolicidin: evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA.* Nucleic Acids Research, 2005. **33**(13): p. 4053-4064.
127. De Lucca, A.J. and T.J. Walsh, *Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999. **43**(1): p. 1-11.
 128. Debono, M. and R.S. Gordee, *Antibiotics that inhibit fungal cell wall development.* Annual Review of Microbiology, 1994. **48**(1): p. 471-497.
 129. Georgopapadakou, N.H. and J.S. Tkacz, *The fungal cell wall as a drug target.* Trends in Microbiology, 1995. **3**(3): p. 98-104.
 130. Park, C.H., E.V. Valore, A.J. Waring, and T. Ganz, *Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(11): p. 7806-7810.
 131. Fehlbauer, P., P. Bulet, L. Michaut, M. Lagueux, W.F. Broekaert, C. Hetru, and J.A. Hoffmann, *Insect immunity. Septic injury of Drosophila induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides.* Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(52): p. 33159-33163.
 132. Aerts, A., I. François, B. Cammue, and K. Thevissen, *The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins.* Cellular and Molecular Life Sciences, 2008. **65**(13): p. 2069-2079.
 133. Helmerhorst, E.J., P. Breeuwer, W. van't Hof, E. Walgreen-Weterings, L.C.J.M. Oomen, E.C.I. Veerman, A.V.N. Amerongen, and T. Abee, *The cellular target of histatin 5 on Candida albicans is the energized mitochondrion.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(11): p. 7286-7291.
 134. Luque-Ortega, J.R.n., W.v.t. Hof, E.C.I. Veerman, J.M. Saugar, and L. Rivas, *Human antimicrobial peptide histatin 5 is a cell-penetrating peptide targeting mitochondrial ATP synthesis in Leishmania.* The FASEB Journal, 2008. **22**(6): p. 1817-1828.
 135. Yamauchi, K., M. Tomita, T.J. Giehl, and R.T. Ellison, *Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment.* Infection and Immunity, 1993. **61**(2): p. 719-728.
 136. Muñoz, A. and J. Marcos, *Activity and mode of action against fungal phytopathogens of bovine lactoferricin-derived peptides.* Journal of Applied Microbiology, 2006. **101**(6): p. 1199-1207.
 137. Chapple, D.S., D.J. Mason, C.L. Joannou, E.W. Odell, V. Gant, and R.W. Evans, *Structure-Function Relationship of Antibacterial Synthetic Peptides Homologous to a Helical Surface Region on Human Lactoferrin against Escherichia coli Serotype O111.* Infection and Immunity, 1998. **66**(6): p. 2434-2440.
 138. Aguilera, O., H. Ostolaza, L.M. Quirós, and J.F. Fierro, *Permeabilizing action of an antimicrobial lactoferricin-derived peptide on bacterial and artificial membranes.* FEBS Letters, 1999. **462**(3): p. 273-277.
 139. López-Expósito, I., L. Amigo, and I. Recio, *Identification of the initial binding sites of as2-casein f(183-207) and effect on bacterial membranes and cell morphology.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2008. **1778**(10): p. 2444-2449.

140. Ulvatne, H., H.H. Haukland, Ø. Olsvik, and L.H. Vorland, *Lactoferricin B causes depolarization of the cytoplasmic membrane of Escherichia coli ATCC 25922 and fusion of negatively charged liposomes*. FEBS Letters, 2001. **492**(1–2): p. 62-65.
141. van der Kraan, M.I.A., J. van Marle, K. Nazmi, J. Groenink, W. van 't Hof, E.C.I. Veerman, J.G.M. Bolscher, and A.V.N. Amerongen, *Ultrastructural effects of antimicrobial peptides from bovine lactoferrin on the membranes of Candida albicans and Escherichia coli*. Peptides, 2005. **26**(9): p. 1537-1542.
142. Wakabayashi, H., T. Hiratani, K. Uchida, and H. Yamaguchi, *Antifungal spectrum and fungicidal mechanism of an N-terminal peptide of bovine lactoferrin*. Journal of Infection and Chemotherapy, 1996. **1**(3): p. 185-189.
143. Bellamy, W., H. Wakabayashi, M. Takase, K. Kawase, S. Shimamura, and M. Tomita, *Killing of Candida albicans by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin*. Medical Microbiology and Immunology, 1993. **182**(2): p. 97-105.
144. Bellamy, W., K. Yamauchi, H. Wakabayashi, M. Takase, N. Takakura, S. Shimamura, and M. Tomita, *Antifungal properties of lactoferricin B, a peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin*. Letters in Applied Microbiology, 1994. **18**(4): p. 230-233.
145. Malkoski, M., S.G. Dashper, N.M. O'Brien-Simpson, G.H. Talbo, M. Macris, K.J. Cross, and E.C. Reynolds, *Kappacin, a Novel Antibacterial Peptide from Bovine Milk*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001. **45**(8): p. 2309-2315.
146. Campagna, S., P. Cosette, G. Molle, and J.L. Gaillard, *Evidence for membrane affinity of the C-terminal domain of bovine milk PP3 component*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2001. **1513**(2): p. 217-222.
147. Barzyk, W., S. Campagna, K. Więclaw, B. Korchowiec, and E. Rogalska, *The affinity of two antimicrobial peptides derived from bovine milk proteins for model lipid membranes*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2009. **343**(1–3): p. 104-110.
148. Park, T.-J., J.-S. Kim, H.-C. Ahn, and Y. Kim, *Solution and Solid-State NMR Structural Studies of Antimicrobial Peptides LPcin-I and LPcin-II*. Biophysical Journal, 2011. **101**(5): p. 1193-1201.
149. Pedersen, L.R.L., J.G. Hansted, S.B. Nielsen, T.E. Petersen, U.S. Sørensen, D. Otzen, and E.S. Sørensen, *Proteolytic activation of proteose peptone component 3 by release of a C-terminal peptide with antibacterial properties*. Journal of Dairy Science, 2012. **95**(6): p. 2819-2829.
150. Haney, E.F., F. Lau, and H.J. Vogel, *Solution structures and model membrane interactions of lactoferrampin, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2007. **1768**(10): p. 2355-2364.
151. Haney, E.F., K. Nazmi, F. Lau, J.G.M. Bolscher, and H.J. Vogel, *Novel lactoferrampin antimicrobial peptides derived from human lactoferrin*. Biochimie, 2009. **91**(1): p. 141-154.
152. Haukland, H.H., H. Ulvatne, K. Sandvik, and L.H. Vorland, *The antimicrobial peptides lactoferricin B and magainin 2 cross over the bacterial cytoplasmic membrane and reside in the cytoplasm*. FEBS Letters, 2001. **508**(3): p. 389-393.

153. Ulvatne, H., Ø. Samuelsen, H.H. Haukland, M. Krämer, and L.H. Vorland, *Lactoferricin B inhibits bacterial macromolecular synthesis in Escherichia coli and Bacillus subtilis*. FEMS Microbiology Letters, 2004. **237**(2): p. 377-384.
154. Ho, Y.-H., T.-C. Sung, and C.-S. Chen, *Lactoferricin B inhibits the phosphorylation of the two-component system response regulators BasR and CreB*. Molecular & Cellular Proteomics, 2011.
155. Tu, Y.-H., Y.-H. Ho, Y.-C. Chuang, P.-C. Chen, and C.-S. Chen, *Identification of Lactoferricin B Intracellular Targets Using an Escherichia coli Proteome Chip*. PLoS ONE, 2011. **6**(12): p. e28197.
156. Viejo-Díaz, M., M.T. Andrés, J. Pérez-Gil, M. Sánchez, and J.F. Fierro, *Potassium Efflux Induced by a New Lactoferrin-Derived Peptide Mimicking the Effect of Native Human Lactoferrin on the Bacterial Cytoplasmic Membrane*. Biochemistry (Moscow), 2003. **68**(2): p. 217-227.
157. Viejo-Díaz, M., M.T. Andrés, and J.F. Fierro, *Different Anti-Candida Activities of Two Human Lactoferrin-Derived Peptides, Lfpep and Kaliocin-1*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005. **49**(7): p. 2583-2588.
158. Yount, N.Y., M.T. Andrés, J.F. Fierro, and M.R. Yeaman, *The γ -core motif correlates with antimicrobial activity in cysteine-containing kaliocin-1 originating from transferrins*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2007. **1768**(11): p. 2862-2872.
159. Andrä, J., K. Lohner, S.E. Blondelle, R. Jerala, I. Moriyon, M.H.J. Koch, P. Garidel, and K. Brandenburg, *Enhancement of endotoxin neutralization by coupling of a C12-alkyl chain to a lactoferricin-derived peptide*. Biochem. J., 2005. **385**(1): p. 135-143.
160. Rietschel, E.T., T. Kirikae, F.U. Schade, U. Mamat, G. Schmidt, H. Loppnow, A.J. Ulmer, U. Zähringer, U. Seydel, and F. Di Padova, *Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function*. The FASEB Journal, 1994. **8**(2): p. 217-25.
161. Farnaud, S., C. Spiller, L.C. Moriarty, A. Patel, V. Gant, E.W. Odell, and R.W. Evans, *Interactions of lactoferricin-derived peptides with LPS and antimicrobial activity*. FEMS Microbiology Letters, 2004. **233**(2): p. 193-199.
162. Zhang, G.-H., D.M. Mann, and C.-M. Tsai, *Neutralization of Endotoxin In Vitro and In Vivo by a Human Lactoferrin-Derived Peptide*. Infection and Immunity, 1999. **67**(3): p. 1353-1358.
163. Lahov, E. and W. Regelson, *Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: Casecidin, isracidin peptides*. Food and Chemical Toxicology, 1996. **34**(1): p. 131-145.
164. Nibbering, P.H., E. Ravensbergen, M.M. Welling, L.A. van Berkel, P.H.C. van Berkel, E.K.J. Pauwels, and J.H. Nuijens, *Human Lactoferrin and Peptides Derived from Its N Terminus Are Highly Effective against Infections with Antibiotic-Resistant Bacteria*. Infection and Immunity, 2001. **69**(3): p. 1469-1476.
165. López-Expósito, I., A. Pellegrini, L. Amigo, and I. Recio, *Synergistic Effect Between Different Milk-Derived Peptides and Proteins*. Journal of Dairy Science, 2008. **91**(6): p. 2184-2189.
166. Lupetti, A., A. Paulusma-Annema, M.M. Welling, H. Dogterom-Ballering, C.P.J.M. Brouwer, S. Senesi, J.T. van Dissel, and P.H. Nibbering, *Synergistic Activity of the*

- N-Terminal Peptide of Human Lactoferrin and Fluconazole against Candida Species*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003. **47**(1): p. 262-267.
167. Tanida, T., T. Okamoto, E. Ueta, T. Yamamoto, and T. Osaki, *Antimicrobial peptides enhance the candidacidal activity of antifungal drugs by promoting the efflux of ATP from Candida cells*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006. **57**(1): p. 94-103.
168. Flores-Villaseñor, H., A. Canizalez-Román, M. Reyes-Lopez, K. Nazmi, M. de la Garza, J. Zazueta-Beltrán, N. León-Sicaños, and J. Bolscher, *Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFcin, LFampin and LFchimera on antibiotic-resistant Staphylococcus aureus and Escherichia coli*. BioMetals, 2010. **23**(3): p. 569-578.
169. Facon, M.J. and B.J. Skura, *Antibacterial activity of lactoferricin, lysozyme and EDTA against Salmonella enteritidis*. International Dairy Journal, 1996. **6**(3): p. 303-313.
170. Vorland, L.H., S.A. Osbakk, T. Perstolen, H. Ulvatne, Ø. Rekdal, J.S. Svendsen, and T.J. Gutteberg, *Interference of the Antimicrobial Peptide Lactoferricin B with the Action of Various Antibiotics against Escherichia coli and Staphylococcus aureus*. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 1999. **31**(2): p. 173-177.
171. Oo, T.Z., N. Cole, L. Garthwaite, M.D.P. Willcox, and H. Zhu, *Evaluation of synergistic activity of bovine lactoferricin with antibiotics in corneal infection*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010. **65**(6): p. 1243-1251.
172. Longhi, C., M. Marazzato, M.P. Conte, V. Iebba, S. Schippa, L. Seganti, and A. Comanducci, *Effect of lactoferricin on fluoroquinolone susceptibility of uropathogenic Escherichia coli*. J Antibiot, 2009. **62**(2): p. 109-111.
173. Liu, Y., F. Han, Y. Xie, and Y. Wang, *Comparative antimicrobial activity and mechanism of action of bovine lactoferricin-derived synthetic peptides*. BioMetals, 2011. **24**(6): p. 1069-1078.
174. Wakabayashi, H., S. Teraguchi, and Y. Tamura, *Increased Staphylococcus-killing Activity of an Antimicrobial Peptide, Lactoferricin B, with Minocycline and Monoacylglycerol*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2002. **66**(10): p. 2161-2167.
175. Leon-Sicaños, N., M. Reyes-Lopez, C. Ordaz-Pichardo, and M. de la Garza, *Microbicidal action of lactoferrin and lactoferricin and their synergistic effect with metronidazole in Entamoeba histolytica*. Biochemistry and Cell Biology, 2006. **84**(3): p. 327-336.
176. Wakabayashi, H., S. Abe, T. Okutomi, S. Tansho, K. Kawase, and H. Yamaguchi, *Cooperative anti-Candida effects of lactoferrin or its peptides in combination with azole antifungal agents*. Microbiology and immunology, 1996. **40**(11): p. 821-825.
177. Wakabayashi, H., S. Abe, S. Teraguchi, H. Hayasawa, and H. Yamaguchi, *Inhibition of Hyphal Growth of Azole-Resistant Strains of Candida albicans by Triazole Antifungal Agents in the Presence of Lactoferrin-Related Compounds*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998. **42**(7): p. 1587-1591.
178. Masschalck, B., R. Van Houdt, and C.W. Michiels, *High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin*. International Journal of Food Microbiology, 2001. **64**(3): p. 325-332.
179. Vorland, L.H., H. Ulvatne, J. Andersen, H.H. Haukland, Ø. Rekdal, J.S. Svendsen, and T.J. Gutteberg, *Antibacterial Effects of Lactoferricin B*. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 1999. **31**(2): p. 179-184.

180. Wakabayashi, H., H. Matsumoto, K. Hashimoto, S. Teraguchi, M. Takase, and H. Hayasawa, *N-acylated and D enantiomer derivatives of a nonamer core peptide of lactoferricin B showing improved antimicrobial activity*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999. **43**(5): p. 1267-1269.
181. Strøm, M.B., Ø. Rekdal, and J.S. Svendsen, *The effects of charge and lipophilicity on the antibacterial activity of undecapeptides derived from bovine lactoferricin*. *Journal of Peptide Science*, 2002. **8**(1): p. 36-43.
182. Majerle, A., J. Kidrič, and R. Jerala, *Enhancement of antibacterial and lipopolysaccharide binding activities of a human lactoferrin peptide fragment by the addition of acyl chain*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003. **51**(5): p. 1159-1165.
183. Tomita, M., M. Takase, W. Bellamy, and S. Shimamura, *A review: The active peptide of lactoferrin*. *Pediatrics International*, 1994. **36**(5): p. 585-591.
184. Haug, B.E., M.L. Skar, and J.S. Svendsen, *Bulky aromatic amino acids increase the antibacterial activity of 15-residue bovine lactoferricin derivatives*. *Journal of Peptide Science*, 2001. **7**(8): p. 425-432.
185. Haug, B.E., M.B. Strom, and J.S. M. Svendsen, *The Medicinal Chemistry of Short Lactoferricin-Based Antibacterial Peptides*. *Current Medicinal Chemistry*, 2007. **14**(1): p. 1-18.
186. Lejon, T., T. Stiberg, M.B. Strøm, and J.S. Svendsen, *Prediction of antibiotic activity and synthesis of new pentadecapeptides based on lactoferricins*. *Journal of Peptide Science*, 2004. **10**(6): p. 329-335.
187. Håversen, L., N. Kondori, L. Baltzer, L.Å. Hanson, G.T. Dolphin, K. Dunér, and I. Mattsby-Baltzer, *Structure-Microbicidal Activity Relationship of Synthetic Fragments Derived from the Antibacterial α -Helix of Human Lactoferrin*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010. **54**(1): p. 418-425.
188. Strøm, M.B., W. Stensen, J.S. Svendsen, and Ø. Rekdal, *Increased antibacterial activity of 15-residue murine lactoferricin derivatives*. *The Journal of Peptide Research*, 2001. **57**(2): p. 127-139.
189. Bolscher, J.G.M., R. Adão, K. Nazmi, P.A.M. van den Keybus, W. van 't Hof, A.V. Nieuw Amerongen, M. Bastos, and E.C.I. Veerman, *Bactericidal activity of LFchimera is stronger and less sensitive to ionic strength than its constituent lactoferricin and lactoferrampin peptides*. *Biochimie*, 2009. **91**(1): p. 123-132.
190. Xu, G., W. Xiong, Q. Hu, P. Zuo, B. Shao, F. Lan, X. Lu, Y. Xu, and S. Xiong, *Lactoferrin-derived peptides and Lactoferricin chimera inhibit virulence factor production and biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*, 2010. **109**(4): p. 1311-1318.
191. Azuma, M., C.A. Del Carpio, T. Kojima, I. Yokoyama, H. Tajiri, K. Yoshikawa, and S. Saga, *Antibacterial activity of multiple antigen peptides homologous to a loop region in human lactoferrin*. *The Journal of Peptide Research*, 1999. **54**(3): p. 237-241.
192. Haug, B.E., J. Andersen, Ø. Rekdal, and J.S. Svendsen, *Synthesis of a 2-arylsulphonylated tryptophan: the antibacterial activity of bovine lactoferricin peptides containing Trp(2-Pmc)*. *Journal of Peptide Science*, 2002. **8**(7): p. 307-313.

193. Haug, B.E. and J.S. Svendsen, *The role of tryptophan in the antibacterial activity of a 15-residue bovine lactoferricin peptide*. Journal of Peptide Science, 2001. **7**(4): p. 190-196.
194. Strøm, M.B., J.S. Svendsen, and Ø. Rekdal, *Antibacterial activity of 15-residue lactoferricin derivatives*. The Journal of Peptide Research, 2000. **56**(5): p. 265-274.
195. Bolscher, J.G.M., K. Nazmi, J. van Marle, W. van 't Hof, and E. Veerman, *Chimerization of lactoferricin and lactoferrampin peptides strongly potentiates the killing activity against Candida albicans*. Biochemistry and Cell Biology, 2012. **90**(3): p. 378-388.
196. López-Soto, F., N. León-Sicairos, K. Nazmi, J. Bolscher, and M. de la Garza, *Microbicidal effect of the lactoferrin peptides Lactoferricin17–30, Lactoferrampin265–284, and Lactoferrin chimera on the parasite Entamoeba histolytica*. BioMetals, 2010. **23**(3): p. 563-568.
197. Groisman, E.A., C. Parra-Lopez, M. Salcedo, C.J. Lipps, and F. Heffron, *Resistance to host antimicrobial peptides is necessary for Salmonella virulence*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(24): p. 11939-11943.
198. Perron, G.G., M. Zasloff, and G. Bell, *Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide*. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2006. **273**(1583): p. 251-256.
199. Zhang, L., J. Parente, S.M. Harris, D.E. Woods, R.E.W. Hancock, and T.J. Falla, *Antimicrobial peptide therapeutics for cystic fibrosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005. **49**(7): p. 2921-2927.
200. Yeaman, M.R. and N.Y. Yount, *Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance*. Pharmacological Reviews, 2003. **55**(1): p. 27-55.
201. Gyurko, C., U. Lendenmann, R.F. Troxler, and F.G. Oppenheim, *Candida albicans mutants deficient in respiration are resistant to the small cationic salivary antimicrobial peptide histatin 5*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000. **44**(2): p. 348-354.
202. Guina, T., E.C. Yi, H. Wang, M. Hackett, and S.I. Miller, *A PhoP-regulated outer membrane protease of Salmonella enterica serovar typhimurium promotes resistance to α -helical antimicrobial peptides*. Journal of Bacteriology, 2000. **182**(14): p. 4077-4086.
203. Schmidtchen, A., I.-M. Frick, E. Andersson, H. Tapper, and L. Björck, *Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37*. Molecular Microbiology, 2002. **46**(1): p. 157-168.
204. Stumpe, S., R. Schmid, D.L. Stephens, G. Georgiou, and E.P. Bakker, *Identification of OmpT as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 1998. **180**(15): p. 4002-4006.
205. Shinnar, A.E., K.L. Butler, and H.J. Park, *Cathelicidin family of antimicrobial peptides: proteolytic processing and protease resistance*. Bioorganic Chemistry, 2003. **31**(6): p. 425-436.
206. Kraus, D. and A. Peschel, *Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial peptides*, in *Antimicrobial peptides and human disease*, W.M. Shafer, Editor. 2006, Springer Berlin Heidelberg. p. 231-250.

207. Fernie-King, B.A., D.J. Seilly, and P.J. Lachmann, *The interaction of streptococcal inhibitor of complement (SIC) and its proteolytic fragments with the human β defensins*. Immunology, 2004. **111**(4): p. 444-452.
208. Silverstein, K.A.T., M.A. Graham, T.D. Paape, and K.A. VandenBosch, *Genome organization of more than 300 defensin-like genes in Arabidopsis*. Plant Physiology, 2005. **138**(2): p. 600-610.
209. Campos, M.A., M.A. Vargas, V. Regueiro, C.M. Llompарт, S. Albertí, and J.A. Bengoechea, *Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides*. Infection and Immunity, 2004. **72**(12): p. 7107-7114.
210. Llobet, E., J.M. Tomás, and J.A. Bengoechea, *Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides*. Microbiology, 2008. **154**(12): p. 3877-3886.
211. Gruenheid, S. and H. Le Moual, *Resistance to antimicrobial peptides in Gram-negative bacteria*. FEMS Microbiology Letters, 2012. **330**(2): p. 81-89.
212. Jones, A., M. Geörg, L. Maudsdotter, and A.-B. Jonsson, *Endotoxin, capsule, and bacterial attachment contribute to Neisseria meningitidis resistance to the human antimicrobial peptide LL-37*. Journal of Bacteriology, 2009. **191**(12): p. 3861-3868.
213. Nizet, V., *Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens*. Current Issues in Molecular Biology, 2006. **8**(1): p. 11-26.
214. Ernst, R.K., E.C. Yi, L. Guo, K.B. Lim, J.L. Burns, M. Hackett, and S.I. Miller, *Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway Pseudomonas aeruginosa*. Science, 1999. **286**(5444): p. 1561-1565.
215. Nummila, K., I. Kilpeläinen, U. Zähringer, M. Vaara, and I.M. Helander, *Lipopolysaccharides of polymyxin B-resistant mutants of Escherichia coli are extensively substituted by 2-aminoethyl pyrophosphate and contain aminoarabinose in lipid A*. Molecular Microbiology, 1995. **16**(2): p. 271-278.
216. Zhou, Z., S. Lin, R.J. Cotter, and C.R.H. Raetz, *Lipid A modifications characteristic of Salmonella typhimurium are induced by NH₄VO₃ in Escherichia coli K12*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(26): p. 18503-18514.
217. Kristian, S.A., V. Datta, C. Weidenmaier, R. Kansal, I. Fedtke, A. Peschel, R.L. Gallo, and V. Nizet, *D-alanylation of teichoic acids promotes group A Streptococcus antimicrobial peptide resistance, neutrophil survival, and epithelial cell invasion*. Journal of Bacteriology, 2005. **187**(19): p. 6719-6725.
218. Peschel, A., *How do bacteria resist human antimicrobial peptides?* Trends in Microbiology, 2002. **10**(4): p. 179-186.
219. Guo, L., K.B. Lim, C.M. Poduje, M. Daniel, J.S. Gunn, M. Hackett, and S.I. Miller, *Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides*. Cell, 1998. **95**(2): p. 189-198.
220. Jacob, L. and M. Zasloff, *Potential therapeutic applications of magainins and other antimicrobial agents of animal origin*, in *Antimicrobial peptides*. 1994, CIBA Foundation Symposium.
221. Lamb, H.M. and L.R. Wiseman, *Pexiganan acetate*. Drugs, 1998. **56**(6): p. 1047-1052.
222. Lipsky, B.A., K.J. Holroyd, and M. Zasloff, *Topical versus systemic antimicrobial therapy for treating mildly infected diabetic foot ulcers: a randomized, controlled,*

- double-blinded, multicenter trial of pexiganan cream*. Clinical Infectious Diseases, 2008. **47**(12): p. 1537-1545.
223. Andrés, E. and J.L. Dimarcq, *Cationic antimicrobial peptides: from innate immunity study to drug development*. Up date. Medecine et maladies infectieuses, 2007. **37**(4): p. 194-199.
224. Dashper, S.G., S. Liu, and E.C. Reynolds, *Antimicrobial peptides and their potential as oral therapeutic agents*. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2007. **13**(4): p. 505-516.
225. Reynolds, E.C., S.G. Dashper, N.M. O'Brien-Simpson, G.H. Talbo, and M. Malkoski, *Antimicrobial peptides*, 2009, The University of Melbourne.
226. Reynolds, E.C., S.G. Dashper, and R.A. Paolini, *Antimicrobial composition 2012*, Dairy Australia Limited.
227. van der Velden, W., T. van Iersel, N. Blijlevens, and J. Donnelly, *Safety and tolerability of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 (hLF1-11)*. BMC Medicine, 2009. **7**(1): p. 1-8.
228. Brouwer, C.P.J.M., M. Rahman, and M.M. Welling, *Discovery and development of a synthetic peptide derived from lactoferrin for clinical use*. Peptides, 2011. **32**(9): p. 1953-1963.
229. Faber, C., H.P. Stallmann, D.M. Lyaruu, U. Joosten, C. von Eiff, A. van Nieuw Amerongen, and P.I.J.M. Wuisman, *Comparable efficacies of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 and gentamicin in a chronic methicillin-resistant Staphylococcus aureus osteomyelitis model*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005. **49**(6): p. 2438-2444.
230. Stallmann, H.P., C. Faber, A.L.J.J. Bronckers, A.V. Nieuw Amerongen, and P.I.J.M. Wuisman, *Osteomyelitis prevention in rabbits using antimicrobial peptide hLF1-11- or gentamicin-containing calcium phosphate cement*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2004. **54**(2): p. 472-476.
231. Teraguchi, S., K. Shin, K. Ozawa, S. Nakamura, Y. Fukuwatari, S. Tsuyuki, H. Namihira, and S. Shimamura, *Bacteriostatic effect of orally administered bovine lactoferrin on proliferation of Clostridium species in the gut of mice fed bovine milk*. Applied and Environmental Microbiology, 1995. **61**(2): p. 501-6.
232. Håversen, L., I. Engberg, L. Baltzer, G. Dolphin, L.Å. Hanson, and I. Mattsby-Baltzer, *Human Lactoferrin and Peptides Derived from a Surface-Exposed Helical Region Reduce Experimental Escherichia coli Urinary Tract Infection in Mice*. Infection and Immunity, 2000. **68**(10): p. 5816-5823.
233. Kawai, K., H. Nagahata, N.Y. Lee, A. Anri, and K. Shimazaki, *Effect of Infusing Lactoferrin Hydrolysate into Bovine Mammary Glands with Subclinical Mastitis*. Veterinary Research Communications, 2003. **27**(7): p. 539-548.
234. Zhang, J.X., S.F. Zhang, T.D. Wang, X.J. Guo, and R.L. Hu, *Mammary Gland Expression of Antibacterial Peptide Genes to Inhibit Bacterial Pathogens Causing Mastitis*. Journal of Dairy Science, 2007. **90**(11): p. 5218-5225.
235. Montesinos, E., *Antimicrobial peptides and plant disease control*. FEMS Microbiology Letters, 2007. **270**(1): p. 1-11.
236. Keymanesh, K., S. Soltani, and S. Sardari, *Application of antimicrobial peptides in agriculture and food industry*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009. **25**(6): p. 933-944.

237. Reed, W.A., P.H. Elzer, F.M. Enright, J.M. Jaynes, J.D. Morrey, and K.L. White, *Interleukin 2 promoter/enhancer controlled expression of a synthetic cecropin-class lytic peptide in transgenic mice and subsequent resistance to Brucella abortus*. Transgenic Research, 1997. **6**(5): p. 337-347.
238. Kerr, D.E., K. Plaut, A.J. Bramley, C.M. Williamson, A.J. Lax, K. Moore, K.D. Wells, and R.J. Wall, *Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice*. Nature Biotechnology, 2001. **19**(1): p. 66-70.
239. Halasa, T., K. Huijps, O. Osterás, and H. Hogeveen, *Economic effects of bovine mastitis and mastitis management : a review*. Veterinary Quarterly, 2007. **29**(1): p. 18-31.
240. Rydlo, T., J. Miltz, and A. Mor, *Eukaryotic antimicrobial peptides: promises and premises in food safety*. Journal of Food Science, 2006. **71**(9): p. R125-R135.
241. Nguyen, P. and G.S. Mittal, *Inactivation of naturally occurring microorganisms in tomato juice using pulsed electric field (PEF) with and without antimicrobials*. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 2007. **46**(4): p. 360-365.
242. Lemay, M.-J., J. Choquette, P.J. Delaquis, C. Gariépy, N. Rodrigue, and L. Saucier, *Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model*. International Journal of Food Microbiology, 2002. **78**(3): p. 217-226.
243. And, H.C. and D.G. Hoover, *Bacteriocins and their food applications*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2003. **2**(3): p. 82-100.
244. Gálvez, A., H. Abriouel, R.L. López, and N.B. Omar, *Bacteriocin-based strategies for food biopreservation*. International Journal of Food Microbiology, 2007. **120**(1-2): p. 51-70.
245. O'Sullivan, L., R.P. Ross, and C. Hill, *Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality*. Biochimie, 2002. **84**(5-6): p. 593-604.
246. Murdock, C.A. and K.R. Matthews, *Antibacterial activity of pepsin-digested lactoferrin on foodborne pathogens in buffered broth systems and ultra-high temperature milk with EDTA*. Journal of Applied Microbiology, 2002. **93**(5): p. 850-856.
247. Chantaysakorn, P. and R.L. Richter, *Antimicrobial properties of pepsin-digested lactoferrin added to carrot juice and filtrates of carrot juice*. Journal of Food Protection, 2000. **63**(3): p. 376-380.
248. Enrique, M., P. Manzanares, M. Yuste, M. Martínez, S. Vallés, and J.F. Marcos, *Selectivity and antimicrobial action of bovine lactoferrin derived peptides against wine lactic acid bacteria*. Food Microbiology, 2009. **26**(3): p. 340-346.
249. Enrique, M., J.F. Marcos, M. Yuste, M. Martínez, S. Vallés, and P. Manzanares, *Antimicrobial action of synthetic peptides towards wine spoilage yeasts*. International Journal of Food Microbiology, 2007. **118**(3): p. 318-325.
250. Enrique, M., J.F. Marcos, M. Yuste, M. Martínez, S. Vallés, and P. Manzanares, *Inhibition of the wine spoilage yeast Dekkera bruxellensis by bovine lactoferrin-derived peptides*. International Journal of Food Microbiology, 2008. **127**(3): p. 229-234.

251. Del Olmo, A., P. Morales, and M. Nuñez, *Bactericidal activity of lactoferrin and its amidated and pepsin-digested derivatives against Pseudomonas fluorescens in ground beef and meat fractions*. Journal of Food Protection, 2009. **72**(4): p. 760-765.
252. Venkitanarayanan, K.S., T. Zhao, and M.P. Doyle, *Antibacterial effect of lactoferricin B on Escherichia coli O157:H7 in ground beef*. Journal of Food Protection, 1999. **62**(7): p. 747-750.
253. Del Olmo, A., J. Calzada, and M. Nuñez, *Effect of lactoferrin and its derivatives against gram-positive bacteria in vitro and, combined with high pressure, in chicken breast fillets*. Meat Science, 2012. **90**(1): p. 71-76.
254. Del Olmo, A., J. Calzada, and M. Nuñez, *Effect of lactoferrin and its derivatives, high hydrostatic pressure, and their combinations, on Escherichia coli O157:H7 and Pseudomonas fluorescens in chicken filets*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2012. **13**(0): p. 51-56.
255. Rydlo, T., S. Rotem, and A. Mor, *Antibacterial properties of dermaseptin S4 derivatives under extreme incubation conditions*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006. **50**(2): p. 490-497.
256. Abler, L.A., N.A. Klapes, B.W. Sheldon, and T.R. Klaenhammer, *Inactivation of food-borne pathogens with magainin peptides*. Journal of Food Protection, 1995. **58**(4): p. 381-388.
257. Lee, C.H., H.J. Park, and D.S. Lee, *Influence of antimicrobial packaging on kinetics of spoilage microbial growth in milk and orange juice*. Journal of Food Engineering, 2004. **65**(4): p. 527-531.
258. Tiwari, B.K., V.P. Valdramidis, C.P. O' Donnell, K. Muthukumarappan, P. Bourke, and P.J. Cullen, *Application of natural antimicrobials for food preservation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(14): p. 5987-6000.
259. Bellamy, W., M. Takase, H. Wakabayashi, K. Kawase, and M. Tomita, *Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin*. Journal of Applied Microbiology, 1992. **73**(6): p. 472-479.
260. van der Kraan, M.I.A., J. Groenink, K. Nazmi, E.C.I. Veerman, J.G.M. Bolscher, and A.V. Nieuw Amerongen, *Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin*. Peptides, 2004. **25**(2): p. 177-183.
261. Gobbetti, M., L. Stepaniak, M. De Angelis, A. Corsetti, and R. Di Cagno, *Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2002. **42**(3): p. 223-239.
262. Park, Y.W., *Overview of bioactive components in milk and dairy products*, in *Bioactive components in milk and dairy products*. 2009, Wiley-Blackwell. p. 1-12.
263. Choi, J., L. Sabikhi, A. Hassan, and S. Anand, *Bioactive peptides in dairy products*. International Journal of Dairy Technology, 2012. **65**(1): p. 1-12.
264. Hill, R.D., E. Lahav, and D. Givol, *A rennin-sensitive bond in as1 B-casein*. Journal of Dairy Research, 1974. **41**(01): p. 147-153.
265. Wakabayashi, H., M. Takase, and M. Tomita, *Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin*. Current Pharmaceutical Design, 2003. **9**(16): p. 1277-1287.

266. López-Expósito, I. and I. Recio, *Protective effect of milk peptides: antibacterial and antitumor properties*, in *Bioactive Components of Milk*, Z. Bösze, Editor. 2008, Springer New York. p. 271-294.
267. Jenssen, H., P. Hamill, and R.E.W. Hancock, *Peptide Antimicrobial Agents*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2006. **19**(3): p. 491-511.
268. Hammami, R., A. Zouhir, K. Naghmouchi, J. Ben Hamida, and I. Fliss, *SciDBMaker: new software for computer-aided design of specialized biological databases*. *BMC Bioinformatics*, 2008. **9**(1): p. 121.
269. Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman, *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. *Nucleic Acids Research*, 1997. **25**(17): p. 3389-3402.
270. Pearson, W.R. and D.J. Lipman, *Improved tools for biological sequence comparison*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1988. **85**(8): p. 2444-2448.
271. Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, and D.G. Higgins, *Clustal W and Clustal X version 2.0*. *Bioinformatics*, 2007. **23**(21): p. 2947-2948.
272. Edgar, R.C., *MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput*. *Nucleic Acids Research*, 2004. **32**(5): p. 1792-1797.
273. Durbin, R., S. Eddy, A. Krogh, and G. Mitchison, 1998: Cambridge: Cambridge University Press.
274. Waterhouse, A., J. Procter, D. Martin, M. Clamp, and G. Barton, *Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench*. *Bioinformatics*, 2009. **25**(9): p. 1189 - 91.
275. Kang, J.H., M.K. Lee, K.L. Kim, and K.S. Hahm, *Structure-biological activity relationships of 11-residue highly basic peptide segment of bovine lactoferrin*. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 1996. **48**(4): p. 357-363.
276. Bolscher, J.G.M., M.I.A. van der Kraan, K. Nazmi, H. Kalay, C.H. Grün, W. van't Hof, E.C.I. Veerman, and A.V. Nieuw Amerongen, *A one-enzyme strategy to release an antimicrobial peptide from the LFampin-domain of bovine lactoferrin*. *Peptides*, 2006. **27**(1): p. 1-9.
277. Baranyi, M., U. Thomas, and A. Pellegrini, *Antibacterial activity of casein-derived peptides isolated from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) milk*. *Journal of Dairy Research*, 2003. **70**(02): p. 189-197.
278. López-Expósito, I., J.Á. Gómez-Ruiz, L. Amigo, and I. Recio, *Identification of antibacterial peptides from ovine alphas2-casein*. *International Dairy Journal*, 2006. **16**(9): p. 1072-1080.
279. Wang, G.S., X. Li, and Z. Wang, *APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design*. *Nucleic Acids Research*, 2009. **37**: p. D933-D937.
280. Thomas, S., S. Karnik, R.S. Barai, V.K. Jayaraman, and S. Idicula-Thomas, *CAMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides*. *Nucleic Acids Research*, 2010. **38**: p. D774-D780.
281. Seshadri Sundararajan, V., M.N. Gabere, A. Pretorius, S. Adam, A. Christoffels, M. Lehvaslaiho, J.A.C. Archer, and V.B. Bajic, *DAMPD: a manually curated*

- antimicrobial peptide database*. Nucleic Acids Research, 2012. **40**(Database issue): p. D1108-12.
282. Piotto, S.P., L. Sessa, S. Concilio, and P. Iannelli, *YADAMP: yet another database of antimicrobial peptides*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2012. **39**(4): p. 346-351.
283. Seebah, S., A. Suresh, S.W. Zhuo, Y.H. Choong, H. Chua, D. Chuon, R. Beuerman, and C. Verma, *Defensins knowledgebase: a manually curated database and information source focused on the defensins family of antimicrobial peptides*. Nucleic Acids Research, 2007. **35**: p. D265-D268.
284. Whitmore, L. and B.A. Wallace, *The Peptaibol Database: a database for sequences and structures of naturally occurring peptaibols*. Nucleic Acids Research, 2004. **32**: p. D593-D594.
285. Hammami, R., J. Ben Hamida, G. Vergoten, and I. Fliss, *PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides*. Nucleic Acids Research, 2009. **37**: p. D963-D968.
286. Hammami, R., A. Zouhir, C. Le Lay, J. Ben Hamida, and I. Fliss, *BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization*. BMC Microbiology, 2010. **10**.
287. Gueguen, Y., J. Garnier, L. Robert, M.P. Lefranc, I. Mougnot, J. de Lorgeril, M. Janech, P.S. Gross, G.W. Warr, B. Cuthbertson, M.A. Barracco, P. Bulet, A. Aumelas, Y.S. Yang, D. Bo, J.H. Xiang, A. Tassanakajon, D. Piquemal, and E. Bachere, *PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: Sequence-based classification and recommended nomenclature*. Developmental and Comparative Immunology, 2006. **30**(3): p. 283-288.
288. Hammami, R. and I. Fliss, *Current trends in antimicrobial agent research: chemo- and bioinformatics approaches*. Drug discovery today, 2010. **15**(13-14): p. 540-6.
289. Ueta, E., T. Tanida, and T. Osaki, *A novel bovine lactoferrin peptide, FKRRWQWRM, suppresses Candida cell growth and activates neutrophils*. The Journal of Peptide Research, 2001. **57**(3): p. 240-249.
290. Minkiewicz, P., J. Dziuba, A. Iwaniak, M. Dziuba, and M. Darewicz, *BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences*. Journal of Aoac International, 2008. **91**(4): p. 965-980.
291. Meisel, H. and W. Bockelmann, *Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties*. Antonie Van Leeuwenhoek, 1999. **76**(1): p. 207-215.
292. Oram, J.D. and B. Reiter, *The inhibition of streptococci by lactoperoxidase, thiocyanate and hydrogen peroxide. The oxidation of thiocyanate and the nature of the inhibitory compound*. Biochemical Journal, 1966. **100**(2): p. 382-388.
293. Clare, D.A. and H.E. Swaisgood, *Bioactive milk peptides: a prospectus*. Journal of Dairy Science, 2000. **83**(6): p. 1187-1195.
294. Zucht, H.D., M. Raida, K. Adermann, H.J. Magert, and W.G. Forssmann, *Casocidin-I: a casein-as2 derived peptide exhibits antibacterial activity*. FEBS Letters, 1995. **372**(2-3): p. 185-8.
295. López-Expósito, I., F. Minervini, L. Amigo, and I. Recio, *Identification of antibacterial peptides from bovine κ -casein*. Journal of Food Protection, 2006. **69**(12): p. 2992-2997.

296. Bellamy, W., M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, K. Kawase, and M. Tomita, *Identification of the bactericidal domain of lactoferrin*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1992. **1121**(1-2): p. 130-136.
297. Kuwata, H., T.-T. Yip, M. Tomita, and T.W. Hutchens, *Direct evidence of the generation in human stomach of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1998. **1429**(1): p. 129-141.
298. Jenssen, H., *Anti herpes simplex virus activity of lactoferrin/lactoferricin – an example of antiviral activity of antimicrobial protein/peptide*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005. **62**(24): p. 3002-3013.
299. Tanaka, T., Y. Omata, A. Saito, K. Shimazaki, K. Yamauchi, M. Takase, K. Kawase, I. Igarashi, and N. Suzuki, *Toxoplasma gondii: parasiticidal effects of bovine lactoferricin against parasites*. *Experimental Parasitology*, 1995. **81**(4): p. 614-617.
300. Tomita, M., H. Wakabayashi, K. Yamauchi, S. Teraguchi, and H. Hayasawa, *Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications*. *Biochemistry and Cell Biology*, 2002. **80**(1): p. 109-12.
301. Elbarbary, H.A., A.M. Abdou, E.Y. Park, Y. Nakamura, H.A. Mohamed, and K. Sato, *Novel antibacterial lactoferrin peptides generated by rennet digestion and autofocusing technique*. *International Dairy Journal*, 2010. **20**(9): p. 646-651.
302. Pellegrini, A., C. Dettling, U. Thomas, and P. Hunziker, *Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2001. **1526**(2): p. 131-140.
303. Pellegrini, A., U. Thomas, N. Bramaz, P. Hunziker, and R. von Fellenberg, *Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine α -lactalbumin molecule*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1999. **1426**(3): p. 439-448.
304. Gauthier, S.F., Y. Pouliot, and D. Saint-Sauveur, *Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins*. *International Dairy Journal*, 2006. **16**(11): p. 1315-1323.
305. Mercier, A., S.F. Gauthier, and I.I. Fliss, *Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests*. *International Dairy Journal*, 2004. **14**(3): p. 175-183.
306. Vermeirssen, V., A. van der Bent, J. Van Camp, A. van Amerongen, and W. Verstraete, *A quantitative in silico analysis calculates the angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in pea and whey protein digests*. *Biochimie*, 2004. **86**(3): p. 231-239.
307. Church, F.C., H.E. Swaisgood, D.H. Porter, and G.L. Catignani, *Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins*. *Journal of Dairy Science*, 1983. **66**(6): p. 1219-1227.
308. Hammami, R., A. Zouhir, J.B. Hamida, M. Neffati, G. Vergoten, K. Naghmouchi, and I. Fliss, *Antimicrobial properties of aqueous extracts from three medicinal*

- plants growing wild in arid regions of Tunisia*. *Pharmaceutical Biology*, 2009. **47**(5): p. 452-457.
309. Pihlanto-Leppälä, A., P. Marnila, L. Hubert, T. Rokka, H.J.T. Korhonen, and M. Karp, *The effect of α -lactalbumin and β -lactoglobulin hydrolysates on the metabolic activity of Escherichia coli JM103*. *Journal of Applied Microbiology*, 1999. **87**(4): p. 540-545.
310. Matin, M.D.A. and H. Otani, *Cytotoxic and antibacterial activities of chemically synthesized κ -casecidin and its partial peptide fragments*. *Journal of Dairy Research*, 2002. **69**(2): p. 329-334.
311. Shek, P.Y.I., J. Zhao, Y. Ke, K.W.M. Siu, and A.C. Hopkinson, *Fragmentations of protonated arginine, lysine and their methylated derivatives: concomitant losses of carbon monoxide or carbon dioxide and an amine*. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2005. **110**(27): p. 8282-8296.
312. Hernandez-Ledesma, B., I. Recio, M. Ramos, and L. Amigo, *Preparation of ovine and caprine β -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin*. *International Dairy Journal*, 2002. **12**(10): p. 805-812.
313. Mullally, M.M., H. Meisel, and R.J. FitzGerald, *Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin*. *FEBS Letters*, 1997. **402**(2-3): p. 99-101.
314. Mullally, M.M., H. Meisel, and R.J. FitzGerald, *Synthetic peptides corresponding to α -lactalbumin and β -lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity*. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 1996. **377**(4): p. 259-60.
315. Hernandez-Ledesma, B., A. Davalos, B. Bartolome, and L. Amigo, *Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005. **53**(3): p. 588-593.
316. Rozek, T., R.J. Waugh, S.T. Steinborner, J.H. Bowie, M.J. Tyler, and J.C. Wallace, *The maculatin peptides from the skin glands of the tree frog Litoria genimaculata: a comparison of the structures and antibacterial activities of maculatin 1.1 and caerin 1.1*. *Journal of Peptide Science*, 1998. **4**(2): p. 111-115.
317. van der Kraan, M.I.A., C. van der Made, K. Nazmi, W. van't Hof, J. Groenink, E.C.I. Veerman, J.G.M. Bolscher, and A.V. Nieuw Amerongen, *Effect of amino acid substitutions on the candidacidal activity of LFampin 265-284*. *Peptides*, 2005. **26**(11): p. 2093-2097.
318. Sang, Y. and F. Blecha, *Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics*. *Animal Health Research Reviews*, 2008. **9**(2): p. 227-235.
319. Guinee, T.P., *Salting and the role of salt in cheese*. *International Journal of Dairy Technology*, 2004. **57**(2-3): p. 99-109.
320. Losito, I., T. Carbonara, M.D. De Bari, M. Gobbetti, F. Palmisano, C.G. Rizzello, and P.G. Zambonin, *Identification of peptides in antimicrobial fractions of cheese extracts by electrospray ionization ion trap mass spectrometry coupled to a two-dimensional liquid chromatographic separation*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006. **20**(3): p. 447-455.
321. Rizzello, C.G., I. Losito, M. Gobbetti, T. Carbonara, M.D. De Bari, and P.G. Zambonin, *Antibacterial Activities of Peptides from the Water-Soluble Extracts of Italian Cheese Varieties*. *Journal of Dairy Science*, 2005. **88**(7): p. 2348-2360.

322. Hayes, M., R.P. Ross, G.F. Fitzgerald, C. Hill, and C. Stanton, *Casein-derived antimicrobial peptides generated by Lactobacillus acidophilus DPC6026*. Applied and Environmental Microbiology, 2006. **72**(3): p. 2260-2264.
323. Fox, P.F. and P.L.H. McSweeney, *Cheese: an overview in Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 2004, Academic Press. p. 1-18.
324. Kindstedt, P.S. and P.F. Fox, *Effect of manufacturing factors, composition, and proteolysis on the functional characteristics of mozzarella cheese*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1993. **33**(2): p. 167 - 187.
325. Kuchroo, C.N. and P.F. Fox, *Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures*. Milchwissenschaft, 1982. **37**: p. 331-335.
326. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 1959. **37**(8): p. 911-917.
327. Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, and F. Smith, *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*. Analytical Chemistry, 1956. **28**(3): p. 350-356.
328. Bissonnette, F., S. Labrie, H. Deveau, M. Lamoureux, and S. Moineau, *Characterization of Mesophilic Mixed Starter Cultures Used for the Manufacture of Aged Cheddar Cheese*. Journal of Dairy Science, 2000. **83**(4): p. 620-627.
329. Sheehan, A., C. O'Loughlin, G. O'Cuinn, R.J. FitzGerald, and M.G. Wilkinson, *Cheddar cheese cooking temperature induces differential lactococcal cell permeabilization and autolytic responses as detected by flow cytometry: implications for intracellular enzyme accessibility*. Journal of Applied Microbiology, 2005. **99**(5): p. 1007-1018.
330. Ayad, E.H.E., A. Verheul, J.T.M. Wouters, and G. Smit, *Population dynamics of lactococci from industrial, artisanal and non-dairy origins in defined strain starters for Gouda-type cheese*. International Dairy Journal, 2001. **11**(1-2): p. 51-61.
331. Exterkate, F.A. and A.C. Alting, *The role of starter peptidases in the initial proteolytic events leading to amino acids in Gouda cheese*. International Dairy Journal, 1995. **5**(1): p. 15-28.
332. Reinbold, G.W., *Swiss cheese varieties*. Pfizer cheese monographs. Vol. 5. 1972, New York: Pfizer. 187.
333. Jenkins, J.K., W.J. Harper, and P.D. Courtney, *Genetic diversity in Swiss cheese starter cultures assessed by pulsed field gel electrophoresis and arbitrarily primed PCR*. Letters in Applied Microbiology, 2002. **35**(5): p. 423-427.
334. O'Shea, B.A., T. Uniacke-Lowe, and P.F. Fox, *Objective assessment of cheddar cheese quality*. International Dairy Journal, 1996. **6**(11-12): p. 1135-1147.
335. Pritchard, S.R., M. Phillips, and K. Kailasapathy, *Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese*. Food Research International, 2010. **43**(5): p. 1545-1548.

