

UNIVERSITE DE STRASBOURG
FACULTE DE CHIRURGIE DENTAIRE

Année 2015

N° 13

THESE

Présentée pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Chirurgie Dentaire
par

Joanna HELMSTETTER

Née le 17 Septembre 1990 à Phalsbourg

**Incidence de l'allaitement maternel sur la
caractérisation des peptides antimicrobiens dans la salive
des nourrissons**

Présentée et soutenue publiquement le 25 Mars 2015

Président : Professeur Marie-Cécile MANIERE

Assesseurs : Docteur Frédéric OBRY

Docteur Olivier HUCK

Docteur Marie-Hélène METZ-BOUTIGUE

REMERCIEMENTS

A Madame le Président Marie-Cécile MANIERE,

Pour avoir accepté de présider mon jury de thèse, je vous remercie pour vos conseils et votre disponibilité tout au long de l'élaboration de ce travail, ainsi que pendant mes années cliniques.

A Monsieur le Docteur Frédéric OBRY, directeur de thèse,

Pour vos idées, votre enthousiasme, votre patience et vos conseils, je vous remercie d'avoir bien voulu vous charger de la direction de cette thèse.

A Madame le Docteur Marie-Hélène METZ – BOUTIGUE,

Pour avoir été présente tout au long de ce travail. Je vous remercie pour votre implication, votre dévouement, et votre présence. Votre savoir et vos conseils m'ont permis d'organiser mes recherches et ce travail. Je n'oublierais pas ces heures passées au laboratoire qui ont été enrichissantes sur de nombreux plans.

A Monsieur le Docteur Oliver HUCK,

Pour avoir accepté sans hésitation de participer à l'évaluation de ce travail.

A Thibault,

Parce que tu étais là hier, parce que tu l'es aujourd'hui et que je sais que tu le seras encore demain. Je te remercie tout simplement d'être toujours à mes côtés, merci de me rendre si heureuse.

A mes parents, mon frère,

Merci de m'avoir épaulé, supporté et soutenu durant toutes mes études et depuis toujours. Merci d'être à mes côtés, je ne souhaite qu'une chose, que vous soyez fier de moi.

A ma famille,

Parce que je suis fière de faire partie de cette famille si soudée et bienveillante. Je suis consciente de la chance que j'ai d'avoir grandi dans cet environnement. L'éducation et les valeurs qui m'ont été inculquées font de moi la personne que je suis aujourd'hui. Je remercie ma Oma & mon Opa, ma mamie, mes parrains et marraines, mes oncles et tantes, ainsi que mes cousins et cousines d'être là.

Un remerciement tout particulier à ma marraine Vivis, ma « maman-marraine » comme je le disais, qui a toujours été là pour moi. Je pense fort à toi dans cette période si difficile.

A ma belle-famille,

Qui m'a accueilli les bras ouverts, qui me soutient et me gâte. Merci pour tout, je n'aurais sûrement pas pu mieux tomber. Un énorme merci à Brigitte, pour sa présence et son investissement dans ce travail.

A Sarah,

Ma binôme des premiers stress de la P1, jusqu'aux dernières lignes de cette thèse : c'est à deux que nous avons réussi. Parce que je n'oublierais jamais ces années.

A Lélé,

Pour tous ces bons moments passés ensemble, nos soirées, les fous rires & pour notre passion commune de la pâtisserie. Je te remercie pour tout ça, et j'espère toujours t'avoir près de moi.

A Christel,

La plus folle (Caro !), qui a toujours le sourire, et me fait tellement rire. Merci pour tous ces moments que je n'oublierais pas.

A Marie-Charlotte,

Pour toutes ces heures passées ensemble à la fac, ma binôme de TP. Tu as toujours été là pour moi, dans les bons moments et les plus difficiles, pour tout ça, merci.

A Magou,

Pour ces beaux souvenirs partagés ensemble à la fac, en soirées et même à Marseille, merci.

A toutes mes autres chays, je ne garde que le meilleur de ces années, parce que les beaux souvenirs sont là et resteront : à Laura, Léa, Alice, Perrine, Marie Élise.

A tous ceux que je n'ai pas cités et avec qui j'ai passé mes études. Pour tous ces bons moments que je garderais en mémoire, que ce soit autour d'un verre, en clinique ou même en cours, merci.

Aux mamans volontaires,

Parce que grâce à vous, cette étude a pu avoir lieu. Merci d'y avoir participé, merci pour votre disponibilité et le temps accordé à mon travail.

Merci à Natallya & Alexandre, Sandra & Maud, Aurore & Ava, Nathalie & Lisa, Géraldine & Aïden, Elise & Sasha, Christine & Raphaël, Anne-Sophie & Emy, Clémence & Faustine, Gwenaëlle & Lena, Stéphanie & Nicolas, Marina & Logan, Anne-Flore & Rosalie.

A tout les membres du labo,

Parce que les heures passées au laboratoire, les pauses midis et les discussions en tout genre resteront de très bons souvenirs que je n'oublierais pas. Pour votre patience, votre savoir, et le temps accordé, merci à toute l'équipe et en particulier à Céline, Sophie, Camille, Cosette & Fadoua.

A l'équipe du CMCO,

Pour votre accueil et votre investissement dans ce travail. Merci au Dr Romain Favre, à Mme Marie-Amélie Schmelck, à Justine et à l'ensemble des sages-femmes.

*"Pendant longtemps, il me semblait que ma vie allait commencer – la Vraie Vie!
Mais il y avait toujours des obstacles le long du chemin ; une épreuve à traverser, un travail à
terminer, du temps à donner, une dette à payer.
Puis la vie commencerait... J'ai enfin compris que ces obstacles étaient la vie"*
Alfred D. Souza

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	15
1ère PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE	18
CHAPITRE I : LE LAIT ET L'ALLAITEMENT MATERNEL	19
1. Le lait maternel.....	20
1.1 Physiologie de la lactation.....	20
1.1.1 La lactogénèse	20
1.1.2 La lactation	21
1.1.3 Principales hormones de la lactation	21
1.2 Composition du lait maternel	22
1.3 Evolution de la composition du lait maternel	24
1.3.1 Du colostrum au lait mature	24
1.3.2 Evolution de la composition du lait au cours de la tétée	25
1.3.3 Evolution du lait au cours de la journée.....	25
2 L'allaitement maternel	26
2.1 Recommandations et pratiques.....	26
2.2 Bénéfice pour la mère	27
2.2.1 Effet à court terme, après l'accouchement	27
2.2.2 Effet à long terme	27
2.3 Bénéfices pour l'enfant	28
2.3.1 Intérêt nutritionnel	28
2.3.2 Protection contre les allergies	28
2.3.3 Protection contre les infections	29
CHAPITRE II : LA SALIVE	30
1. Généralités	31
2. Formation de la salive	31
3. Composition	32
3.1 Constituants organiques	32

3.1.1	Les protéines	32
3.1.2	Autres	34
3.2	Constituants inorganiques	34
4.	Rôle de la salive	35
 CHAPITRE III : LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS		36
1.	Structure des peptides antimicrobiens.....	37
1.1	Définition d'un peptide	37
1.2	Structure	37
2	Classification des peptides antimicrobiens	38
2.1	Généralités.....	38
2.2	Classification des peptides en fonction de leurs structures	39
2.2.1	Les peptides cationiques linéaires à hélice α	39
2.2.2	Les peptides linéaires riches en certains aas	39
2.2.3	Les peptides riches en cystéine avec un ou plusieurs ponts disulfures	40
2.2.4	Les peptides dérivés de grandes protéines	40
2.2.5	Les peptides anioniques	40
3	Principales familles de peptides antimicrobiens	41
3.1	Les défensines	41
3.2	Les cathélicidines humaines LL-37	42
3.3	Les histatines	42
4	Les protéines antimicrobiennes	43
4.1	Le lysozyme	43
4.2	La lactoferrine et les lactoferricines B et H	43
4.3	La Séminalplasmine	43
4.4	Les granines.....	44
4.4.1	Généralités.....	44

4.4.2	Les chromogranines	44
5	Les domaines d'actions de PAMs	46
5.1	Activité antimicrobienne	46
5.2	Activité antivirale	46
5.3	Activité antifongique	47
5.4	Activité antiparasitaire	47
5.5	Activité anticancéreuse	47
5.6	Effet cytotoxique	47
5.7	Autres fonctions biologiques	48
6	Mécanismes d'action	48
6.1	Les mécanismes d'action membranaire	48
6.2	Les mécanismes d'action intracellulaire	49
	2ème PARTIE : ETUDE PERSONNELLE	51
	CHAPITRE IV : MATERIEL ET METHODES	52
1.	Le matériel	53
1.1	Prélèvement salivaire des nourrissons	53
2.	Les méthodes	54
2.1	Chromatographie par HPLC de phase inverse des extraits salivaires	54
2.2	Tests antimicrobiens	56
2.3	Spéctrométrie de masse	58
2.4	Séquençage	58
2.5	Interrogation des banques de données pour l'identification du peptide	61
2.6	Quantification des pics majoritaires	61
2.7	Électrophorèse et Western Blot	61

CHAPITRE V : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	64
1. Evolution des constituants de la salive en fonction de l'âge des nourrissons	65
2. Analyse des activités antimicrobiennes des constituants de la salive des nourrissons	66
3. Caractérisation structurale des peptides antimicrobiens	67
4. Caractérisation des fragments dérivés des CGA et CGB	69
5. Comparaison avec les résultats issus de l'étude sur les laits infantiles	72
5.1 Comparaison de l'évolution des constituants de la salive en fonction de l'âge des nourrissons	72
5.2 Comparaison des dérivés de la CGA et CGB identifiés.....	75
5.3 Comparaison des peptides antimicrobiens	76
 CONCLUSION	 81
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	84

LISTES DES ABREVIATIONS

Ac : Anticorps
Aa : Acide aminé
ATZ-aa : AnilinoThioZolinone- acide aminé
BSA : Bovine Serum Albumin
CAT : Catestatine
CG (s) : Chromogranine(s)
CGA : Chromogranine A
CGB : Chromogranine B
CHR : Chromofungine
CMCO : Centre Médico-Chirurgical Obstétrical
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
EGF : Epithelial Growth Factor
HAS : Haute Autorité de Santé
HNP : Peptide neutrophile humain
Ig : Immunoglobine
IgA : Immunoglobine A
Jrs : Jours
LL-37 : Cathélicidine humaine
MAMA : Méthodes d'Allaitement Maternel et d'Aménorrhée
Min : minutes
MM : Masse Moléculaire
NGF : Nerve Growth Factor
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PAM(s) : Peptids Antimicrobien(s)
PBS : Phosphate Buffered Saline
PITC : PhénylIsoThioCyanate
PTC-aas : PhénylThioCarbamyl amino-acides
PTH-aas : PhénylThioHydantoine amino-acides
PRP(s) : Protéine(s) riche en proline
PVDF : PolyFluorure de VinyliDène
SDS- Page : dodicyl sulfate de sodium
SGs : sécrétrogranines
TFA : Acide TriFluoroAcétique

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Variations des hormones de la lactation
- Figure 2 : Variations des constituants au cours de la maturation du lait de femme
- Figure 3 : Début de la diversification alimentaire
- Figure 4 : Les glandes salivaires principales
- Figure 5 : Classification des peptides
- Figure 6 : Insertion membranaire des PAMs dans les cellules
- Figure 7 : Mécanismes d'action intra-cellulaires des PAMs
- Figure 8 : Principes de fonctionnement d'une HPLC
- Figure 9 : HPLC Dionex Ultimate 3000
- Figure 10 : Exemple d'un chromatogramme
- Figure 11 : Organisation type d'une plaque
- Figure 12 : Réaction de couplage dans la réaction d'Edman
- Figure 13 : Réaction de clivage dans la réaction d'Edman
- Figure 14 : Réaction de conversion dans la réaction d'Edman
- Figure 15 : Chromatogramme des PTH-aas standard
- Figure 16 : Électrophorèse et Western Blot
- Figure 17 : Evolution au cours du temps, des constituants de la salive des nourrissons allaités au lait maternel
- Figure 18 : Activité antimicrobienne et caractérisation structurale des peptides antimicrobiens.
- Figure 19 : Caractérisation des fragments dérivés de CGA.
- Figure 20 : Caractérisation des fragments dérivés de CGB.
- Figure 21 : Comparaison des constituants présents dans la salive des nourrissons nourris au lait infantile ou maternel à 15 jours
- Figure 22 : Comparaison des constituants présents dans la salive des nourrissons nourris au lait infantile ou maternel à 1 mois
- Figure 23 : Comparaison des constituants présents dans la salive des nourrissons nourris au lait infantile ou maternel à 3 mois
- Figure 24 : Comparaison des constituants présents dans la salive des nourrissons nourris au lait infantile ou maternel à 6 mois
- Figure 25 : Evolution du pourcentage de mucines, entre 15 jrs et 6 mois, chez les enfants allaités au sein et nourris par des laits infantiles
- Figure 26 : Evolution du pourcentage des PRP, entre 15 jrs et 6 mois, chez les enfants allaités au sein et nourris par des laits infantiles
- Figure 27 : Evolution du pourcentage des histatines, entre 15 jrs et 6 mois, chez les enfants allaités au sein et nourris par des laits infantiles
- Figure 28 : Evolution du pourcentage de stathérine, entre 15 jrs et 6 mois, chez les enfants allaités au sein et nourris par des laits infantiles
- Figure 29 : Evolution du pourcentage de cystatine, entre 15 jrs et 6 mois, chez les enfants allaités au sein et nourris par des laits infantiles
- Figure 30 : Evolution du pourcentage du pic n°12, entre 15 jrs et 6 mois, chez les enfants allaités au sein et nourris par des laits infantiles
- Figure 31 : Evolution du pourcentage du pic n°14, entre 15 jrs et 6 mois, chez les enfants allaités au sein et nourris par des laits infantiles

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1 : Concentration ionique de la salive en mM

Tableau 2 : Les fonctions de la salive

Tableau 3 : Liste des acides aminés naturels

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des prélèvements salivaires

Tableau 5 : Comparaison de la présence des fragments des CGs dans les puits des membranes du Western Blot dans les deux cas d'études

INTRODUCTION

Durant l'Antiquité, le lait est vu comme étant à l'origine de la terre, de la vie et des humains, il est considéré comme mythique. Malgré ces croyances, durant des siècles, les mères aisées sont conviées à éviter l'allaitement. Les nouveau-nés sont confiés à des nourrices, qui elles mêmes confient leurs propres enfants à d'autres femmes allaitantes ; il existe une véritable « industrie de l'allaitement ». Les nourrissons ne bénéficient pas des avantages du lait de leur propre mère, qui plus est dans des conditions hygiéniques et sanitaires insuffisantes : la mortalité infantile atteint ses taux les plus élevés. Au cours du XVIIème siècle, les idées commencent à changer ; c'est l'apparition de l'hôpital et des premiers biberons. Les personnels hospitaliers favorisent l'utilisation de lait animalier et industriel. L'abandon de l'allaitement au sein s'accroît au XIXème siècle du fait de la croissance urbaine, du développement du travail des femmes et de la pasteurisation des laits (à partir de 1864). L'utilisation des laits de substitution se répand, et la proportion de bébés allaités atteint son seuil le plus bas à la fin des années 1960. Les années 1970 marquent un nouveau tournant positif pour l'allaitement maternel. Les femmes des milieux favorisés et les femmes ayant fait des études longues vont redécouvrir et prôner l'allaitement au sein, alors que celles des milieux ouvriers ou paysans s'en détachent. La recherche médicale sur l'allaitement progresse également rapidement, les publications se multiplient et prouvent l'importance du lait maternel pour la santé des enfants. Actuellement la moitié des nouveaux nés sont allaités à la sortie de la maternité, le corps médical promeut davantage l'allaitement maternel en conseillant ce mode d'alimentation pour ses bienfaits, pour la santé et la croissance de l'enfant mais aussi pour la mère elle-même.

L'alimentation joue un rôle primordial dès les premiers mois de la vie pour le développement et la croissance du nourrisson. Le développement et la qualité des dents sont également soumis à ce facteur ; un apport trop important de sucre peut par exemple entraîner l'apparition de caries dès le plus jeune âge. La carie dentaire représente un véritable problème de santé publique dès l'enfance, malgré les pratiques préventives mises en place. En 2003, selon une étude de l'HAS, 30% des enfants de 4 et 5 ans présentent au moins une carie. Bien qu'elle soit influencée par de nombreux facteurs, la carie a besoin de bactéries pour se développer. De nombreuses études s'intéressent aux facteurs propres de l'hôte, comme les peptides antimicrobiens qui sont présents dans la salive et qui pourraient modifier la cario-susceptibilité. L'étude de Malcom & al., montre par exemple que les taux de certains peptides antimicrobiens sont supérieurs chez des enfants indemnes des caries [Malcolm et al.,2014]. Une autre étude [Davidopoulou, 2012] émet également l'hypothèse que ces taux élevés

augmentent les résistances aux caries. C'est en partant de ces idées que nous nous sommes intéressés aux peptides antimicrobiens de la salive des nourrissons, ainsi qu'à l'incidence de l'allaitement maternel sur ces mêmes peptides. Nous nous sommes également demandé s'il existe des différences entre un allaitement maternel et un allaitement par du lait infantile.

Le travail présenté dans cette thèse comprendra deux grandes parties. La première partie, divisée en trois chapitres, correspond aux données de la littérature qui concernent l'allaitement maternel, la salive ainsi que les peptides antimicrobiens. Dans le premier chapitre nous nous préoccupons du lait maternel, en particulier de sa physiologie, sa composition et son évolution au cours du temps. Dans ce même chapitre nous parlons également de l'allaitement maternel, de ses pratiques ainsi que ses bénéfices reconnus. Nous définissons dans un second chapitre la salive, de sa formation à son rôle, en passant par sa composition. Le dernier chapitre de cette première partie concerne les peptides antimicrobiens, nous nous intéressons à leur structure, leur classification et leurs mécanismes d'actions.

La seconde partie de ce travail, concerne les résultats obtenus au cours de notre étude. Nous définissons dans un premier temps le matériel et les méthodes utilisés, nos tests portant essentiellement sur des techniques de biochimie analytique et de microbiologie. Puis nous analysons dans un second temps, les résultats obtenus : la cinétique de l'évolution de la composition de la salive de 15 jours à 6 mois, ainsi que l'identification des peptides majoritaires et leurs propriétés antimicrobiennes. Nous terminons par la comparaison de nos résultats avec ceux issus de l'étude sur la salive des enfants allaités par des laits infantiles.

**1ere PARTIE:
REVUE DE
LITTERATURE**

CHAPITRE I

L'ALLAITEMENT MATERNEL

1- LE LAIT MATERNEL

1.1 Physiologie de la lactation

Le sein est un organe incomplètement développé à la naissance. Sa croissance se poursuit durant l'enfance et de façon plus importante durant l'adolescence. Pendant la grossesse, la glande mammaire entre dans le « cycle de la lactation » et il y aura une phase de développement rapide de la glande. Le lait est fabriqué par les cellules de l'épithélium mammaire, il est sécrété dans les alvéoles, où il est stocké jusqu'à ce qu'il soit expulsé vers le mamelon au cours de l'éjection. Le processus de sécrétion du lait démarre pour la plupart des femmes en post - partum : c'est-à-dire la période qui débute à la fin de l'accouchement. Ensuite la production de lait augmente et sa composition s'adapte aux besoins du nouveau - né [Beaudry M et al., 2006]. On distingue deux processus principaux dans la sécrétion du lait : la lactogénèse et la lactation.

1.1.1 La lactogénèse

C'est le processus par lequel la glande mammaire développe la capacité de sécréter du lait. Elle précède la lactation qui correspond au processus de sécrétion [Beaudry M et al., 2006]. C'est un processus évolutif continu, mais on différencie deux stades : l'amorce ou lactogénèse 1 et l'activation ou lactogénèse 2.

○ L'amorce / Lactogénèse 1

Vers le milieu de la grossesse, les cellules de la glande mammaire atteignent un degré suffisant de différenciation pour produire de petites quantités de certains composants du lait (exemple : le lactose). Cependant la production de lait est inhibée par le taux élevé de progestérone et d'oestrogènes. Le sein sécrète peu ou pas de liquide pendant la grossesse.

○ L'activation

Les taux d'hormones changent rapidement dans les heures qui suivent le décollement du placenta, en particulier la chute de la progestérone plasmatique. Cela entraîne une augmentation rapide de la quantité de lait produite, que l'on appelle « la montée de lait ». La sécrétion du lait ne dépend pas directement de la stimulation du sein, mais il est primordial que le bébé soit mis au sein le plus tôt possible après sa naissance [Beaudry M et al., 2006].

1.1.2 La lactation

C'est le processus de sécrétion du lait. Ce processus est maintenu aussi longtemps que le lait est prélevé de façon régulière au sein. La lactation dépend de deux hormones principales la prolactine et l'ocytocine.

1.1.3 Principales hormones de la lactation

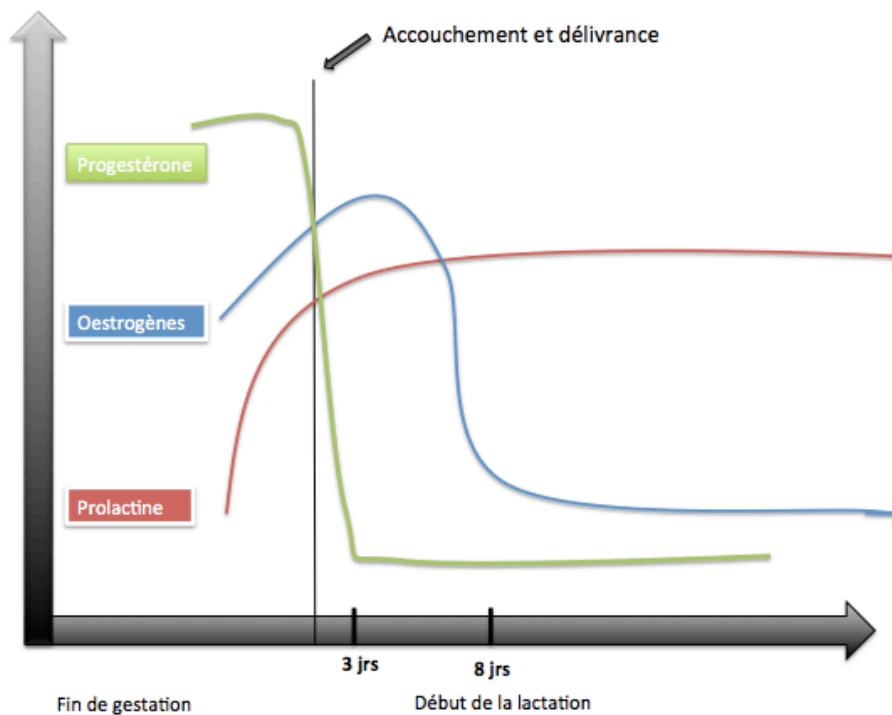


Figure 1 : Variations des hormones de la lactation (Source : Thirion M., 1999)

Les oestrogènes amplifient l'action de la prolactine sur la mammogénèse.

La chute du taux de Progesterone lors de l'expulsion du placenta, permet l'activation de la lactogénèse et la montée de lait.

La Prolactine permet d'accélérer la croissance et le développement des tissus mammaires. Elle permet également la synthèse et la sécrétion du lait. Elle est chargée de stimuler les cellules glandulaires du sein pour qu'elles fabriquent, selon des mécanismes biologiques complexes et très spécifiques, les constituants du lait. Il n'y a pas de lien direct entre le taux

sanguin de prolactine et le volume de lait produit, mais en l'absence de prolactine, il n'y a pas de sécrétion de lait [Thirion M, 1999].

L'Ocytocine est responsable des contractions de l'utérus, et également des contractions des cellules myoépithéliales entourant les alvéoles mammaires. Elle met en route la pompe autour des alvéoles et permet l'éjection du lait [Thirion M, 1999].

1.2 Composition du lait maternel

La composition du lait maternel permet de satisfaire les besoins du nourrisson.

○ **Eau**

C'est l'élément le plus abondant, il représente 87% du contenu du lait humain. L'eau est vitale pour maintenir l'hydratation. Un bébé qui est allaité à la demande, comble entièrement ses besoins en eau par le lait maternel.

○ **Lipides**

Ils constituent la principale source d'énergie, et assurent la croissance et le développement fonctionnel de l'individu. Les principaux lipides retrouvés sont les triglycérides, les phospholipides et le cholestérol.

Les triglycérides représentent 97 à 98% des lipides du lait. Les phospholipides représentent 0,6% des lipides du lait. La composition des phospholipides du cortex cérébral en acides gras est grandement influencée par l'apport alimentaire en lipides.

Le lait humain contient beaucoup de cholestérol. C'est un composant essentiel de toutes les membranes cellulaires. Il est nécessaire à la croissance, et au maintien des cellules.

○ **Protéines et substances azotées**

Les protéines constituent 0,9% du lait humain (3,2% du lait de vache). La teneur totale en protéines du lait humain est la plus faible de toutes les espèces.

Le lait humain comprend une grande variété de protéines, ce qui lui confère ses qualités uniques. Il est riche en alpha lactalbumine, en lactoferrine et en caséine [Mamouni I, 2007]. Ce pourcentage élevé de protéines solubles et les micelles de caséine de petite taille expliquent la coagulation plus fine du lait de femme dans l'estomac du nourrisson, contribuant à une vidange gastrique plus rapide [PNNS, 2005]. L'amylase y est présente en quantité

également ; elle pourrait faciliter la digestion des glucides.

- **Glucides**

Différents glucides sont retrouvés dans le lait maternel ; les principaux sont le lactose, le galactose et les oligosaccharides.

Le lactose est le sucre dominant du lait humain. Il permet de couvrir les besoins énergétiques du nourrisson et favorise l'absorption du calcium. Sa transformation par les bactéries intestinales en acide lactique et acétique contribue à l'abaissement du pH intestinal et aussi à l'inhibition de la croissance de certaines bactéries entéropathogènes [Salle BL et al., 1993]. Les oligosaccharides sont les troisièmes composants solides du lait humain après le lactose et les triglycérides. Ils favorisent la croissance de plusieurs espèces de bifidobactéries (bonnes bactéries) dans l'intestin, qui protègent le nouveau-né des infections digestives. Les oligosaccharides sont spécifique du lait humain et ne peuvent pas être répliqués par synthèse.

- **Les facteurs de défense dans la relation hôte-pathogène**

Le lait maternel contient des facteurs anti-infectieux comme les IgAs et les IgMs qui renforcent les défenses immunitaires [Mamouni I, 2007]. Il contient également de nombreux facteurs antibactériens comme le lysozyme, la lactotransferrine, ou les interleukines. De plus, l'enfant peut tirer partie du passé immunitaire de sa mère par les anticorps et les immunoglobulines contenus dans le lait [Mamouni I, 2007].

- **Vitamines et minéraux**

Le lait humain permet de satisfaire les besoins en micronutriments du jeune enfant (vitamines et minéraux). L'apport est suffisant pour la vitamine E, A et B12.

Les nourrissons allaités exclusivement sont bien protégés d'une carence en vitamine C car les six premiers mois, la teneur en vitamine C du lait maternel varie de 34mg/l à 83mg/l.

Concernant la vitamine D, le soleil est la plus importante « source » de vitamine D. Etant donné qu'il est maintenant contre indiqué d'exposer les enfants directement au soleil, des carences en vitamine D peuvent donc se faire. Une supplémentation en vitamine D et en vitamine K peut être nécessaire.

1.3 Evolution de la composition du lait maternel

Nous venons de voir la composition générale du lait maternel, mais cette composition varie. Elle varie au cours du temps : il y a un premier lait, le colostrum, puis un lait de transition et enfin un lait mature. Il y a également des évolutions au cours de la tétée ainsi qu'au cours d'une même journée.

1.3.1 Du colostrum au lait mature

D'une manière générale, du 1er au 5ème jour, l'enfant tète le colostrum, un fluide dense, jaune d'or, riche en protéines, anticorps, vitamines et minéraux, idéal pour lui offrir un bon départ. Il a deux intérêts majeurs ; apporter en quelques grammes, tous les éléments dont l'enfant a besoin et lui épargner tout travail et perte énergétique inutile [Beaudry M et al., 2006]. Il est très bien assimilé, n'occasionne pas de surcharge rénale et produit peu de déchets non digérés. Le colostrum est dix fois plus riche en protéines que le lait mature, c'est un véritable concentré salé d'immunoglobines [Thirion M, 1999].

Après la phase colostrale, la composition du lait varie progressivement, s'enrichissant en lactoses, sucres et en lipides tandis que les concentrations en protéines et immunoglobulines s'abaissent. Ces modifications caractérisent le lait de transition qui devient lait mature après 15 jours environ post partum.

L'allaitement proprement dit commence avec le lait mature, vers le 15ème jour. Il a un aspect « blanc-bleuté », presque translucide. Le lait mature va continuer à évoluer au cours des mois de lactation. Comme le rythme de croissance du bébé ralentit légèrement, les taux de protéines et de calories du lait diminuent afin que l'enfant ne soit pas trop nourri.

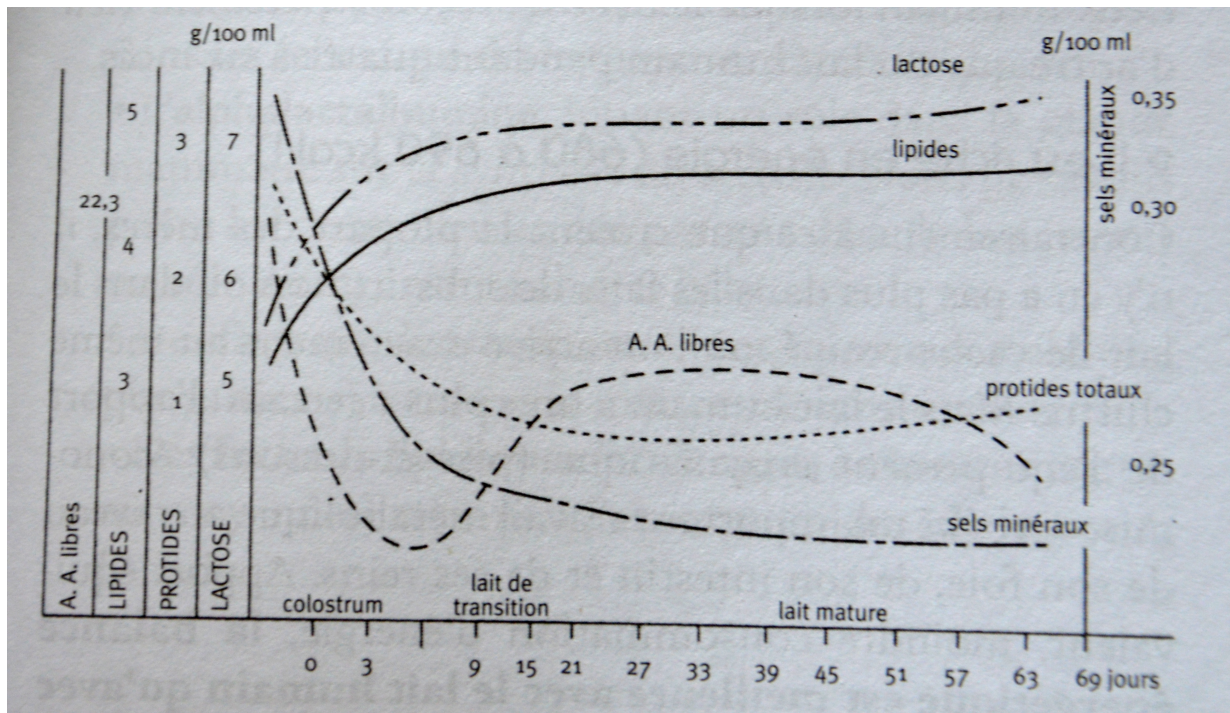


Figure 2 : Variations des constituants au cours de la maturation du lait de femme (Source : Thirion M, 1999)

1.3.2 Evolution de la composition du lait au cours de la tétée

Le lait est très clair en début de tétée, c'est parfaitement normal, il est composé de beaucoup d'eau et de sels minéraux pour désaltérer. Puis la proportion de glucides directement assimilables par l'organisme augmente (les oligosaccharides puis le lactose). En milieu de tétée, les protéines et lipides augmentent en quantité. A la fin les lipides se concentrent de plus en plus, c'est cet enrichissement progressif en graisse qui assure une sensation de satiété [Salle BL et al., 1993]. C'est pourquoi il faut faire téter le bébé suffisamment longtemps à chaque sein : en ne buvant que le lait de début de tétée, riche en eau et en sucre le bébé répond à sa soif, en tétant plus longtemps, il obtient les protéines et les lipides nourrissants.

1.3.3 Evolution de la composition du lait au cours de la journée

Vers midi, le lait contient plus de lipides. A midi et le soir, il contient plus de protéines. Il y a plus de lactose le matin, et plus d'oligosaccharides l'après-midi. Un bébé nourri à la demande peut ainsi adapter lui-même les tétées selon ses besoins.

2- L'ALLAITEMENT MATERNEL

2.1 Recommandations et pratiques

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) un allaitement exclusif, c'est-à-dire sans aucun autre apport alimentaire que le lait maternel, doit être réalisé jusqu'à l'âge de six mois pour que l'enfant ait une croissance, un développement et une santé optimale. « L'allaitement au sein exclusif » signifie que l'on ne donne à l'enfant que du lait maternel et aucune autre boisson ou aliment [OMS, 1999]. En revanche, on peut lui administrer des gouttes ou des sirops (vitamines, minéraux ou médicaments). L'OMS recommande d'introduire d'autres aliments, en plus du lait maternel, à partir de l'âge de six mois (180 jours). Ces aliments seront donnés deux à trois fois par jour entre 6 et 8 mois, puis systématiquement trois à quatre fois par jour entre 9 et 11 mois. Entre 12 et 24 mois, on donne aux enfants trois à quatre repas et deux encas nutritifs à la demande entre les repas. L'apport nutritif doit être suffisant, ce qui veut dire comporter suffisamment de calories, de protéines et de nutriments pour couvrir les besoins nutritionnels d'un enfant qui grandit [Arsan A et al., 2011].



Figure 3 : Début de la diversification alimentaire (magicmamaman.com)

En France, un bébé sur deux est allaité à la naissance. C'est l'un des taux d'allaitement les plus bas d'Europe. En Norvège, 98 % des nourrissons sont allaités à la naissance, 94 % en

Suède, 92 % pour la Suisse, et 87 % pour l'Allemagne. Malgré tout, ce taux a tendance à augmenter en France ; il est de 54,5% en 2001 contre 45,6 % en 1995. Cela est lié à la promotion de l'allaitement par les équipes soignantes [Gremmo-Féger G, 2000].

2.2 Bénéfices pour la mère

2.2.1 Effet à court terme, après l'accouchement

L'allaitement maternel aurait différents intérêts pour la mère. Directement après l'accouchement, l'ocytocine sécrétée à chaque tétée entraîne des contractions de l'utérus. Ces contractions limitent le saignement en post-partum et favorisent l'involution utérine [Dermer A, 1998]. Les femmes retrouvent un ventre plat plus rapidement [Thirion M, 1999]. L'allaitement permet une perte de poids plus rapide dans le post-partum qu'en l'absence d'allaitement, lorsqu'il est pratiqué plusieurs mois en l'absence d'excès d'apport calorique [Thirion M, 1999]. De plus, l'aménorrhée lactationnelle limite, dans les mois qui suivent l'accouchement, les pertes sanguines, les pertes de fer et donc l'anémie post partum [Thirion M, 1999].

L'allaitement au sein, sous des conditions précises, est également un moyen de contraception. Ceci est dû à l'hyperprolactinémie secondaire à l'allaitement qui bloque l'ovulation, tant que l'allaitement reste exclusif. C'est la Méthode d'Allaitement Maternel et d'Aménorrhée (MAMA) [OMS, 1999]. Plus le bébé tète, plus le taux de prolactine sanguin est élevé et moins il y a d'ovulation [Thirion M, 1999].

2.2.2 Effet à long terme

L'allaitement aurait également des effets bénéfiques à plus long terme, il diminuerait l'incidence des cancers du sein et de l'ovaire. L'aménorrhée prolongée induite par l'allaitement, ainsi que le nombre d'enfants allaités pourrait expliquer cet effet protecteur. Une étude mise en place par l'OMS a démontré que c'est surtout l'absence d'ovulation qui diminuerait l'incidence de ces cancers. L'absence d'ovulation est surtout présente pendant la grossesse (qui est donc un facteur protecteur) mais aussi pendant la lactation, effet d'autant plus protecteur qu'il est prolongé [Rosenblatt K et al., 1993].

La lactation apporterait également à la mère un équilibre hormonal global. Chaque largage d'ocytocine s'accompagne d'une poussée d'autres hormones posthypophysaires, comme la vasopressine et l'ACTH pour remonter la tension artérielle, des hormones de croissance pour favoriser la multiplication cellulaire et la cicatrisation, la TSH pour stimuler la thyroïde [Thirion M, 1999].

Les effets psychologiques de l'allaitement maternel sont plus difficiles à analyser, il semblerait que l'allaitement améliore la confiance en soi des mères et facilite leur rapprochement avec leur enfant. Le côté pratique de l'allaitement n'est pas négligeable, il « simplifie la vie » des mamans : pas de biberons à laver ni à stériliser, pas de lait ni d'eau minérale à transporter, et aucune dépense [Thirion M, 1999].

2.3 Bénéfices pour l'enfant

L'allaitement maternel a également des bénéfices pour l'enfant. Comme il est rapporté dans la littérature, en plus de l'intérêt nutritionnel, le lait maternel préviendrait contre les risques d'allergies, contre les infections, l'obésité, et les problèmes respiratoires. Nous allons voir ici trois bénéfices principaux.

2.3.1 Intérêt nutritionnel

Une femme nourrie de féculents, de légumes, de quelques protéines, fournit à son enfant un aliment de qualité nutritive exactement adapté en qualité et en quantité à ses besoins, avec les enzymes nécessaires à sa digestion et à son assimilation, ce qui lui permet d'être totalement utilisé. Le corps d'une mère est programmé pour fabriquer à l'usage de son petit ce qu'il y a de meilleur [Thirion M, 1999].

2.3.2 Protection contre les allergies

Pour un enfant né à terme, on estime généralement que l'intestin n'est une barrière antiallergique efficace qu'au-delà de cent jours, soit près de trois mois et demi. Plus un enfant est petit, plus son intestin est perméable aux protéines étrangères apportées par son alimentation. La muqueuse est fine, et des aliments peuvent la traverser. Les particules qui traversent la muqueuse intestinale se retrouvent dans le sang. Le système immunitaire les

repère comme « non conformes » aux normes génétiques de l'individu (antigéniques) et donc à détruire. Il met alors en place des anticorps qui réagiront à une nouvelle pénétration.

L'alimentation ne devrait apporter que des nutriments non allergisants, non antigéniques : soit des protéines entièrement dégradées en acides aminés, molécules simples, sans risque, soit des protéines partiellement dégradées, mais en fragments que l'organisme reconnaîtra comme « conformes » à ses propres constituants. Le lait de femme répond à ces deux critères [Thirion M, 1999]. Mais le rôle de l'allaitement maternel dans la prévention de l'allergie fait encore l'objet de controverses, différentes études menées n'amènent pas aux mêmes résultats, mais cela peut s'expliquer par le fait que les méthodes employées sont différentes d'une étude à l'autre, par la complexité immunologique du lait maternel et par les différences génétiques des patients [Triaa Benhammadi, 2009].

2.3.3 Protection contre les infections

Selon la littérature, l'allaitement maternel rendrait les enfants plus résistants.

À la naissance, le nouveau-né a un système immunitaire immature. Il a besoin d'une protection efficace en attendant qu'il soit capable de synthétiser ses propres éléments de défense. Le lait maternel intervient alors à plusieurs niveaux [PNNS, 2005] [Lönnerdal B, 2003]. Il contient des substances qui ont une action immuno-modulatrice, participant ainsi au développement du système immunitaire du jeune enfant : hormones (ACTH, cortisol), des facteurs de croissance, des cytokines, des lactoferrines, des nucléotides, oligosaccharides... Il participe aussi directement à la défense contre les infections en s'opposant au développement des bactéries, virus et champignons par la présence de nombreuses protéines et cellules ayant une action cytolytique sur certains agents pathogènes : transport d'anticorps (immunoglobulines), activité bactéricide (lactoferrines, lysozyme), inhibition du développement bactérien (kappa-caséine), activité antimicrobienne (lactoperoxydase) [Lönnerdal B, 2003] [Scariati, 1997]. Ce sont justement ces derniers points qui nous intéressent dans notre étude, nous voulons caractériser ces peptides et protéines antimicrobiennes dans la salive des nourrissons, étudier leur teneur dans le temps et comparer leur présence chez les enfants allaités au sein ou non.

CHAPITRE II

LA SALIVE

1. GENERALITES

La salive se compose d'environ 99% d'eau et d' 1% de protéines et d'électrolytes. Les trois glandes salivaires principales ; la glande parotide, la submandibulaire (ou sous-maxillaire) et la glande sublinguale, sont responsables de 90 % de la production salivaire totale, alors que les glandes accessoires (muqueuses labiales, palatines, linguales et jugales) contribuent aux 10 % de salive restants (Figure 4).

La production est contrôlée par les systèmes nerveux sympathique et parasympathique. Le système parasympathique est responsable de la sécrétion en eau et électrolyte alors que le système sympathique est responsable de la sécrétion des protéines.

La sécrétion salivaire est un processus continu (0,5 ml/min), qui correspond à une moyenne de 750 ml par 24h [Carpenter, 2013]. Cette sécrétion est néanmoins variable au cours de la journée. Elle augmente au cours d'un repas, diminue la nuit, mais est également sous l'influence de facteurs tel que la position du corps, la taille des glandes, ou encore les médicaments absorbés. Le pH de la salive est variable, mais il est généralement neutre (compris entre 5,5 et 8).



Figure 4 : Les glandes salivaires principales (Source: Docteurcllic.com)

2. FORMATION DE LA SALIVE

En 1954, Thaysen et coll. proposèrent l'hypothèse des deux étapes de formation de la salive. Cette hypothèse repose sur la relation existant entre la concentration des principaux électrolytes salivaires et le débit de sécrétion chez l'Homme. Selon cette hypothèse, la salive est initialement sécrétée sous une forme "primaire" isotonique au niveau des acini, puis rendue hypotonique lors de son transfert au travers des canaux, par des processus de sécrétion et de réabsorption de certains ions spécifiques.

La membrane apicale des cellules canalaire contient les antiports Na^+/H^+ et $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ qui permettent la réabsorption électroneutre de NaCl et la sécrétion de HCO_3^- .

Ainsi, dans les canaux excréteurs, il se produit une réabsorption de Na^+ et Cl^- et une sécrétion de K^+ et HCO_3^- . Parce que l'absorption de Na^+ et Cl^- est plus importante que la sécrétion de K^+ et HCO_3^- et parce que l'épithélium des canaux excréteurs est relativement imperméable à l'eau, la salive devient progressivement hypotonique. Plus le débit salivaire est élevé, moins les mouvements d'ions se produisent dans les canaux excréteurs, de sorte que la composition ionique de la salive se rapproche de celle du plasma.

	Plasma	Salive primaire	Salive finale (repos)	Salive finale (débit élevé)
Na^+	145	160	1,5	50
Cl^-	120	120	22	40
K^+	4	15	25	20
HCO_3^-	24		1	40

Tableau 1 : Concentration ionique de la salive en mM (Source : didel.script.univ-paris-diderot.fr)

3. COMPOSITION

La salive est constituée à 99% d'eau, le reste est composé de résidu sec qui se partage entre substance organique et inorganique [Pellat et al., 2010].

3.1 Constituants organiques

3.1.1 *Protéines*

La substance organique de la salive est majoritairement constituée de protéines ; environ 2,5 g/l à faible débit. La concentration en protéines croît en général avec le débit salivaire. On y trouve des protéines extrinsèques, c'est-à-dire qui proviennent du sérum, et des protéines intrinsèques, qui sont synthétisées par les glandes elles-mêmes.

Les **immunoglobulines (Ig)** sont des protéines extrinsèques. Les plus représentées dans la salive sont les IgA, mais on retrouve également des IgG, des IgM, des alpha et beta globulines [Georges, 2012]

La salive comporte également de nombreuses **enzymes salivaires**, comme l'amylase salivaire, la lipase salivaire, les lysozymes, ou la **lactoperoxydase**. La principale enzyme est l'**amylase salivaire**, qui représente 30% des protéines salivaires totales. Elle est sécrétée par les cellules possédant des grains de zymogène, majoritaire parotidienne, mais également par les cellules intestinales et hépatiques. Elle est active sur les liaisons α 1-4 des polymères glucidiques ; elle participe à la dégradation des amidons alimentaires. Cette action inhibée par le pH acide de l'estomac après déglutition. **La lipase salivaire** est produite au niveau des glandes sublinguales. Cette enzyme peut hydrolyser les triglycérides, les phospholipides, les esters de cholestérol, et de nombreux autres esters [Georges, 2012]

Le **lysozyme** qui correspond à environ 10% des protéines totales, est une glycoprotéine un peu particulière, qui est active sur certaines zones des parois bactériennes, et qui peut détruire un certain nombre de bactéries dans la cavité buccale. Il présente une activité antiseptique.

La salive comporte également des **mucines**, qui sont sécrétées principalement par les glandes sublinguales mais absentes de la salive parotidienne. Il y a deux types principaux de mucines : les mucines de type 1 qui ont un poids moléculaire très élevé, supérieur à 20MDa et les mucines de type 2 qui ont une taille plus faible, un poids moléculaire de 200 kDa. Leur action est liée à une capacité d'adhésion de type microbien : c'est une protection antimicrobienne. Elles sont impliquées dans la protection mécanique, et la formation de gel de mucus [Amerongen AV et al., 2002]

Les **protéines riches en proline (PRP)**, dont 70% des amino-acides sont de la proline, de la glycine ou de la glutamine, ainsi que les **histatines** sont produites en grande majorité par la glande parotide et submandibulaire. La famille des histatines salivaires comprend 12 membres. L'histatine 1 et 3 dérivent d'un gène, les autres sont issues du clivage de ces deux peptides. Les histatines 1, 3 et 5 représentent 85% des histatines présentes dans la salive, et ont la capacité de tuer des levures pathogènes, et en particulier *C. Albicans*.

L'histatine 5 présente l'activité antifongique la plus forte. La **lactoferrine** également présente dans la salive est une protéine fixatrice du fer, appartenant à la famille des transferrines. Elle possède des effets bactériostatiques, bactéricides, virucides et fongicides.

Les **stathérines** secrétées par les glandes parotides, ont un rôle dans la lubrification des surfaces dentaires et participent à l'élaboration de la pellicule exogène acquise [Li J et al., 2004]

Habituellement présentes dans le plasma, la moelle osseuse, les intestins et la peau, on retrouve également les **défensines** de types HNP 1-2-3 ainsi que les β -1 et β -2 défensines dans la salive humaine. La β -défensine, HBD-1 a été identifiée dans tous les échantillons des glandes salivaires. HBD-2 a été identifiée dans une partie des échantillons salivaires ; elle est probablement associée à l'inflammation [Bonass et al., 1999]. La sécrétion des β -défensines dans la salive ainsi que leur sécrétion depuis les cellules épithéliales contribuent à la protection des surfaces des muqueuses orales [Diamond et al., 2009]. L' α -défensine, HNP1-3, a également été détectée dans la salive. Elle est élevée chez les patients avec une inflammation orale [Mizukawa et al., 1999].

L'**albumine**, les **glycoprotéines** ainsi que les **cystatines** sont d'autres protéines présentes dans la salive.

3.1.2 *Autres*

La salive contient également des facteurs de croissance comme le « nerve growth factor » **NGF** et « l'épithelial growth factor » **EGF**. Leurs sécrétions augmentent lors des maladies parodontales. On retrouve également dans ses composants organiques, des **hormones**, de l'**urée**, du **glucose**, de la **créatinine** et du **cholestérol**.

3.2 Constituants inorganiques

Les constituants inorganiques de la salive sont les ions **sodium**, **potassium**, **calcium**, **chlorures**, **phosphates**, **bicarbonates**, et des **métaux** (fer et cuivre).

4. RÔLE DE LA SALIVE

La salive a différents rôles essentiels. Elle a une fonction mécanique de nettoyage ; grâce à son caractère visqueux et au flux salivaire, amplifié par les mouvements des lèvres et de la langue, la salive permet d'éliminer des surfaces muqueuses et dentaires, une bonne partie de la flore pathogène.

Elle permet également la lubrification du tractus bucco-pharyngé, ce qui diminue les frictions inter-muqueuse, protège les muqueuses lors de la mastication, la déglutition et la phonation. Elle joue un rôle dans le processus de réparation des tissus mous, grâce à la présence de facteurs d'accélération de la cicatrisation, en particulier du facteur de croissance épithélial (EGF).

De plus, la salive permet la dissolution des aliments et la détection des goûts ; elle met en solution les molécules, ce qui leur permet d'atteindre les papilles gustatives.

La salive a également une fonction protectrice et des propriétés antimicrobiennes. Par exemple, les mucines salivaires, constituent une barrière protectrice pour les muqueuses en leur évitant de se dessécher, en limitant la pénétration des substances toxiques et irritantes présentes dans les aliments.

Par l'intermédiaire de plusieurs protéines salivaires, comme le lysozyme, la lactoferrine et la lactoperoxydase, douées de pouvoirs bactériostatiques et bactériolytiques, elle a une action antibactérienne directe.

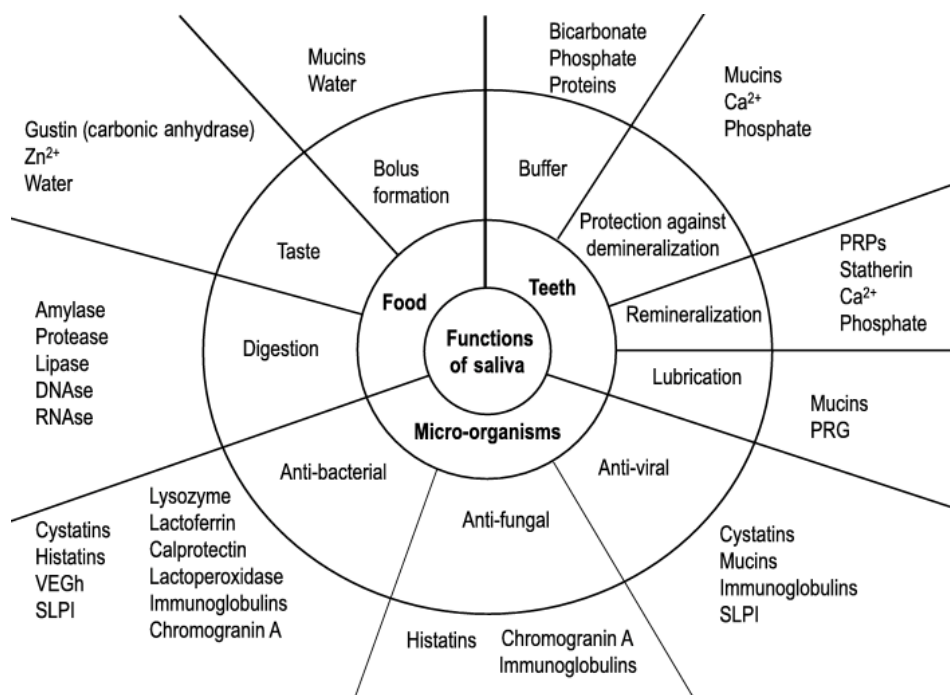


Tableau 2 : Les fonctions de la salive (source salivasaliva.blogspot.fr)

CHAPITRE III

LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS

Pour se défendre face aux agressions des bactéries, champignons, virus ou parasites, la première ligne de défense de l'Homme est l'immunité. En effet, le système immunitaire (inné puis adaptatif) permet de lutter face aux agents infectieux.

L'immunité innée agit dès les premiers instants face à un pathogène, c'est la première ligne de défense non spécifique. Par la suite, l'immunité adaptative intervient pour lutter de manière plus ciblée et spécifique. Des données bibliographiques récentes indiquent que les facteurs de l'immunité innée participent à la mise en place de l'immunité adaptative [Atindehou, 2012].

Les peptides antimicrobiens sont des composants fondamentaux de la défense immunitaire innée [Zasloff, 1992] ; ils correspondent à une réponse non-spécifique, constitutive ou induite par un stimulus immun.

2300 peptides ont été isolés et caractérisés selon les mises à jour de la base de données des peptides antimicrobiens (APD) [Wang, 2009]. Ces derniers sont retrouvés dans tous les organismes vivants (champignons, bactéries, mammifères) [Maroti et al., 2011 ; Rajanbabu et Chen 2011 ; Song et al., 2011].

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons d'abord à la structure des peptides antimicrobiens, et aux différentes classifications. Nous détaillerons les principales familles de peptides, les protéines antimicrobiennes ainsi que leurs domaines et mécanismes d'action.

1- STRUCTURE DES PEPTIDES ANTIMICROBIENS

1.1 Définition d'un peptide

Les peptides sont par convention, des protéines de petite taille, composées de moins de 100 acides aminés (aas) ; la plupart des peptides antimicrobiens ont moins de 50aas.

Il existe une nomenclature internationale pour désigner chaque acide-aminé (Tableau 3).

Nom de l'acide aminé	Code
Alanine	A
Arginine	R
Asparagine	N
Aspartate ou acide aspartique	D
Cystéine	C
Glutamate ou acide glutamique	E
Glutamine	Q
Glycine	G
Histidine	H
Isoleucine	I
Leucine	L
Lysine	K
Méthionine	M
Phénylalanine	F
Proline	P
Sérine	S
Thréonine	T
Tryptophane	W
Tyrosine	Y
Valine	V

Tableau 3: Liste des acides aminés naturels (Source personnelle)

1.2 Structure

La structure primaire d'un peptide correspond à la séquence en aas. Cette séquence est linéaire, et les aas peuvent interagir entre eux pour former des structures secondaires plus complexes.

La structure secondaire peut se trouver sous deux formes :

- l'hélice α
- le feuillet β

La structure tertiaire correspond au repliement de la chaîne protéique.

Certains peptides présentent des structures mixtes en hélice α et feuillet β , d'autres sont des peptides riches en certains aas, comme la glycine, la proline, ou encore l'arginine, qui ne peuvent pas former d'hélice α [Dimarcq et al. 1998]. Ce sont les peptides en hélice α et en feuillet β qui sont les plus nombreux dans les peptides naturels.

2- CLASSIFICATION DES PEPTIDES ANTIMICROBIENS

2.1 Généralités

Les peptides antimicrobiens (PAMs) peuvent être classés en fonction de différents paramètres : leur composition en acides aminés, leur structure ou encore leur mode de synthèse.

En effet, les PAMs sont des peptides endogènes synthétisés par l'organisme. Hancock et Chapple décrivent deux modes de synthèse : la synthèse par voie ribosomale et la synthèse par voie non ribosomale [Hancock et Chapple, 1999].

Les peptides synthétisés par voie ribosomale sont dits naturels, sont présents chez tous les êtres vivants et sont libérés sur le lieu de l'infection lors d'une attaque de l'organisme [Devine, 2003 ; Levy, 2004]. Ceux obtenus par voie non ribosomale se retrouvent essentiellement chez les bactéries et champignons [Hancock et Chapple, 1999]

Nous nous intéresserons ici, à la classification des PAMs, en fonction de leur structure (Figure 5)

Classification des peptides en fonction de leur structure

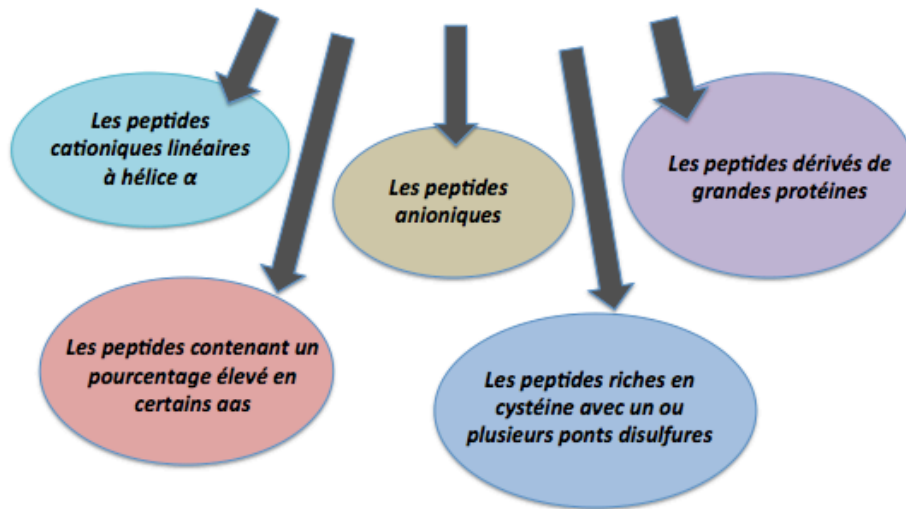


Figure 5 : Classification des peptides (Source personnelle)

2.2 Classification des peptides en fonction de leurs structures

2.2.1 Les peptides cationiques linéaires à hélice α

Ces peptides sont caractérisés par :

- leur taille (inférieure à 40 aa)
- leur caractère amphiphile
- l'absence de cystéine [Tossi A et al., 2000]
- leur structure tertiaire qui forme des nœuds ou articulations [Diamond et al., 2009]

Exemple de peptide cationique linéaire à hélice α : la cathélicidine humaine LL-37 et la cécropine.

2.2.2 Les peptides linéaires riches en certains aas

Pour ces peptides on peut citer :

- l'Histatine, riche en histidine, retrouvé chez les primates et l'homme [Lehrer et al., 1996]

- l'Indolicidine, riches en tryptophane, retrouvé chez les bovins [Van Abel et al., 1995]
- les peptides riche en proline et en arginine : PR-39 chez les porcins

2.2.3 Les peptides riches en cystéine avec un ou plusieurs ponts disulfures

Ces peptides sont cycliques et possèdent plusieurs feuilletts β stabilisés par les ponts disulfures qui s'établissent entre les résidus de cystéine.

Ces peptides peuvent contenir 2 à 8 cystéines qui forment des structures de type « épingle à cheveux ». Il existe des peptides à un, deux, trois ou quatre ponts disulfures.

Les principaux représentant de cette dernière catégorie sont les défensines [Dimarcq et al., 1990 ; Lehrer et Ganz, 1996 ; Dimarcq et al., 1998]

2.2.4 Les peptides dérivés de grandes protéines

Les PAMs générés à partir de grandes protéines sont obtenus par protéolyse. C'est le cas de tous les peptides dérivés des granines [Briolat et al., 2005] ou encore des peptides dérivés de la pro-enkephaline A [Goumon., 1996]. Nous développerons le cas particulier des granines qui nous intéressent, dans un prochain paragraphe.

2.2.5 Les peptides anioniques

Les premiers peptides anioniques sont découverts en 1992 dans le liquide bronchoalvéolaire des ovins [Brogden et al. 2003]. En général, les peptides sont de petites molécules, riches en acide glutamique et en acide aspartique, qui donnent le caractère anionique. Ils sont présents au niveau d'extraits de surfactants, dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire et dans les cellules épithéliales ciliées des voies aériennes. Ils requièrent la présence de Zinc comme co-facteur pour leur action biologique et sont actifs contre les bactéries à Gram positif et négatif [Brogden, 2005]. Un de ces peptides, possédant 47 aa, a été identifié dans la sueur humaine : la Dermacidine [Schitteck et al., 2001]. Certains peptides dérivés des neuropeptides sont anioniques comme le Peptide B et l'Enkélytine [Metz-Boutigue et al., 1998].

3- PRINCIPALES FAMILLES DE PEPTIDES ANTIMICROBIENS

3.1 Les défensines

Les défensines sont des peptides antimicrobiens cationiques, de poids moléculaire compris entre 3 et 5kDa. Ce sont des molécules résistantes aux protéases et qui contiennent trois ou quatre ponts disulfures [Hoffmann et al. 1999].

On compte actuellement plus de 100 défensines, principalement chez les mammifères et les oiseaux [Diamond et al., 2009]. Il existe trois sous-familles :

- les α -défensines
- les β -défensines
- les θ -défensines

Seules les α et β -défensines sont présentes chez l'Homme [Izadpanah et al., 2005]. Ces défensines sont riches en arginine et possèdent six résidus de cystéine, formant trois ponts disulfures intramoléculaires [Chen et al., 2003 ; Guani- Guerra et al., 2010].

Les α -défensines, dites « classiques » comportent 29 à 35 aa [Diamond et al., 2009 ; Kagan et al., 1994]. On les retrouve dans les granules des neutrophiles, dans les cellules intestinales de Paneth, et également dans les macrophages. Chez l'homme, elles constituent plus de 5% des protéines totales contenues dans les neutrophiles. [Fabiano, 2012]

Ces peptides inhibent la croissance de bactéries à Gram positif et négatif, mycobactéries, champignons, et levures [Lehrer et al., 1993 – Borenstein et al., 1991]. Ils sont cytotoxiques pour de nombreuses cellules normales ou tumorales [Lehrer et al., 1993]

Chez l'homme, six α -défensines ont été mises en évidence. Quatre de ces peptides se nomment peptides neutrophiles humains (HNP) car ils ont été découverts dans les neutrophiles : HNP-1, -2, -3, -4 [Braff et al., 2005]. La défensine HNP-1 est présente dans la salive de patients atteints d'infections buccales et de cancers buccaux [Mizuwaka et al., 1998]

Les défensines β , sont des peptides de 36 à 42 résidus présents au niveau des épithéliums cutanés, des muqueuses orales, des glandes salivaires. Ils sont actifs contre un large spectre de bactéries et de champignons [Jia et al., 1999 ; Kagan et al., 1994]. Contrairement, à la

défensine classique, les β -défensines sont sous le contrôle d'éléments régulateurs essentiels lors de l'inflammation et dans les mécanismes de défense [Kopp et Ghosh, 1995].

3.2 Les cathélicidines humaines LL-37

La cathélicidine humaine (LL-37) est un peptide cationique linéaire à hélice α . Elle est la seule de la famille des cathélicidines à être identifiée chez l'Homme. [Larrick et al., 1994]

Elle est retrouvée essentiellement dans les granules azurophiles des cellules neutrophiles, et nommée LL-37 [Bowdish et al., 2005].

Ce peptide a une action rapide, puissante et un large spectre d'activité antibactérien [Zanetti, 2004]. Il est particulièrement actif sur *Shigella spp*, *S. aureus*, *E. coli* ou encore *S. pyogenes* et *agalactiae* [Guani-Guerra et al., 2010].

Les cathélicidines ont un segment pro-peptide N-terminal bien conservé, et sont dérivées d'une protéine précurseur appelée l'HCAP18 (du fait de sa masse de 18kDa).

3.3 Les histatines

L'histatine est un peptide antimicrobien contenant un pourcentage élevé en histidine. En 1988, les histatines 1, 3 et 5 ont été isolées dans la salive humaine. [Oppenheim et al., 1988]. Ces trois histatines ont la capacité de tuer des levures pathogènes, et en particulier *C. Albicans*.

La famille des histatines salivaires comprend 12 membres : l'histatine 1 et 3 dérivent d'un gène, les autres sont issues du clivage de ces deux peptides.

En effet, en dehors de leur activité antimicrobienne, les histatines présentent une forte activité antifongique vis-à-vis des plusieurs espèces de *Candida*, de *Saccharomyces* et *Cryptococcus neoformans* [Rayhan et al., 1992]. L'histatine 5 est la plus importante, et elle présente l'activité antifongique la plus forte parmi l'ensemble de la famille des histatines [Puri S., 2014].

Les histatines 1, 3 et 5 participent également à la formation d'une pellicule protectrice au niveau de la surface des dents, qui prévient la colonisation microbienne. [Siqueira, 2010]

4- LES PROTEINES ANTIMICROBIENNES

4.1 Le lysozyme

Le lysozyme (130 aa) a été découvert dans la salive par Alexandre Fleming en 1922, et a été reconnu comme étant la première protéine antimicrobienne [Yount et al., 2012]. C'est une molécule antimicrobienne, dont la masse moléculaire est proche de 15kDa, et qui est active contre les bactéries à Gram positif et négatif [Glynn 1968], les champignons [Nakamura et al., 1998] et les levures [Marquis et al., 1982].

L'activité antibactérienne provoque la dégradation de la paroi des bactéries à Gram +. Le lysozyme réduirait la force mécanique de la paroi et entraînerait la lyse de la bactérie.

4.2 La lactoferrine et les lactoferricines B et H

La lactoferrine est une glycoprotéine de 80kDa [Metz-boutigue et al., 1984] qui a été associée à de nombreux effets biologiques dans la défense de l'organisme, la régulation de la croissance et la différenciation cellulaire [Sanchez et al., 1992]

La lactoferrine est connue pour ses activités contre les bactéries pathogènes, les champignons, et les virus [Arnold et al., 1980, Fritsch et al., 1987]. Elle a la capacité de chélater des ions ferriques et pourrait ainsi empêcher la croissance des microorganismes. Elle est capable de déstabiliser la membrane externe des bactéries à Gram négatif [Ellison et al., 1988].

4.3 La séminalplasmine

La séminalplasmine est un peptide antimicrobien isolé du plasma séminal bovin [Reddy et Bhargava, 1979]. Il a une action inhibitrice de la prolifération des lymphocytes [Derwenskus et al., 1989], et est actif contre un large spectre de bactéries à Gram positif et négatif ainsi contre des levures et ne possède pas d'activité hémolytique.

4.4 Les granines

4.4.1 *Généralités*

Les granines sont des glycophosphoprotéines acides (180 à 700 résidus), présentes dans les granules de sécrétion des cellules nerveuses, endocrines, neuroendocrines et immunitaires [Huttner et al., 1991 ; Metz- Boutigue et al., 1998]. Elles sont stockées dans les vésicules de grande taille appelées vésicules à cœur dense (LDCV, *Large dense Core Vesicule*) [Winkler, 1992] des neurones et sont secrétées par les cellules chromaffines de la médullosurrénale et les neuropeptides.

4.4.2 *Les chromogranines*

C'est en 1965 que Banks découvre la chromogranine A (CGA), premier membre de cette famille de protéines, qui est libérée en même temps que les catécholamines lors de l'exocytose [Banks et Helle, 1965] mais ce n'est qu'en 1967, qu'elle reçoit ce nom [Blaschko et al., 1967]. Plus tard, d'autres protéines ont été découvertes et intégrées dans la famille des granines qui comporte à présent 9 membres [Helle, 2004 ; Chakraborty et al., 2006], se répartissant en deux groupes : les chromogranines (CGs) et les sécrétogranines (SGs).

Les granines présentent des propriétés biologiques, moléculaires et cellulaires décrites dans différentes revues [Huttner et al., 1991 ; Helle, 2004]. Elles sont capables de se lier au calcium et d'intervenir dans la genèse des granules de sécrétion et la sécrétion [Kim et al., 2001 ; Beuret et al., 2004]. Les granines sont des marqueurs de tumeurs neuroendocrines [Bartolomucci et al., 2010] et de gravité (SIRS, *Systemic Inflammatory Response Syndrome* et sepsis) [Zhang et al., 2008]. Une revue de Willis [Willis et al., 2011] détaille l'implication des granines dans les pathologies neurologiques (la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la sclérose en plaques). La CGA est également impliquée dans les maladies inflammatoires [Helle, 2010].

Les rôles biologiques des peptides dérivés des granines ont été identifiés dans plusieurs études. Les plus connus sont les peptides dérivés de la chromogranine A : la catestatine (CAT) et la chromofungine (CHR).

Les chromogranines sont produites et stockées dans les cellules hypophysaires, les cellules C de la thyroïde, les cellules de la parathyroïde, les cellules chromaffines, et les cellules

immunitaires (neutrophiles) [Montero- Hadjadje et al., 2008 ; Lugardon K, 2000 ; Zang D, 2008].

Les CGs ont été retrouvées dans de nombreuses espèces : Humaine, Bovine, Rats, Souris, Poissons, Batraciens. La proportion relative des différentes chromogranines varie d'une espèce à une autre. Ainsi dans les cellules chromaffines du bœuf, la CGA est plus importante que dans celles du mouton et du cheval tandis que chez l'homme, c'est la CGB qui domine de même que chez le rat [Fischer-Colbrie et Schober, 1987]. Bien que ce soit la CGB qui est majoritaire chez l'homme, c'est la CGA qui a été la mieux étudiée car plus accessible à partir des surrénales de bœuf.

La chromogranine A est une protéine acide composée de 439 résidus (457 avec la séquence signal) chez l'homme ; 431 (449 avec la séquence signal) chez le bœuf. Le gène responsable est localisé sur différents chromosomes en fonction des espèces ; respectivement les chromosomes 14 et 21 pour les espèces précitées. La masse moléculaire apparente de la CGA est de 49kDa chez l'homme et 48kDa chez le bœuf mais sur un gel SDS-PAGE, elle est détectée à 70kDa du fait des modifications post-traductionnelles et des charges négatives qui retardent la migration électrophorétique.

○ La catestatine

La catestatine a été citée pour la première fois par Mahata en 1997. C'est un peptide naturel, inhibiteur non compétitif de la nicotine, obtenu par clivage protéolytique de la CGA (hCGA352-372 et bCGA 344-364). On l'appelle familièrement « la protéine anti-stress », elle bloque la sécrétion des catécholamines dans les états de stress.

Trois variantes humaines ont été identifiées : Gly364Ser, Pro370Leu et Arg374Gln. Elles jouent le même rôle que la catestatine de type sauvage dans l'inhibition du processus nicotinique [Mahata et al., 2004] et la baisse de la pression artérielle [Rao et al., 2007]. La catestatine présente également un effet vasodilatateur [Kennedy et al., 1998]. Elle intervient dans la régulation de l'activité cardiovasculaire [Helle, 2004] et peut servir de marqueur dans les tumeurs carcinoïdes de l'appendice [Prommegger et al., 2003].

La catestatine est une hormone dont le rôle antimicrobien a été montré sur des bactéries, des champignons et des levures [Briolat et al., 2005]. Elle présente également une activité antiparasitaire sur le *P. falciparum* [Akaddar A et al., 2010]. Les expériences d'Egger en 2008 montrent que la catestatine joue un rôle chimioattracteur sur les monocytes, et suggère ainsi

qu'elle est une cytokine inflammatoire [Egger et al., 2008]. Elle stimule également la production d'interleukine-8 par les kératinocytes humains *via* l'activation des protéines kinases par les mitogènes [Aung et al., 2011] et induit la dégranulation des mastocytes entraînant la libération des histamines au site d'inflammation [Kruger et al., 2003]. Elle contribue à la cicatrisation des plaies en augmentant la migration et la prolifération des kératinocytes au site de la plaie.

- **La chromofungine**

La chromofungine correspond également à une séquence très conservée de la CGA au cours de l'évolution. Elle est identique chez l'humain et le bovin. Elle possède des propriétés antifongiques et des propriétés antibactériennes [Lugardon et al., 2001]. Elle adopte une structure hélicoïdale et pénètre dans les monocouches lipidiques. Insérée dans des films de multicouches de polyélectrolytes, elle conserve son activité en inhibant la croissance fongique [Etienne et al., 2005]. Des expériences chez le rat ont montré que la chromofungine a un rôle anti-nociceptif ou pro-nociceptif en fonction de la concentration de peptide utilisé [Ghia et al., 2004]. En effet, la chromofungine injectée avant l'induction d'une inflammation par l'acide acétique empêche l'inflammation et diminue la perception de la douleur.

5- DOMAINES D' ACTIONS DES PAMs

Les PAMs ont, comme leur nom l'indique, une activité antimicrobienne, mais ils présentent également d'autres activités.

5.1 Activité antimicrobienne

Basé sur l'APD, la majorité des PAMs peuvent inhiber la croissance bactérienne. Ils présentent un large spectre d'activité contre les bactéries à Gram positif et Gram négatif [Wang, 2009]

5.2 Activité antivirale

Sur les 103 AMPs humains, 16 sont virucides. Ils incluent par exemple les six α -défensines (HNP-1, HNP-2, HNP-3, HNP-4, HD-5, and HD-6), trois β -défensines (hBD-1, hBD-2, and hBD-3), la cathélicidine LL-37, et l'histatine 5.

5.3 Activité antifongique

Dans l'APD, 58 PAMs humain sont fongicides. Exemples typiques : les α -défensines, la cathélicidine LL-37, et les histatines. LL-37 est essentiellement inhibiteur de *Candida Albicans*. [López-García, 2005]

5.4 Activité antiparasitaire

Certains PAMs humains présenteraient une activité antiparasitaire, ce serait le cas de l'HNP-1, LL-37 ou RNase 2 et 3 par exemple. Ces derniers seraient les premiers PAMs humain pour lesquels une activité antiparasitaire aurait été démontrée [Hamann 1990]

Exemple plus récent pour l'HNP-1 qui serait actif contre des formes de *leishmania major* [Dabirian, S, 2013]

5.5 Activité anticancéreuse

Il y a un intérêt croissant dans le développement des PAMs comme peptides anticancéreux. Un effet anticancéreux a été prouvé pour les magainines, les cécropines et les défensines [Baker, 1993 ; Winder, 1998 ; Lichtenstein, 1986] Par exemple, une surexpression de défensines, ou de la cathélicidine humaine LL-37 servirait comme bio marqueur pour le diagnostic des cancers [Van den Broek, 2010 ; Albrethsen, 2005 ; 2006]

Des fragments de LL-37, avec des effets anticancéreux *in vivo* et *in vitro* démontrés, pourraient constituer des modèles utiles pour la conception de nouveaux médicaments antitumoraux, et en particulier pour ceux résistants aux traitements existants [Li, 2006 ; Ren, 2013].

5.6 Effet cytotoxique

L'effet cytotoxique est un effet lithique sur les cellules de l'hôte. En général, on utilise un test sur les hématies. Si le peptide est capable de lyser les hématies à sa concentration antimicrobienne, il est considéré comme cytotoxique. Néanmoins, certains PAMs ne sont pas toxiques, ils reconnaissent de façon spécifique la membrane du pathogène. L'ergostérol

favorise l'insertion et la pénétration du peptides, alors que le cholestérol bloque ces mécanismes [Lugardon et al., 2001]

5.7 Autres fonctions biologiques

En plus de ces nombreuses activités, de nombreux PAMs possèdent encore d'autres fonctions comme l'apoptose et la cicatrisation des plaies.

6- MECANISMES D'ACTION

Les peptides peuvent avoir différents modes d'action en fonction de leurs cibles cellulaires et de leurs activités. Il peut y avoir des mécanismes d'action membranaire ou des mécanismes d'action intracellulaire.

6.1 Les mécanismes d'action membranaire

Diamond et ses collègues différencient trois étapes dans le mécanisme d'action [Diamond et al., 2009] : tout d'abord l'attraction entre le peptide et le pathogène, puis l'attachement du peptide à la surface du pathogène et enfin la pénétration du peptide à l'intérieur du pathogène.

Au cours de la première étape (l'attraction), les PAMs cationiques (la grande majorité) sont attirés par interaction électrostatique avec les membranes des bactéries ou champignons chargées négativement [Nizet, 2006]. La deuxième étape (l'attachement) met en jeu l'interaction électrostatique qui engendre une déstabilisation de la membrane externe. La troisième étape est l'insertion. Un facteur important pour la pénétration du peptide est son caractère amphipathique (c'est-à-dire qu'il contient une face hydrophile et une face hydrophobe) permettant son insertion dans la membrane des pathogènes. Le peptide pénètre dans la cellule et peut interagir avec les cibles cytoplasmiques [Atindehou, 2012]. Les trois modèles d'insertion habituellement proposés sont le modèle des pores en tapis, toroïdaux ou en douves de tonneaux (Figure 6).

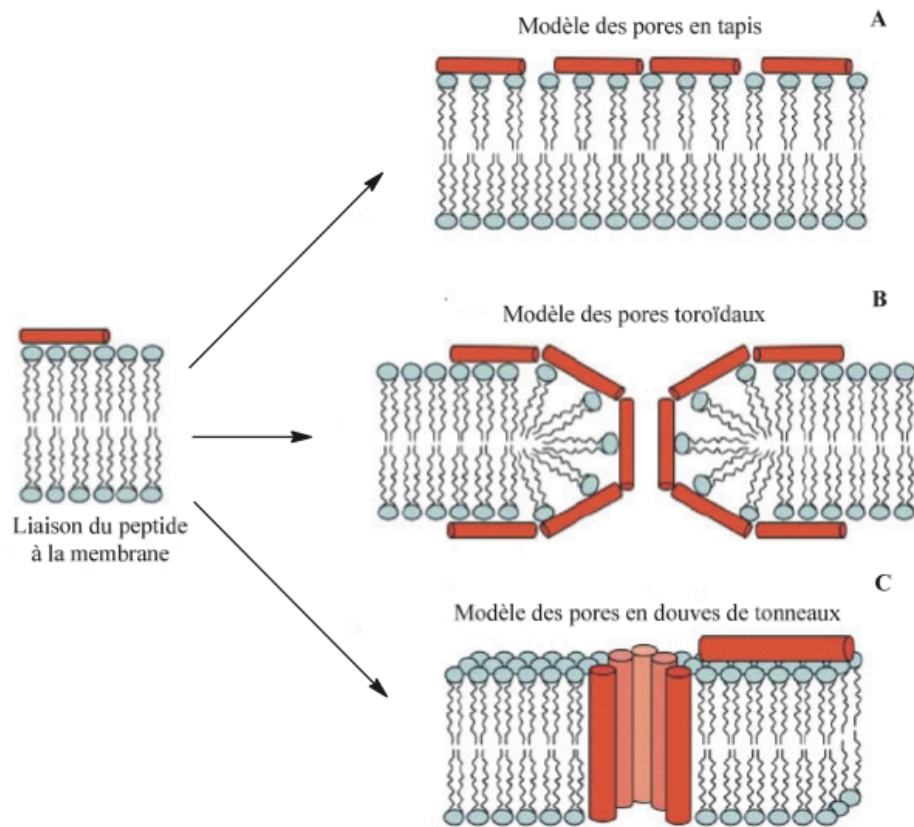


Figure 6: Insertion membranaire des PAMs dans les cellules (Source : Sanderson, 2005)

6.2 Les mécanismes d'action intracellulaire

En plus des mécanismes d'action membranaire, les PAMs peuvent également pénétrer dans les cellules de l'hôte et se retrouver dans le cytoplasme (Figure 7). A l'intérieur, plusieurs cibles peuvent être visées : les voies de synthèse métabolique des pathogènes, la synthèse des acides nucléiques, la synthèse des protéines, l'activité enzymatique et la synthèse de la paroi [Brogden et al., 2003 ; Brogden, 2005 ; Jenssen et al., 2006].

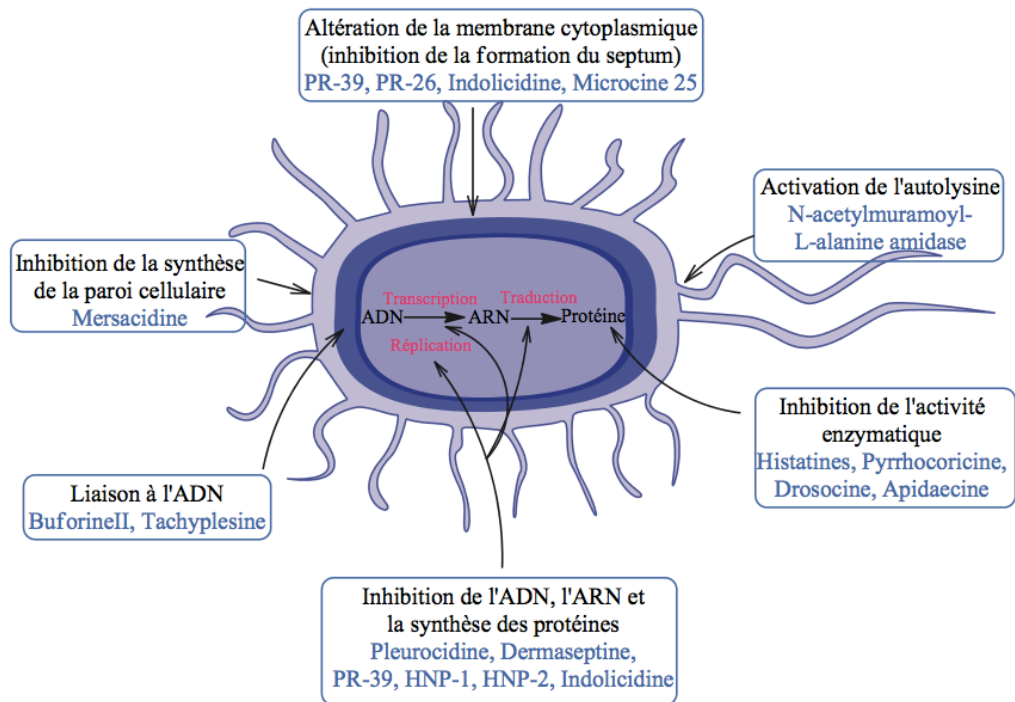


Figure 7: Mécanismes d'action intra-cellulaires des PAMs (Source : Brodgen, 2005)

2ème PARTIE: ETUDE PERSONNELLE

CHAPITRE IV

MATERIELS ET METHODES

1- LE MATERIEL

1.1 Prélèvements salivaires des nourrissons

La prise de contact avec les futures mamans a été réalisée, en grande majorité, par le Centre Médico-Chirurgical Obstétrical (CMCO) de Schiltigheim. Les autres proviennent de mon entourage, ou de connaissances. L'étude cible les nourrissons allaités au sein de façon exclusive durant leurs premiers mois. Seize mamans ont accepté de participer, elles ont reçu une notice explicative et un consentement à signer, que j'ai rédigé.

Pour les nourrissons nés, dans le cadre du CMCO, un prélèvement à JO, c'est-à-dire directement après l'accouchement et avant le contact avec le lait maternel, a été réalisé par les sages femmes. Pour les autres nourrissons, le premier prélèvement salivaire a été réalisé par les mamans à J+2 généralement.

Lorsque la durée d'allaitement l'a permis, les prélèvements ont été réalisés à 15 jours, 1 mois, 3 mois et 6 mois (Tableau 4). Ils sont obtenus à l'aide de micropipettes en plastique, transvasés dans des tubes Eppendorf d'1,5ml, et ont été conservés jusqu'à 4 jours à 4°C, et ensuite à -20°C.

	JO	J2-3	J15	1mois	3mois	6mois	8mois	Autres prélèvements
Alexandre			X	X	X	X		
Maud		X	X	X	X	X	X	
Ava		X	X	X	X			
Lisa			X	X	X	X		4 mois
Aïden	X			X	X	X		
Emy				X				2 mois
Sasha	X		X	X				2,5 mois
Raphaël	X		X	X				1,5 mois
Logan	X		X	X				
Lena			X					
Faustine	X			X	X			
Nicolas			X	X				
Rosalie								2,5 ans
x	X							
x	X							
x	X							

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des prélèvements salivaires (Source personnelle)

2- LES METHODES

2.1 Chromatographie par HPLC de phase inverse des extraits salivaires

○ *Principe général d'une chromatographie*

L'HPLC (= High Performance Liquid Chromatography) permet la séparation des constituants d'un mélange. La séparation des molécules se fait en fonction de l'hydrophobicité et de la taille des protéines.

○ *Description du système chromatographique*

Il y a un fluide appelé phase mobile qui parcourt un tube, appelé **colonne**. La colonne peut contenir des « granulés » poreux (colonne remplie) ou être recouverte à l'intérieur d'un film mince (colonne capillaire). Dans les deux cas, la colonne est appelée phase stationnaire.

Le principe d'une chromatographie est une phase normale sur laquelle des chaînes alkyles (ou autres) ont été greffées. Une phase stationnaire est dite « normale » quand elle est polaire et hydrophile et on parle de phase « inverse » quand elle est apolaire et hydrophobe.

A l'instant initial, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il se dilue dans la phase mobile qui l'entraîne à travers la phase stationnaire (la colonne). Si elle est bien choisie, les constituants du mélange, appelés généralement les solutés, sont inégalement retenus lors de la traversée de la colonne. Plus le soluté est hydrophobe plus il sera retenu au niveau de la phase stationnaire. A charge égale, plus le peptide sera long, plus il sera également retenu. Un **détecteur** placé à la sortie de la colonne couplé à un **enregistreur** permet d'obtenir un tracé appelé **chromatogramme**. En effet, il dirige sur un enregistreur un signal constant appelé ligne de base en présence du fluide porteur seul, au passage de chaque soluté séparé il conduit dans le temps à l'enregistrement d'un pic.

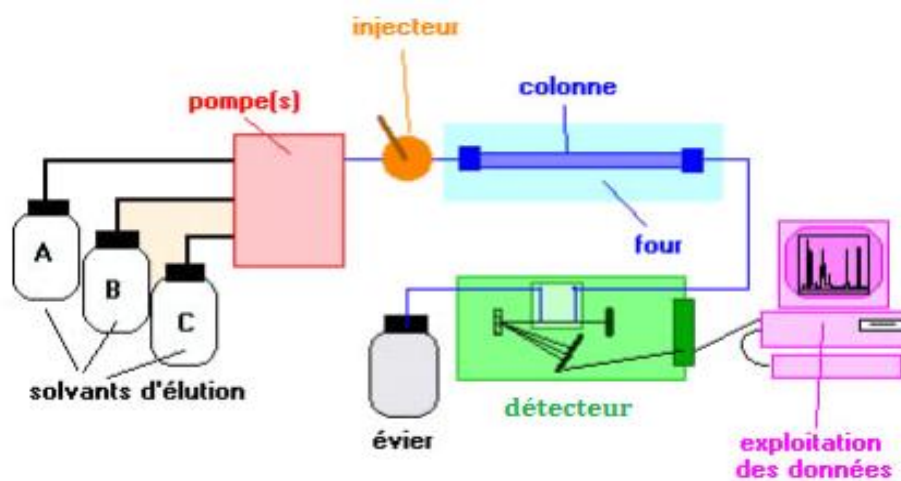


Figure 8 : Principes de fonctionnement d'une HPLC (Source: memoireonline.com)

○ *Technique expérimentale*

L'HPLC nous permet ici de séparer les différents constituants de la salive. Pour les premières analyses salivaires, les prélèvements utilisés sont mélangés avec le même volume de TFA 0,1%, puis des aliquots de 200 μ L sont réalisés. Nous n'avons abouti à aucun résultat cela étant lié à l'importante dilution des prélèvements, associée à une HPLC pas assez précise.

Après la mise au point de la préparation des échantillons et du choix de l'HPLC, nous avons défini la technique expérimentale. Les analyses suivantes sont donc réalisées sur le système Dionex-Ultimate 3000, qui permet de détecter des quantités de matériel de l'ordre du picogramme.

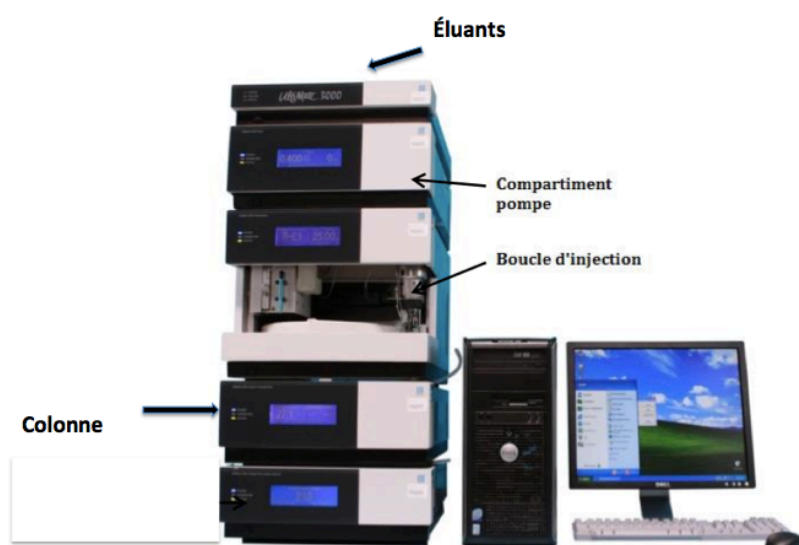


Figure 9 : HPLC Dionex Ultimate 3000 (Bibliothèque personnelle)

Pour notre étude, nous avons travaillé en phase « inverse ». La phase stationnaire utilisée est un support de silice greffé par des chaînes aliphatiques de 8 atomes de carbone. La phase mobile est constituée de 2 solvants : un solvant A polaire (composé d'un mélange d'eau et d'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,1%) et un solvant B hydrophobe (composé d'acétonitrile 70,00%, d'eau 29,91% et de TFA 0,09%).

La colonne utilisée est une Vydac 208TP (2,1mm x 150mm) dont la taille des billes est de 5µm, le diamètre des pores est de 300Å et qui se trouve dans un four à une température de 40°C. Nous injectons un volume de 50µL de salive pur. Nous travaillons à une température ambiante de 25°C et à un débit de 0,2mL/min. La méthode de détection de l'HPLC se fait à 214nm, spécifique du maximum d'absorption de la liaison peptidique. Le prélèvement est fait de façon manuelle, chaque pic est conservé dans des eppendorf d' 1,5mL à 4°C.

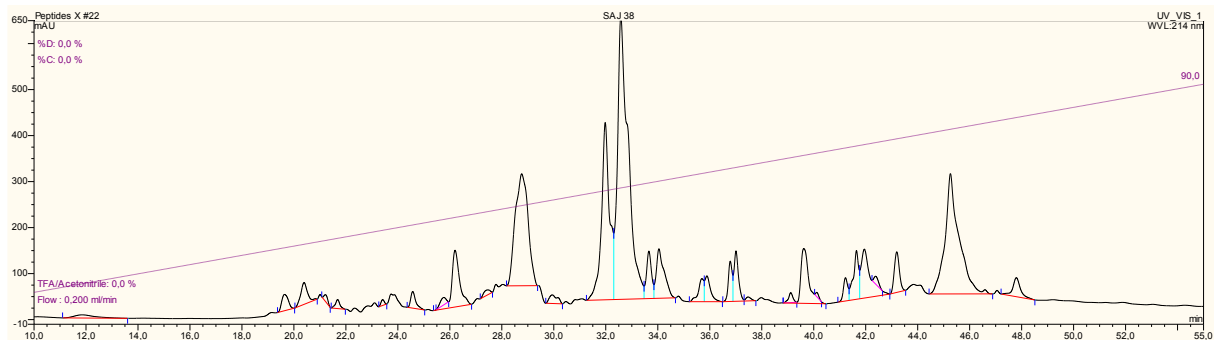


Figure 10 : Exemple d'un chromatogramme (SAJ 38- Maud, 6 Mois- Source personnelle)

2.2 Tests antimicrobiens

Les pics majoritaires récoltés par HPLC subissent des tests antimicrobiens, qui sont réalisés sur la souche d'intérêt *C.albicans*, et *M.luteus*. Les tests sur *M.luteus*, qui est une souche moins virulente, sont réalisés pour discriminer les peptides qui n'ont pas d'activité antimicrobienne de ceux qui sont actifs. L'ensemble des manipulations est réalisé en conditions stériles, sous poste de sécurité microbiologique (PSM).

Avant tout test antibactérien il faut réaliser la veille une pré-culture. La pré-culture consiste à mettre les souches en culture afin d'obtenir une phase exponentielle de croissance. Elle est réalisée par inoculation d'une colonie dans 6mL de milieu liquide Mueller Hinton Broth (MHB) à l'aide d'une oese stérile. Un tube témoin contenant 6mL de milieu sans colonie est également réalisé, afin de s'assurer de la stérilité du milieu utilisé. L'ensemble est placé en incubateur à 37°C sous agitation pendant 18h.

Les tests antimicrobiens sont réalisés sur une plaque de 96 puits avec une suspension bactérienne de densité optique mesurée à 620nm (DO₆₂₀) de 0,001. Cette suspension est préparée à partir de la pré-culture : la DO₆₂₀ de la pré-culture est mesurée, puis la suspension est diluée de manière à obtenir une DO₆₂₀ de 0,001. Dans chaque puits ont été déposés 90µL de cette suspension bactérienne et 10µL de solution de peptides. Chaque condition est testée en triplicata.

Un contrôle (C), un témoin négatif (T-) et un témoin positif (T+) d'inhibition de croissance sont également réalisés (Figure 11). Le contrôle (C) correspond à 90µL de milieu et 10µL d'eau, le témoin négatif (T-) correspond à 90µL de suspension bactérienne et 10µL d'eau, soit à 100% de croissance bactérienne (absorbance maximale). Le témoin positif (T+) est composé de 90µL de suspension bactérienne ajoutée de 10µL d'un mélange antibiotique, et correspond à 100% d'inhibition de croissance bactérienne (absorbance minimale). La plaque est ensuite couverte d'un film pour microplaque et entourée par du parafilm, puis mise à incubation à 37°C sous agitation pendant 24h. Après incubation, les DO₆₂₀ des différents puits (M) sont lues grâce à un lecteur de plaque (Multiskan EX, Thermo), permettant de déterminer le pourcentage d'inhibition de croissance de nos peptides selon la formule suivante : **% Inhibition** : $[(M) - (C)] \times 100 / [(T-)-(C)] - [(T+) - (C)]$.

La CMI correspond alors la plus petite concentration peptidique pour laquelle on observe une inhibition de croissance microbienne.

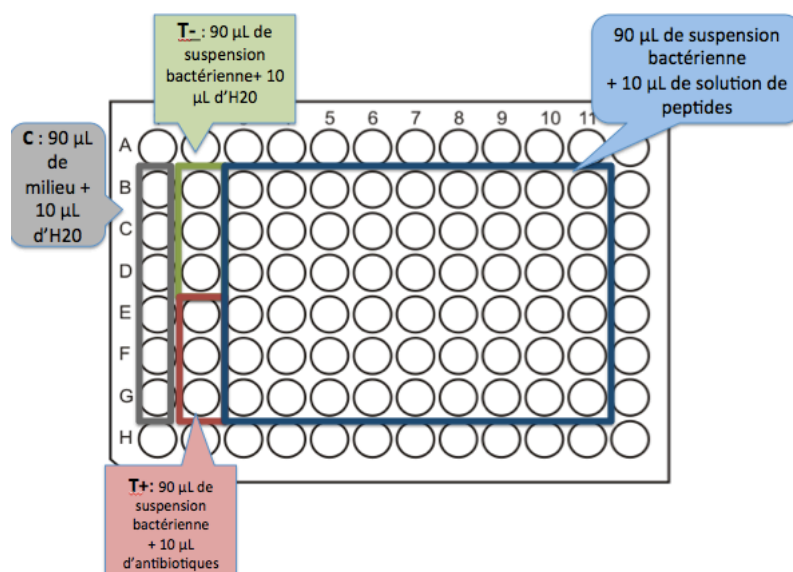


Figure 11 : Organisation type d'une plaque (Source personnelle)

2.3 Spectrométrie de masse

Les analyses de spectrométrie de masse de nos échantillons ont été réalisées au Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique (LSMBO) situé à Strasbourg par le docteur Jean-Marc Strub. La spectrométrie de masse permet de détecter et d'identifier des protéines et des peptides par détermination de leur masse moléculaire. La méthode MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight) permet en particulier la séparation des molécules selon leur rapport masse/charge. Grâce à cette technique, la masse de la molécule est déterminée puis comparée à celle attendue pour nos peptides.

2.4 Séquençage

Les pics obtenus après HPLC qui présentent une activité antibactérienne sont analysés par séquençage protéique. Le séquençage est utilisé ici pour déterminer la séquence N-terminal des pics, et donc permettre l'identification de la protéine. C'est une réaction de dégradation récurrente du peptide en commençant par l'extrémité $-NH_2$ terminale et basée sur la réaction d'Edman avec l'utilisation du Phénylthiocyanate (PITC) comme réactif de couplage (Edman, 1950). Le séquenceur utilisé est un Procise (Applied Biosystem 473A Courtaboeuf, France). Tous les produits utilisés pour le séquençage peptidique proviennent de chez Applied Biosystem (Life Science Technologies).

Le séquençage suit trois étapes principales :

- ***Le couplage***

Le PITC (réactif d'Edman) réagit avec l'acide aminé N-terminale de la séquence pour produire un phénylthiocarbamyl-amino acide (PTC-aa). La réaction a lieu en présence de la N-méthylpipéridine à pH =8 (Figure 12) [Atindehou, 2012].

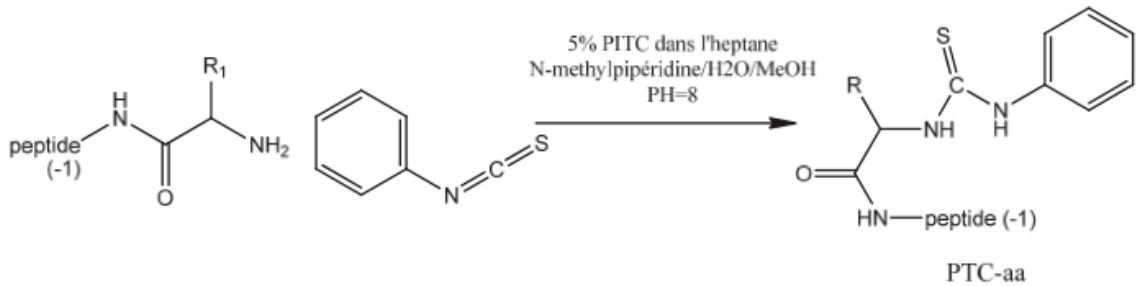


Figure 12 : Réaction de couplage dans la réaction d'Edman (Source : Atindehou, 2012)

o *Le clivage*

Le clivage a lieu en milieu acide anhydre, c'est la présence d'acide TriFluoroAcétique (TFA) qui va provoquer la rupture de la liaison peptidique entre l'acide aminé 1 et l'acide aminé 2. L'AnilinoThiaZolinone (ATZ-aa) obtenue est très instable, il faut la convertir pour permettre l'identification de l'aa détaché (Figure 13).

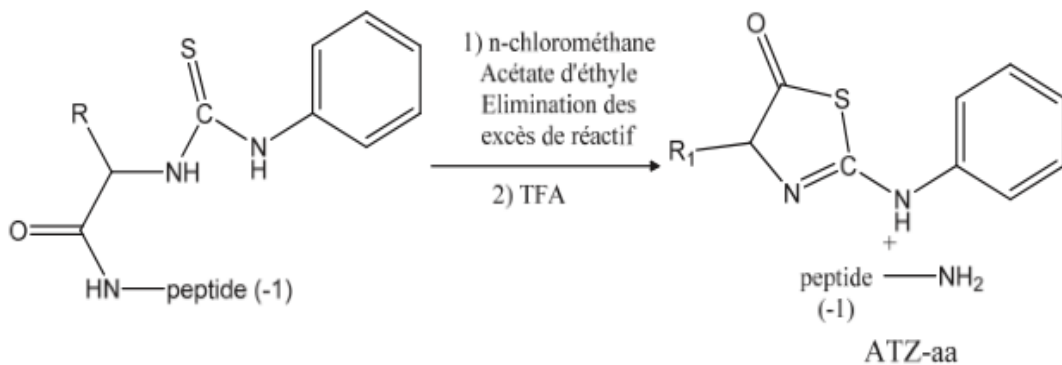


Figure 13 : Réaction de clivage dans la réaction d'Edman (Source : Atindehou, 2012)

o *La conversion*

Nous placerons notre composé dans un milieu acide (TFA = eau 25%) une hydrolyse va permettre la transformation d'ATZ-aa en PhénylThioHydanthoïne (PTH-aa) qui est le composé stable et porteur du radical de l'acide aminé N-terminal que l'on souhaite identifier.

Le PTH-aa va être chromatographié par HPLC en phase inverse et son temps d'éluion sera comparé à ceux d'un mélange des différents PTH aas (Figure 14) [Atindehou, 2012].

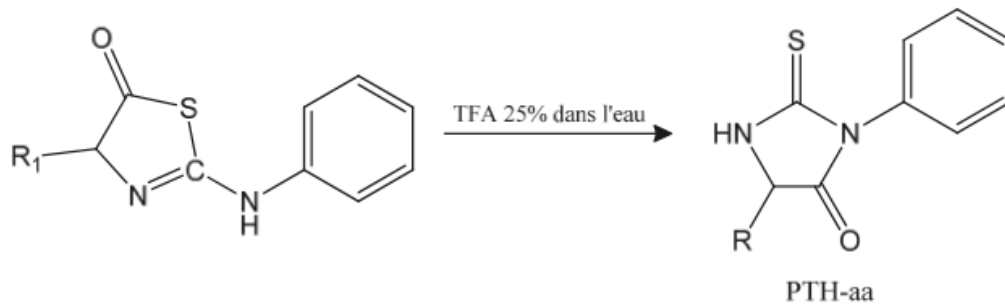


Figure 14 : Réaction de conversion dans la réaction d'Edman (Source : Atindehou, 2012)

Les peptides en solution dans le TFA 0,1% sont déposés sur un filtre en fibre de verre qui a été traité préalablement au polybrène (Biobrene Plus). Les acides aminés qui seront convertis en Phénylthiohydantoin-amino acides (PTH-aas) au cours du séquençage sont chromatographiés par HPLC de phase inverse sur une colonne Spheri-5 PTH C18 (2,1 x 220 mm), granulométrie 5 µm qui est à 55°C au départ. Les éluants sont le solvant A : tétrahydrofurane 3.5% et Premix 2% dans de l'eau et le solvant B, acétonitrile (88%) et propanol (12%). La détection des PTH-aas est obtenue à 269 nm.

L'identification des PTHaas se fait par comparaison avec le chromatogramme des PTH-aas standards (Figure 15).

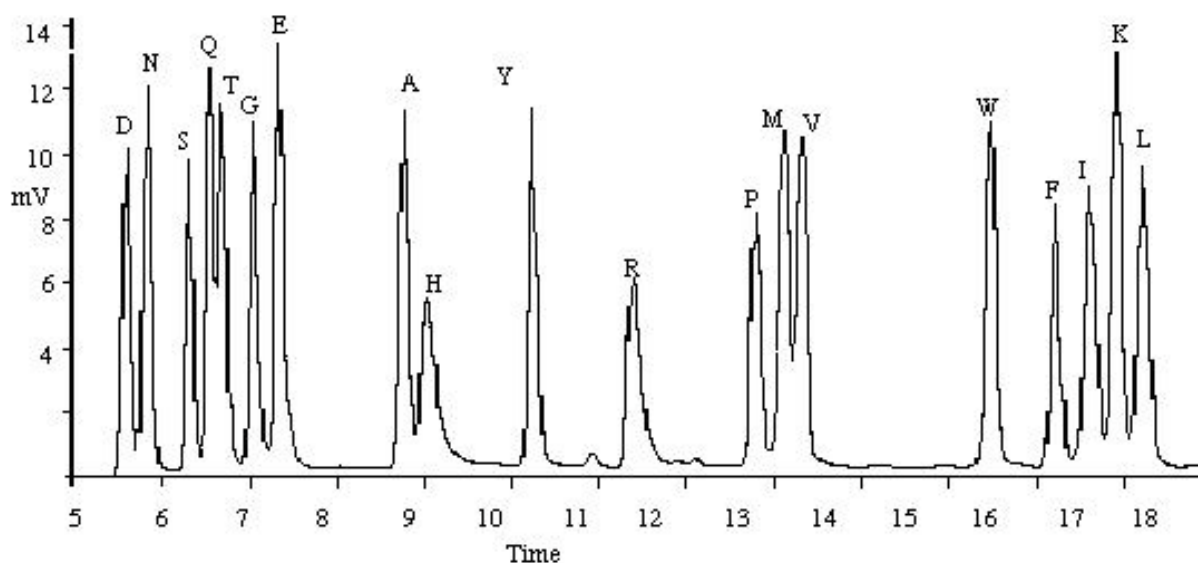


Figure 15 : Chromatogramme des PTH-aas standard (Source: biocadmin.otago.ac.nz)

2.5 Interrogation des banques de données pour l'identification du peptide

Le séquençage nous permet d'identifier une succession d'acides aminés. Avec cette chaîne nous interrogeons une banque de données. Pour cela nous utilisons le logiciel Blast sur le site Expasy, et nous comparons la séquence identifiée (au séquenceur) avec les banques de données.

2.6 Quantification des pics majoritaires

A partir des chromatogrammes nous avons mesuré, à l'aide d'une règle, la hauteur de l'ensemble de pics. Nous avons ensuite déterminé le pourcentage de chaque pic d'intérêt par le rapport qui suit :

$$\frac{\text{Hauteur du pic d'intérêt}}{\text{Somme de la hauteur de l'ensemble des pics du chromatogramme}} \times 100$$

Ces quantifications ont été réalisées sur des chromatogrammes types, à 15 jours, 1 mois, 3 mois et 6 mois.

2.7 Electrophorèse et Western Blot

○ *Electrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide*

L'électrophorèse permet la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire (MM) [Laemmli, 1970]. Le principe consiste à soumettre un mélange de molécules à un champ électrique, qui entraîne la migration des molécules chargées. Les molécules chargées négativement se déplacent vers le pôle positif (= l'anode) et celles qui sont chargées positivement se déplacent vers le pôle négatif (= la cathode). La vitesse de migration va être variable, ce qui permet la séparation des différentes molécules.

Pour notre étude la séparation est réalisée avec le système Mini Protean II (Bio-Rad). Nous utilisons un gel de polyacrylamide de concentration croissante de 4 à 15% et un agent dénaturant, le dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE). Le SDS permet d'enrober les

protéines d'une carapace négative, afin d'inhiber les différences de charges. Les protéines migreront uniquement en fonction de leur poids moléculaire.

Avant d'être déposés, les échantillons sont repris dans un tampon dénaturant [20mM 2- β -mercaptoéthanol, 3% SDS (m/v), 10% glycérol (v/v), 0,01% bleu de bromophénol (m/v), 10mM Tris-HCL pH 6,8], et portés à ébullition durant 10 minutes.

Pour chaque expérience, environ 10 μ L de PSG de cellules chromaffines bovines sont déposés (Figure 16B) comme témoin positif, ainsi qu'un marqueur de MM (Precision Plus Protein Standards, Dual Color, Bio-Rad) qui contient des protéines standards (Figure 16A).

La migration électrophorétique s'effectue en deux temps : le dispositif est d'abord soumis à un champ électrique de 50V pendant 15min, afin de concentrer les protéines et permettre une entrée progressive de l'échantillon dans le gel de séparation. Un champ électrique de 130V est ensuite appliqué jusqu'à ce que le bleu de bromophénol présent dans le tampon dénaturant atteigne la limite inférieure du gel.

- ***Electrotransfert sur membrane de PVDF (PolyVinylidene DiFluoride)***

Lorsque la migration sur le gel est terminée, on transfère ce gel sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) d'une porosité de 0,45 μ m (Pall corporation). L'électrotransfert est réalisé sous une tension de 75V pendant 1h, en présence de 192mM de glycine et 20% de méthanol dans un tampon 25mM Tris-HCl pH 8,2.

- ***Western Blot***

Une fois l'électrotransfert achevé, les protéines d'intérêt peuvent être détectées par la méthode du Western-Blot, à l'aide d'Ac spécifiques par la membrane SNAP I.D. Nos protéines d'intérêt sont la chromogranine A et B. Nous utilisons un anticorps primaire (anti-CGA/CBG) qui va venir se coupler sur nos protéines d'intérêt. L'anticorps secondaire (anti anti-IgG) va se fixer sur l'anticorps primaire et permettra sa révélation par fluorescence.

Les différents Ac utilisés pour les analyses d'immunodétection sont :

Anticorps primaire : Anti-CGA/CGB (dilution 1/5000)

Anticorps secondaire : Ac anti-IgG de lapin couplé au HRP (dilution 1/10000)

La membrane est placée dans une cassette, rincée à l'eau distillée puis un blocage des sites d'interaction non spécifiques entre la membrane et les Ac est réalisé par une solution de BSA 0,5%. La membrane est ensuite incubée en présence de l'anticorps primaire (CGA et CGB)

dilué à concentration d'utilisation dans la solution de BSA, pendant 15 minutes. Après 3 lavages de 5 minutes avec du PBS en présence de 0,5% Tween-20, la membrane est mise à incuber pendant 15 minutes à température ambiante avec l'anticorps secondaire. La membrane subit à nouveau 3 lavages de 5 minutes avec du PBS.

La révélation de l'activité de la peroxydase se fait par chemoluminescence grâce à l'addition d'un réactif de chemoluminescence (Super signal West Dura extended duration substrate, Pierce). La détection est obtenue par lecture sur un imageur (Chemi Doc Bio Rad).

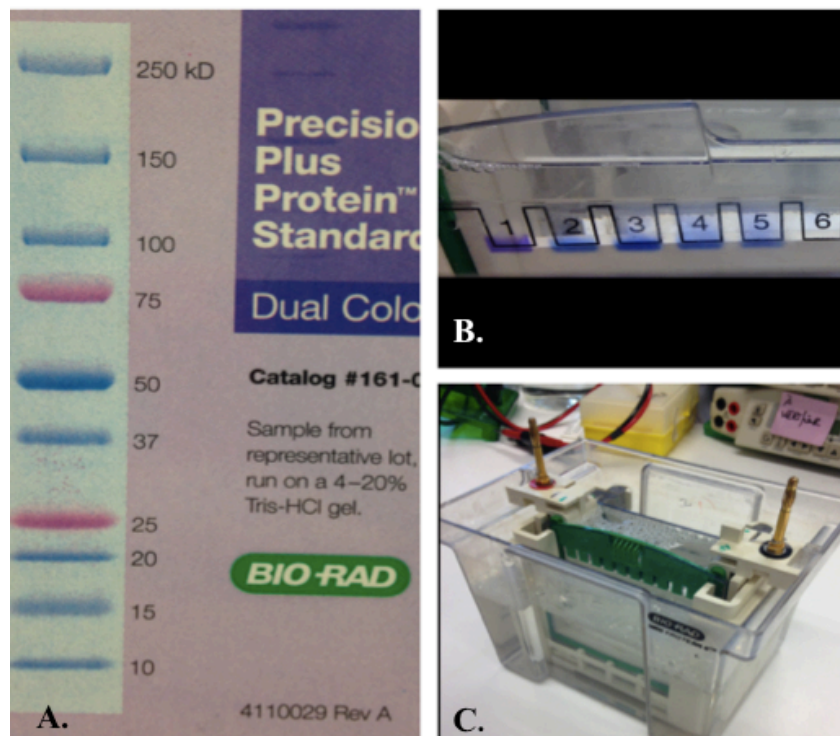


Figure 16 : Electrophorèse et Western Blot. A, Marqueur de MM (Precision Plus Protein Standards, Dual Color, Bio-Rad). B, Puits de l'électrophorèse. C, système d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Source personnelle)

CHAPITRE V

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1- EVOLUTION DES CONSTITUANTS DE LA SALIVE EN FONCTION DE L'AGE DES NOURRISSONS

Les échantillons salivaires récoltés sont d'abord analysés par HPLC. Ces analyses chromatographiques nous permettent d'isoler les différents constituants de la salive. Nous dégagons à partir des chromatogrammes obtenus un profil type pour chaque temps de prélèvement (15 jours, 1 mois, 3 mois, 6 mois et 8 mois) et nous analysons les variations des constituants au cours du temps (Figure 17A-E).

Le chromatogramme du prélèvement à 15 jours (=jrs) présente trois pics importants élués à 39, 42 et 46 minutes (=min) (Figure 17A).

A 1 mois, on remarque un enrichissement des constituants de la salive ; de nombreux nouveaux pics sont détectables (Figure 17B). Ils restent néanmoins faibles en comparaison des pics présents en fin de chromatogramme qui se sont également amplifiés (en particulier le pic élué à la 46^{ème} min) et qui restent majoritaires. A 3 mois, les nouveaux pics détectés précédemment sont plus importants (28 min par exemple), mais le profil général ressemble beaucoup à l'échantillon prélevé à 1 mois. Les pics à 42 et 46 restent encore une fois majoritaires (Figure 17C). C'est à 6 mois que les plus grandes différences interviennent : les pics de la fin du chromatogramme s'effondrent (en 42 et 46min), alors qu'un pic très majoritaire apparaît à 32 min (Figure 17D). A 8 mois, le pic élué à 32 minutes reste très important et la disparition des pics de la fin du chromatogramme persiste. L'enrichissement des constituants s'accroît encore, en particulier en début de chromatogramme (19 à 24 min) (Figure 17E).

Cette analyse cinétique de la composition des constituants de la salive du nourrisson nous montre que deux périodes peuvent être distinguées : une première allant de 15 jrs à 3 mois et une seconde, de 3 mois à 8 mois.

La première période est riche en protéines et peptides hydrophobes car les pics majoritaires sont élués en fin de chromatogramme, à la 39, 42, et 46^{ème} minutes (et l'on sait que lors de l'HPLC plus le soluté est hydrophobe plus il sera retenu et donc plus il apparaîtra en fin de chromatogramme). Dans la seconde période, les pics correspondent à des composés plus polaires. Les pics majoritaires sont élués entre la 19^{ème} et 24^{ème} minutes, ainsi qu'à la 32^{ème} minute. Ces composés peuvent correspondre à des fragments dérivés de protéines précurseurs, suite à une maturation protéolytique.

Afin de comprendre l'évolution de la composition de la salive en tant que liquide biologique impliqué dans l'immunité innée nous allons tester les activités antimicrobiennes des différents pics.

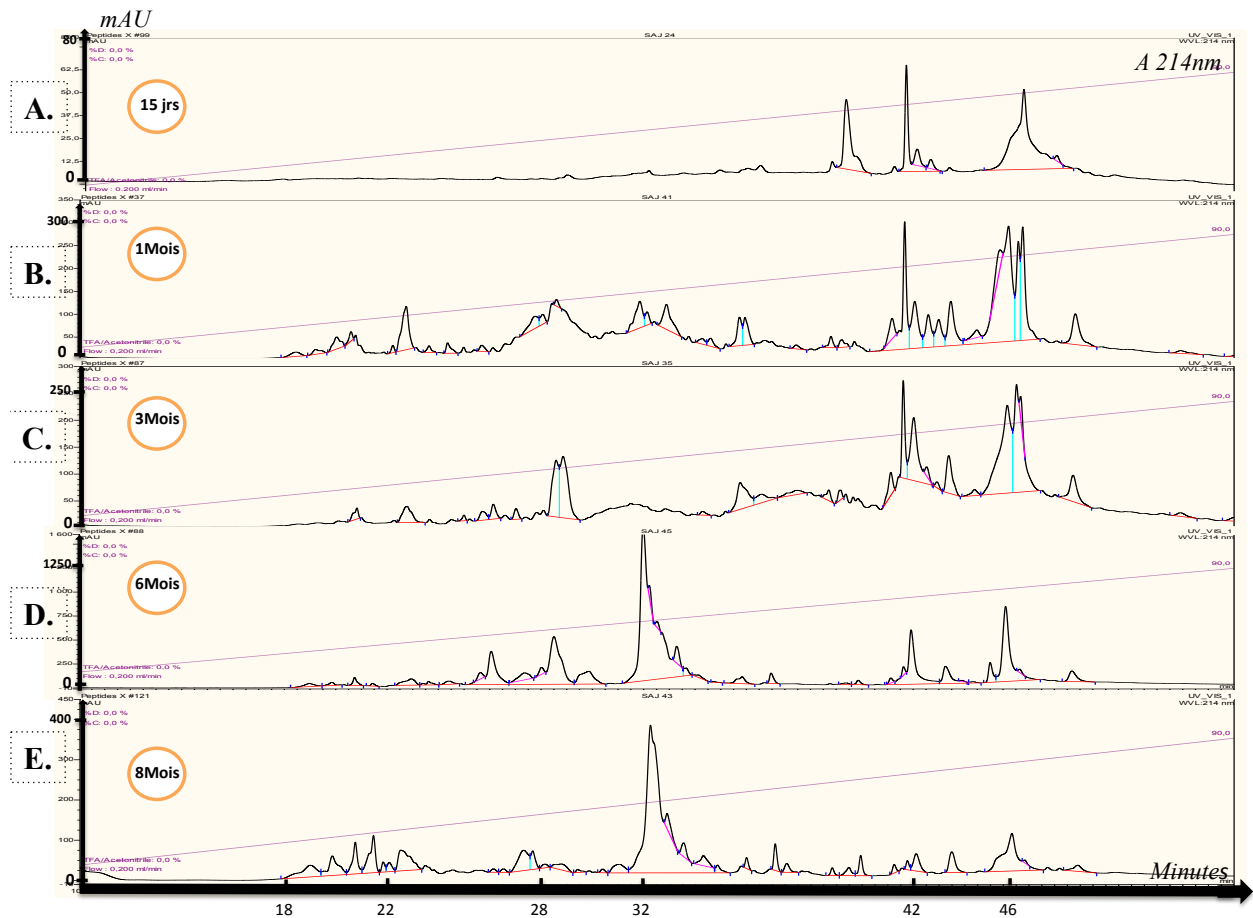


Figure 17 : Evolution au cours du temps, des constituants de la salive des nourrissons allaités au lait maternel (chromatogramme obtenue par HPLC) (Source personnelle)

2- ANALYSE DES ACTIVITES ANTIMICROBIENNES DES CONSTITUANTS DE LA SALIVE DES NOURRISSONS

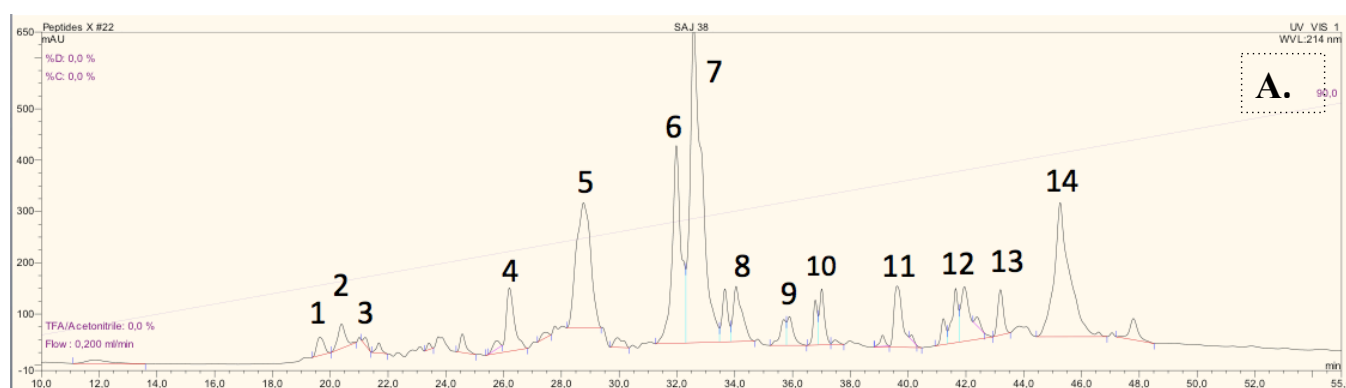
Les pics majoritaires récoltés par HPLC, préalablement concentrés par Speed-Vac, subissent des tests antimicrobiens, suivant le protocole décrit dans la partie Matériels et Méthodes. Un échantillon de 6 mois a été sélectionné car il regroupe l'ensemble des pics (Figure 18A). Les tests sont réalisés sur les souches d'intérêt *C.albicans* qui est une levure, et *M.luteus* qui est une bactérie à Gram+.

Les tests antimicrobiens sur *M. luteus* révèlent que l'ensemble des pics majoritaires analysés présente une activité antimicrobienne allant de 40 à 97% d'inhibition de la croissance microbienne (Figure 18B). Les pics n°1, 2, 5, 6, 7, 8, 11 et 14 présentent une forte activité

antibactérienne allant de 80 à 97%. Les pics n° 9, 10, 12 présentent une activité antibactérienne plus modérée, allant de 40 à 53%.

Les tests sur *C. albicans* révèlent une activité antifongiques sur certains des pics majoritaires analysés (pic n°1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14). Les taux d'inhibition de la croissance fongique restent néanmoins faibles, allant de 35 à 50%. Cela peut être lié à une quantité de matériel déposée insuffisante, pour avoir de plus fortes inhibitions.

3- CARACTERISATION STRUCTURALE DES PEPTIDES ANTIMICROBIENS



B.

ND = non déterminé

C.

Pics n°	Activité antibactérienne (testé sur <i>M. luteus</i>)	Activité antifongique (testé sur <i>C. albicans</i>)
1	+	+
2	+	+
3	ND	ND
4	ND	+
5	+	+
6	+	+
7	+	ND
8	+	+
9	+	+
10	+	ND
11	+	+
12	+	+
13	+	ND
14	+	+

Pics n°	Séquence N-Terminal	Identification des peptides majoritaires	Références bibliographiques
1	GPPQQQSP [158-165]	Protéine riche en proline	Beeley JA., 2001
2	ERDHEP	Mucine	Amerongen, 2002
3	GPPQQGGHPRP [110-122]	Protéine riche en proline	Beeley JA., 2001
4	YLYDN	Histatine 1/3	Siqueira, 2010
5	DGGDSQFIDEE [34-46]	Protéine riche en proline	Beeley JA., 2001
6	GYGYGPYQPVE	Stathérine	Li J., 2004
7		ND	
8		ND	
9		ND	
10		ND	
11	GLSEAKPATPEI	Cystatine	Amerongen, 2002
12		ND	
13		ND	
14		ND	

Figure 18 : Activité antimicrobienne et caractérisation des peptides antimicrobiens.

A, chromatogramme d'un échantillon de salive de 6 mois, avec numérotation des pics majoritaires ; *B*, activité antimicrobienne des pics majoritaires ; *C*, identification des peptides avec leurs séquences N-terminale, et les références bibliographiques correspondantes (ND = non déterminé) (Source personnelle)

Les pics obtenus après HPLC et présentant une activité antimicrobienne ont été sélectionnés pour être analysés par séquençage protéique. Le séquenceur utilisé est un Procise (Applied Biosystem 473A Courtaboeuf, France). Le séquençage est utilisé ici pour déterminer la séquence N-terminale des pics, et permettre l'identification de la protéine après interrogation des banques de données (Figure 18C).

Les pics n°1, 3 et 5 (Figure 18) élués à 19, 22, et 28 min sont identifiés comme des **protéines riches en proline** (PRP). Chez l'homme, les PRPs représentent près des deux tiers du total des protéines de la salive parotidienne et submandibulaire. Leur taux reste cependant faible dans la salive totale, du fait de leur élimination rapide dans la cavité orale.

Ces protéines sont classées comme acides, basiques et peuvent être glycosylées ou non [Bennick A., 2002]. Les recherches actuelles suggèrent qu'elles ont de multiples fonctions protectrices. Les PRPs acides contribuent au maintien de l'homéostasie du calcium dans la cavité buccale. Elles pourraient être des réservoirs à calcium pour la reminéralisation et seraient des inhibiteurs de la précipitation des phosphates de calcium [Beeley JA, 2001]. Les PRPs basiques glycosylées agissent comme lubrifiant. Par contre, le rôle des PRPs basiques n'est pas encore bien compris, mais il assurerait la protection du tractus gastro-intestinal contre les effets toxiques des tanins.

Le pic n°2 (Figure 18) est identifié comme étant de la **mucine**. Les mucines sont secrétées principalement par les glandes sublinguales et sont absentes de la salive parotidienne. Il y a deux types principaux de mucines : les mucines de type 1 qui ont un poids moléculaire très élevé, supérieur à 20MDa et les mucines de type 2 qui ont une taille plus faible et un poids moléculaire de 200kDa. Elles polymérisent en milieu aqueux et retiennent de grandes quantités d'eau pour former un gel visqueux recouvrant les tissus de la cavité buccale, conférant ainsi à la salive son pouvoir lubrifiant. Les mucines ont une fonction antibactérienne, en modulant de manière sélective l'adhésion des micro-organismes aux tissus de la cavité orale [Amerongen, 2002].

Le pic n°4, élué à 26 min correspond à de l'**histatine 1/3**. L'histatine est un peptide antimicrobien contenant un pourcentage élevé en histidine. En 1988, les histatines 1, 3 et 5 ont été isolées dans la salive humaine. [Oppenheim et al., 1988]. Ces trois histatines ont la capacité de tuer des levures pathogènes, et en particulier *C. albicans*. La famille des histatines salivaires comprend 12 membres : l'histatine 1 et 3 dérivent d'un gène et les autres sont issues

de leur clivage. En dehors de leur activité antibactérienne, les histatines présentent une forte activité antifongique vis-à-vis des plusieurs espèces de *Candida*, de *Saccharomyces* et *Cryptococcus neoformans* [Rayhan et al., 1992]. L'histatine 5 présente l'activité antifongique la plus forte parmi l'ensemble de la famille des histatines [Puri S., 2014]. Les histatines 1, 3 et 5 participent également à la formation d'une pellicule protectrice au niveau de la surface des dents, qui prévient la colonisation microbienne [Siqueira, 2010].

Le pic n°7 qui apparaît à partir du 6^{ème} mois chez les enfants nourris au lait maternel, correspond à de la **stathérine**. On sait que stathérine vient du mot grec « statheropio » qui signifie « stabiliser ». La stathérine est sécrétée par les glandes parotides et est riche en résidus tyrosine et tyrosine phosphorylée. Elle est la seule protéine salivaire capable d'inhiber la précipitation spontanée des phosphates de calcium, et empêcher la colonisation microbienne initiale de la surface des dents car elle est active contre *Actinomyces viscosus* et *Fusobacterium nucleatum*. Elle a également un rôle de lubrification des surfaces dentaires et participe à l'élaboration de la pellicule exogène acquise [Li J., 2004].

La **cystatine** a été identifiée au niveau du pic n°11 à 39 min. Les cystatines salivaires sont sécrétées par les glandes salivaires parotides submandibulaires et sublinguales. Dans la salive au moins neuf isoformes différentes de cystatine sont sécrétées : la cystatine SN, trois isoformes de cystatine SA faiblement anionique, trois ou quatre isoformes plus anioniques que la cystatine S et la cystatine C et une cystatine cationique. Les cystatines sont des inhibiteurs naturels des protéases à cystéine. Leur rôle serait de protéger les tissus buccaux de ces enzymes [Amerongen, 2002].

Les pics n° 12 et 14, élués à la 42 et 46^{ème} minutes n'ont pas été identifiés. Ils ont résisté à la dégradation d'Edman car leur séquence N-terminale est bloquée. Leur identification serait possible après dégradation enzymatique par la trypsine et purification d'un peptide dérivé. Nous pouvons cependant conclure, au vu des précédents résultats, que ce sont des protéines hydrophobes antimicrobiennes.

4- CARACTERISATION DES FRAGMENTS DERIVES DES CGA ET CGB

Parce que les CGA et CGB sont présentes dans la salive et impliquées dans l'immunité innée, nous avons cherché à identifier leur présence et celle des fragments dérivés grâce aux techniques de l'électrophorèse et du Western Blot.

Nous avons utilisé des prélèvements à 15 jours, 1 mois et 3 mois d'un même enfant allaité au sein (puits 3, 4 et 5).

Les membranes obtenues après le Western Blot montrent que l'on retrouve des fragments de ces deux protéines (Figure 19A, Figure 20A). L'identification des différents fragments obtenus a été réalisée à l'aide des masses moléculaires apparentes et des publications antérieures du laboratoire [Gasnier et al., 2004 ; Metz-Boutigue, 1993].

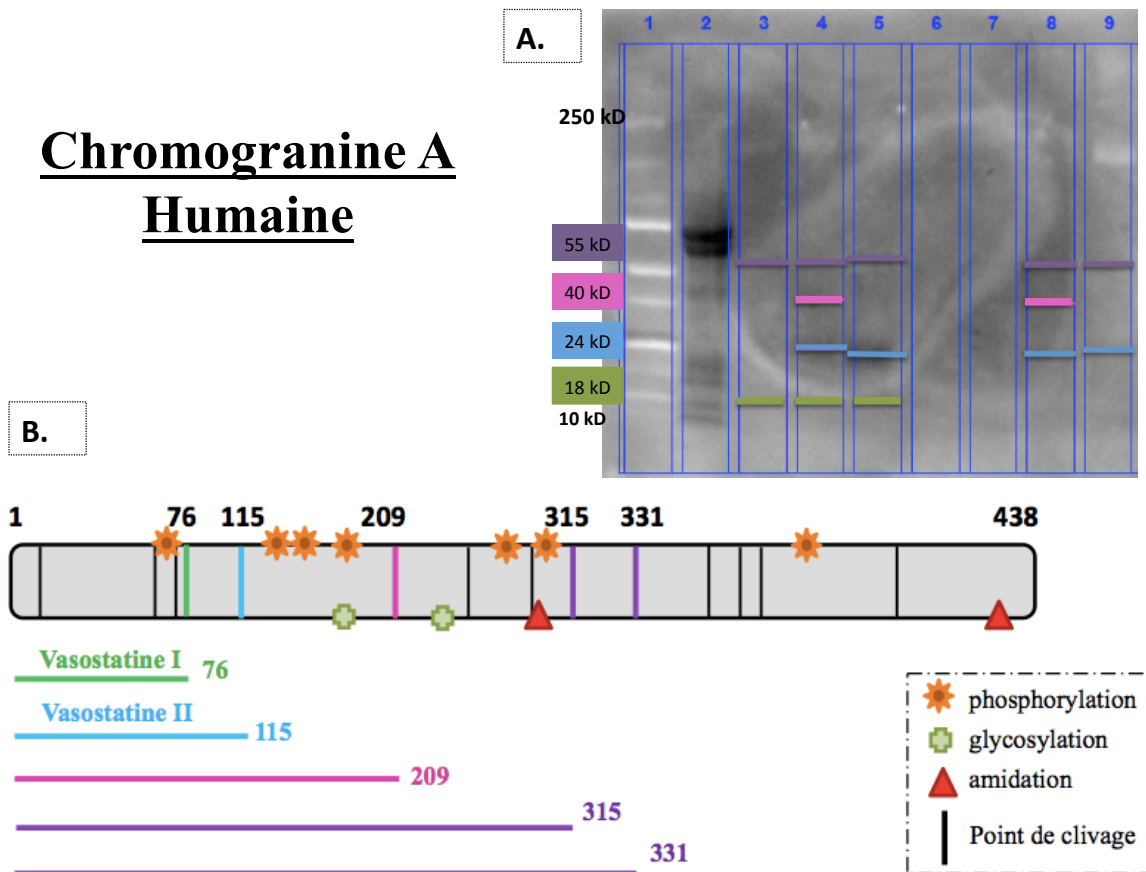


Figure 19 : Caractérisation des fragments dérivés de CGA.

A, Western blot avec l'anticorps primaire anti-CGA (4-16) (1/5000 v/v) et l'anticorps secondaire anti-rabbit (1/10000 v/v) : 1, PM ; 2, PSG ; 3-5, allaitement maternel (15 jrs, 1 mois, 3 mois) ; 7-9, lait infantile (15 jrs, 1 mois, 3 mois). B, Localisation des fragments immunodétectés sur la séquence de la CGA humaine, des points de clivage et des modifications post-traductionnelles. (Source personnelle)

A 15 jrs, nous observons deux dérivés de la CGA, dont la vasostatine I. La vasostatine I (CGA 1-76) est un peptide qui présente une activité antibactérienne contre les bactéries Gram +, à des concentrations micromolaires, ainsi qu'une activité antifongique [Lugardon, 2000]. La vasostatine a également des propriétés anti-stress et cardio-protectrice, elle inhibe la vasoconstriction.

A 1 mois, quatre dérivés de la CGA sont visibles, dont les vasostatine I et II. A 3 mois, trois dérivés sont identifiables, dont la vasostatine I et II (Figure 19A3-5).

Les fragments identifiés ont été localisés sur la séquence de la CGA (Figure 19B). Sur cette séquence les phosphorylations et glycosylations possibles ont également été mises en évidence. Ces dernières peuvent expliquer que certaines bandes sur la membrane du Western blot soient plus épaisses ou dédoublées.

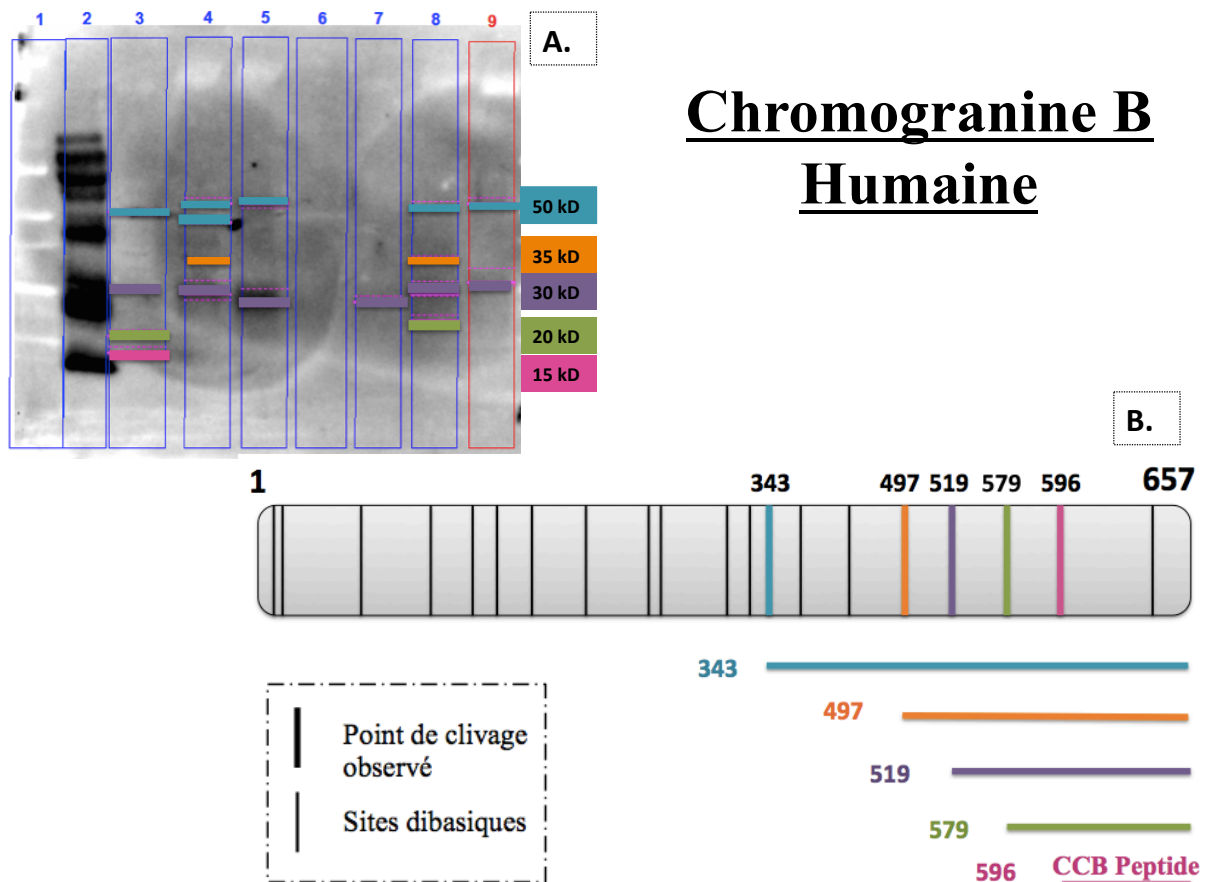


Figure 20 : Caractérisation des fragments dérivés de CGB.

A, Western blot avec l'anticorps primaire anti-CGB (645-657) (1/5000 v/v) et l'anticorps secondaire anti-rabbit (1/10000 v/v) : 1, PM ; 2, PSG ; 3-5, allaitement maternel (15 jrs, 1 mois, 3 mois) ; 7-9, lait infantile (15 jrs, 1 mois, 3 mois). B, Localisation des fragments immunodétectés sur la séquence de la CGB humaine et des points de clivage. (Source personnelle)

Pour la CGB, nous observons à 15 jrs quatre dérivés, dont le CCB peptide qui est un peptide antimicrobien [Strub JM, 1996]. A 1 mois, trois dérivés de la CGB sont visibles et à 3 mois deux dérivés (Figure 20A3-5). Les fragments identifiés ont été localisés sur la séquence de la CGB (Figure 20B).

5- COMPARAISON AVEC LES RESULTATS ISSUS DE L'ETUDE SUR LES LAITS INFANTILES

Nos résultats obtenus préalablement sont mis en comparaison avec ceux issus de l'étude de Sarah Neurohr, sur l'incidence des laits infantiles sur la caractérisation des peptides antimicrobiens dans la salive des nourrissons.

Nous comparons l'évolution des constituants de la salive en fonction de l'âge des nourrissons. Il s'agit des peptides antimicrobiens ainsi que les fragments de la CGA et CGB identifiés.

5.1 - Comparaison de l'évolution des constituants de la salive en fonction de l'âge des nourrissons

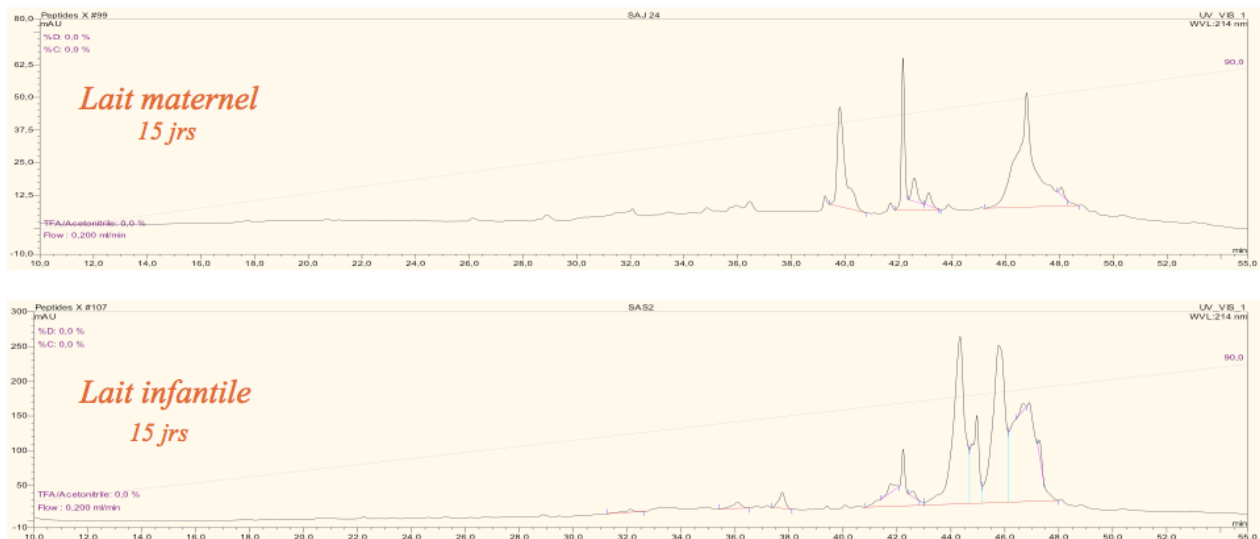


Figure 21 : Comparaison des constituants présents dans la salive des nourrissons nourris au lait infantile ou maternel à 15 jours (Source personnelle)

Comme celui des enfants allaités au lait maternel, le chromatogramme du prélèvement à 15 jours de cette deuxième étude présente des pics importants élués en fin de chromatogramme (Figure 21). On remarque cependant des différences ; le pic élué à 42 min est moins important, alors que celui à 46 min est plus élevé. Un nouveau pic élué à 44 min est présent dans l'étude sur les laits infantiles, alors que celui à 39 min est inexistant.

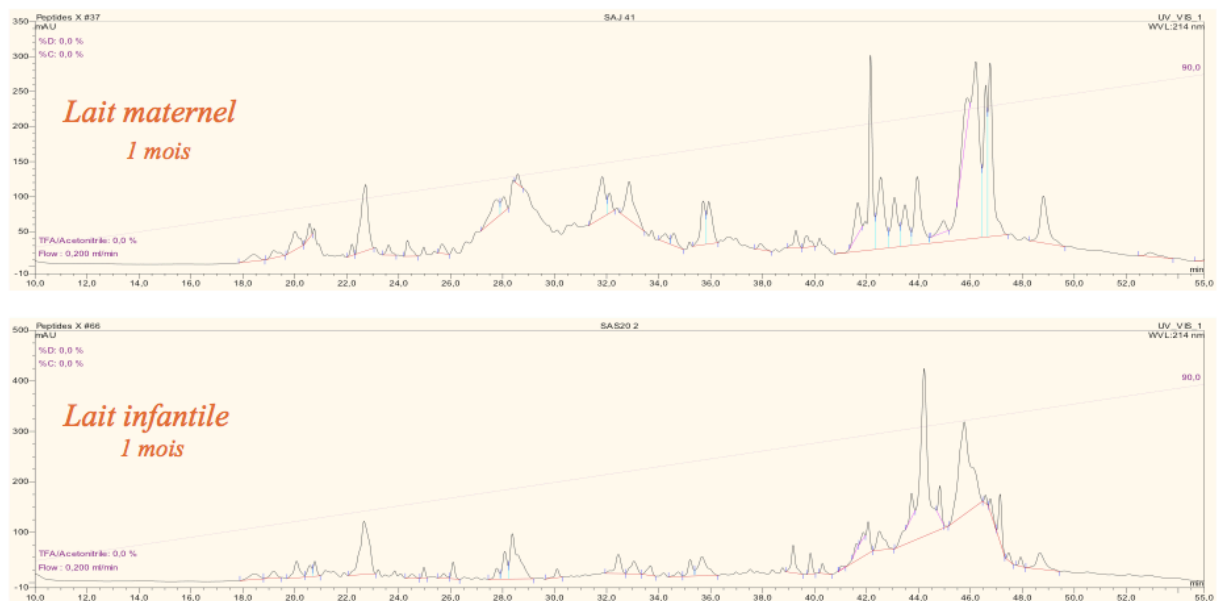


Figure 22 : Comparaison des constituants présents dans la salive des nourrissons nourris au lait infantile ou maternel à 1 mois (Source personnelle)

A 1 mois, on remarque un enrichissement des constituants de la salive, de nombreux nouveaux pics sont détectables (Figure 22), comme par exemple les pics élués à 22 et 28 min qui sont équivalents dans les deux études. Les pics de fin de chromatogramme restent majoritaires dans les deux modes d'allaitement, mais plus élevés globalement pour les laits maternels. Le pic élué à la 42^{ème} min reste très faible dans l'étude sur les laits infantiles, alors que celui de la 44^{ème} min reste plus important.

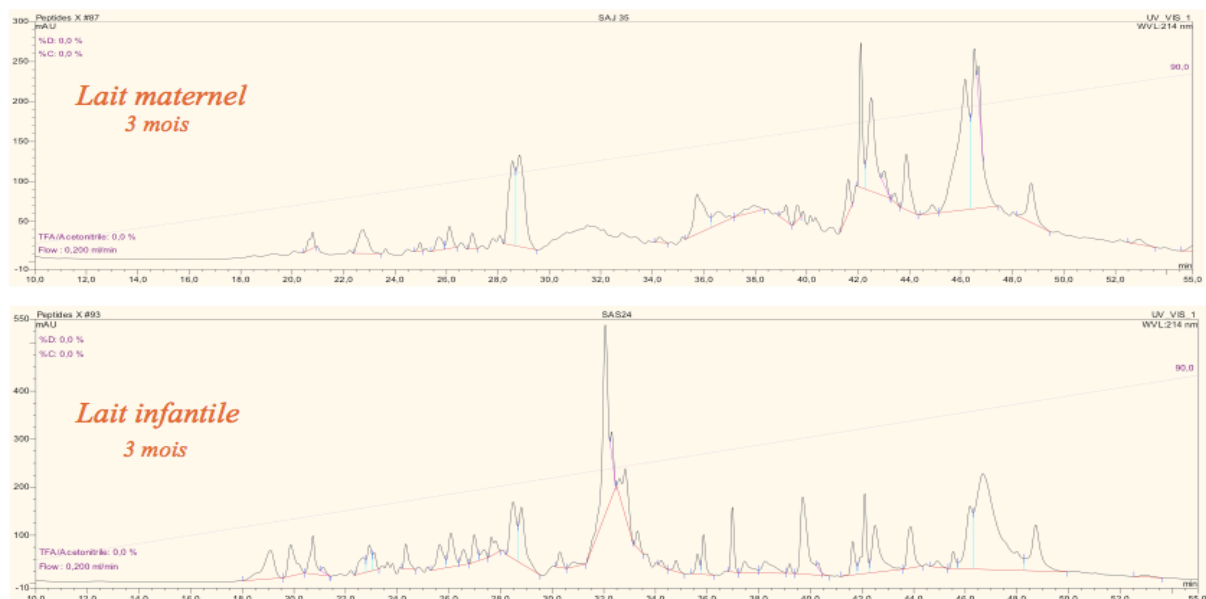


Figure 23 : Comparaison des constituants présents dans la salive des nourrissons nourris au lait infantile ou maternel à 3 mois (Source personnelle)

A 3 mois, une différence majeure s'opère entre les deux groupes, un pic très largement majoritaire apparaît à 32 min dans l'étude sur les laits infantiles à 32 min, alors que les pics de la fin du chromatogramme s'effondrent (Figure 23). Dans l'étude sur le lait maternel, un pic important à 28 min apparaît, et ceux de fin de chromatogramme restent majoritaires.

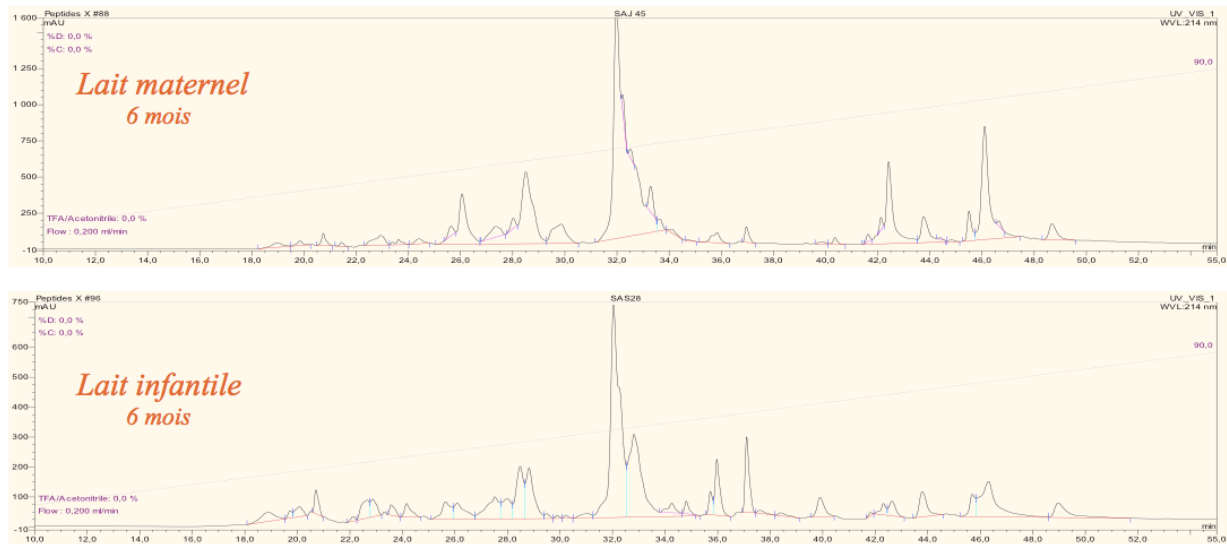


Figure 24 : Comparaison des constituants présents dans la salive des nourrissons nourris au lait infantile ou maternel à 6 mois (Source personnelle)

A 6 mois, l'enrichissement des constituants s'accroît encore, et le pic élué à 32 min est présent désormais dans les deux groupes. Les pics de fin de chromatogramme se sont également effondrés dans l'étude sur les laits maternels mais restent néanmoins plus élevés que ceux de l'étude sur les laits infantiles (Figure 24).

L'analyse de la cinétique de la composition des constituants de la salive chez les enfants allaités par des laits infantiles nous révèle également deux périodes, une première période allant de 15 jours à 1 mois et une seconde de 1 mois à 6 mois. Ces périodes ne concordent cependant pas avec les périodes issues de l'étude sur l'allaitement maternel ; la première période allant de 15 jrs à 3 mois, et la seconde de 3 mois à 6 mois. Ce découpage pouvant s'expliquer par le fait qu'à 6 mois un grand chamboulement intervient dans la cavité buccale : l'apparition des premières dents. Nous savons que la stathérine (pic élué à la 32^{ème} min) joue un rôle dans la lubrification des surfaces dentaires, qu'elle participe à l'élaboration de la pellicule exogène acquise et qu'elle empêche la colonisation microbienne initiale de la surface des dents. C'est également la seule protéine salivaire capable d'inhiber la précipitation

spontanée des phosphates de calcium. Son augmentation avec l'apparition des dents semble donc normale.

Dans le groupe des enfants nourris par des laits infantiles, le découpage peut s'expliquer par la composition des laits infantiles. En effet, la stathérine joue un rôle important dans l'homéostasie du calcium et son expression pourrait être régulée par la présence plus importante du calcium dans les laits infantiles par comparaison avec les laits maternels.

Cette analyse comparative de la cinétique nous montre néanmoins de grandes similarités entre les deux études : la présence de protéines plutôt hydrophobes à 15 jours, les profils qui s'enrichissent au cours du temps avec l'apparition de peptides plus polaires (22^{ème}, 28^{ème} min).

5.2- Comparaison des dérivés de la CGA et CGB identifiés

Fragments retrouvés	Puits sur la membrane dans lesquels les fragments sont détectés, dans l'étude sur le lait maternel	Puits sur la membrane dans lesquels les fragments sont détectés, dans l'étude sur les laits infantiles
CGA		
Vasostatine I	(3) (4) (5)	
Vasostatine II	(4) (5)	(8) (9)
CGA 1-209	(4)	(8)
CGA 1-315/331	(3) (4) (5)	(8) (9)
CGB		
CCB Peptide	(3)	
CGB 579-657	(3)	(8)
CGB 519-657	(3) (4) (5)	(7) (8) (9)
CGB 497-657	(4)	(8)
CGB 343-657	(3) (4) (5)	(8) (9)

Tableau 5 : Comparaison de la présence des fragments des CGs dans les puits des membranes du Western Blot dans les deux cas d'études (cf Figure 19A et 20A) (Source personnelle)

Pour la CGA, on remarque que plus de fragments dérivés sont retrouvés dans l'étude sur le lait maternel. En particulier, la vasostatine I qui est un peptide antimicrobien, qu'on ne retrouve à aucun temps dans l'étude sur les laits infantiles.

Pour la CGB, même observation que précédemment ; on retrouve plus de fragments dérivés dans l'étude sur le lait maternel. Le CCB peptide qui est également antimicrobien est uniquement présent dans cette étude.

Il semblerait donc que le lait maternel favorise une dégradation et maturation plus complète des CGs permettant la production des plus petits peptides (CCB peptide et vasostatine I) qui sont antimicrobiens.

5.3- Comparaison des peptides antimicrobiens

Nous avons calculé à partir des profils type à 15 jours, 1 mois, 3 mois et 6 mois le pourcentage des peptides antimicrobiens majoritaires identifiés selon la méthode décrite dans la partie Matériels et Méthodes. Ces chiffres ont été mis en comparaison avec ceux obtenus par la même étude sur les enfants nourris par des laits infantiles.

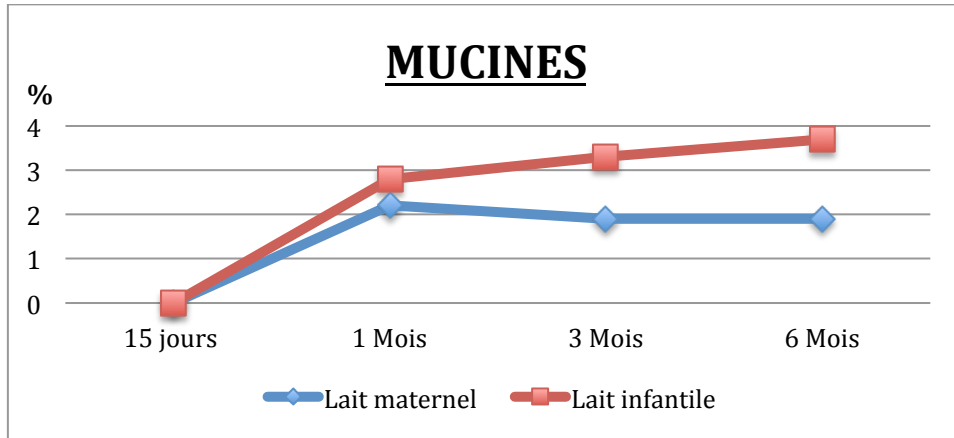


Figure 25 : Evolution du pourcentage de mucines entre 15 jrs et 6 mois chez les enfants allaités au sein et nourris par des laits infantiles (Source personnelle)

Pour les **mucines**, nous remarquons que les courbes entre les deux groupes d'études ont la même allure générale. On note une augmentation du taux des mucines au cours du temps. Malgré tout, ces taux restent faibles, partant de 0% à 15 jours pour arriver à 2 % pour l'étude des laits maternels et 3,5% des protéines totales à 6 mois pour les laits infantiles.

En conclusion, on peut donc voir qu'il n'y a pas de différence majeure entre les deux études.

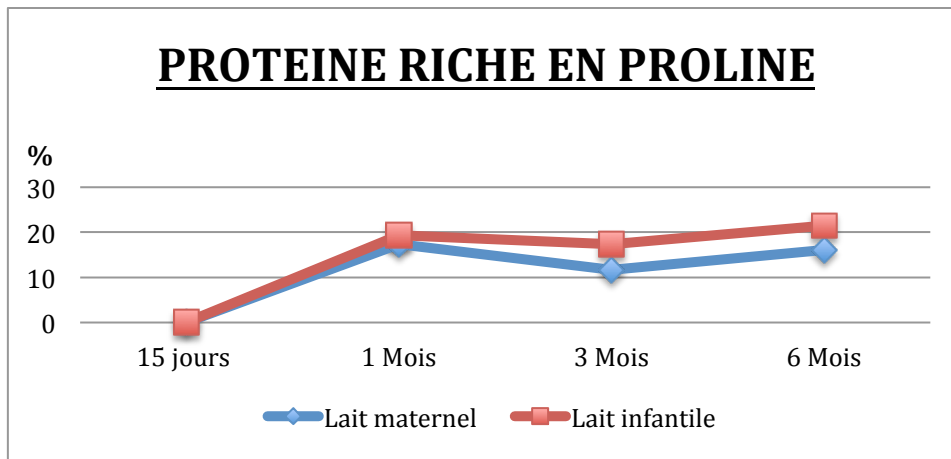


Figure 26 : Evolution du pourcentage des PRP entre 15 jrs et 6 mois chez les enfants allaités au sein et nourris par des laits infantiles (Source personnelle)

Pour les **protéines riches en proline**, nous observons le même schéma que pour les mucines. Les courbes se superposent ; les taux augmentent au cours du temps, même si l'on note une diminution à 3 mois pour les deux études. Les pourcentages sont plus élevés, passant de 0% à 20% de 15 jrs à 6 mois.

En conclusion, il n'y a pas de différence notable entre les deux études.

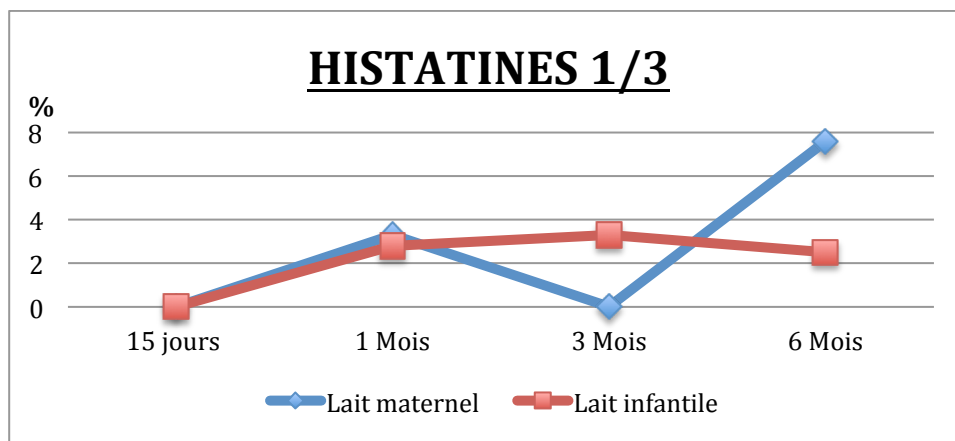


Figure 27 : Evolution du pourcentage des histatines entre 15 jrs et 6 mois chez les enfants allaités au sein et nourris par des laits infantiles (Source personnelle)

Chez les enfants nourris par des laits infantiles, le taux d'**histatine** augmente faiblement sur les six premiers mois, passant de 0% à 2,5%. Chez les enfants allaités au sein, ce taux augmente de façon plus importante en atteignant 8% à 6 mois. Mais on remarque qu'à 3 mois l'histatine n'a pas été retrouvée.

Nous ne pouvons donc pas conclure, il faudrait évaluer l'évolution du taux d'histatine sur une plus longue période.

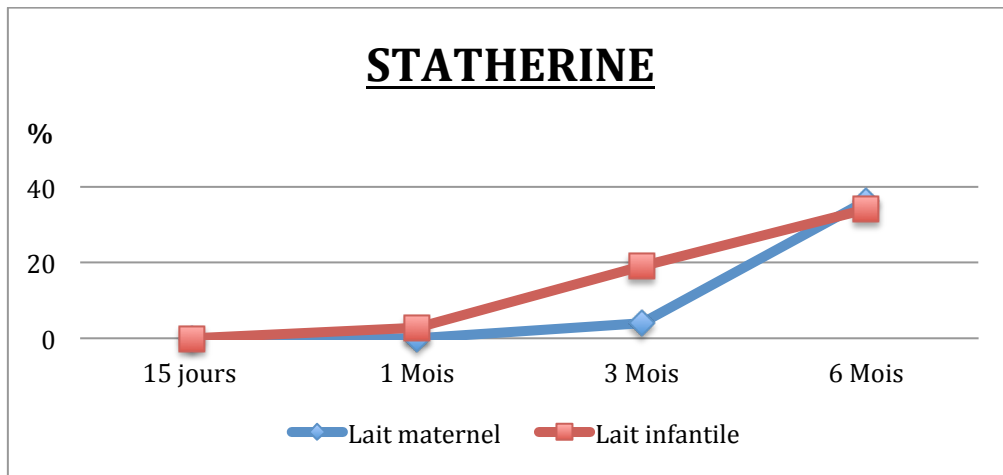


Figure 28 : Evolution du pourcentage de stathérine, entre 15 jrs et 6 mois, chez les enfants allaités au sein et nourris par des laits infantiles (Source personnelle)

Dans les deux groupes d'études la **stathérine** augmente au cours des 6 premiers mois, pour atteindre approximativement 35%. Mais cette augmentation est plus précoce dans le groupe des enfants nourris par des laits infantiles, on note une hausse significative dès le 3^{ème} mois, alors qu'elle ne débute qu'à 6 mois pour les enfants allaités au sein.

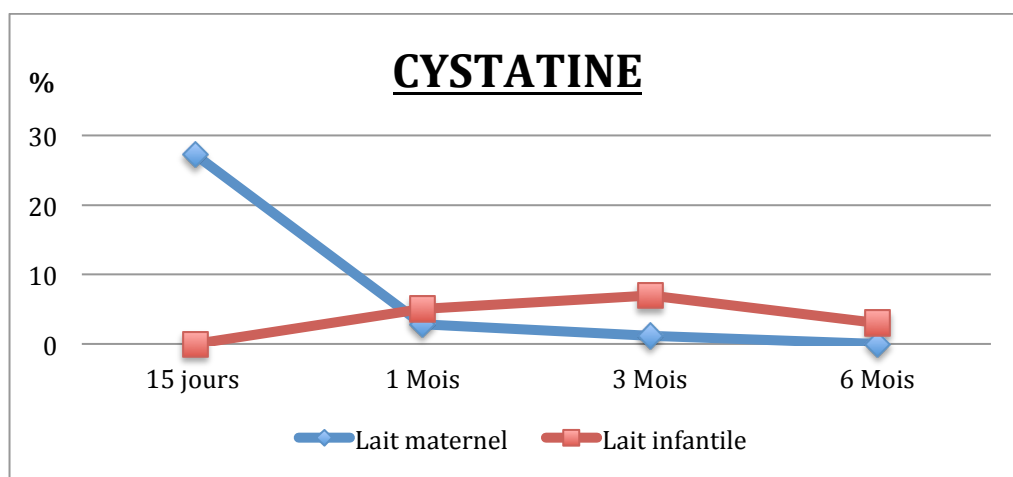


Figure 29 : Evolution du pourcentage de cystatine, entre 15 jrs et 6 mois, chez les enfants allaités au sein et nourris par des laits infantiles (Source personnelle)

La **cystatine** est inexistante à 15 jours chez les enfants issus de l'étude sur les laits infantiles, par contre elle est élevée (27%) chez les enfants allaités. Par la suite, les courbes sont

concordantes ; elles restent stables et à des valeurs faibles. On sait selon Amerongen, que les cystatines sont des inhibiteurs naturels des protéases à cystéine. Leur rôle serait de protéger les tissus buccaux de ces enzymes [Amerongen, 2004]. On sait également que du 1^{er} au 5^{ème} jour, les nourrissons allaités tètent le colostrum, qui est un fluide dense, riche en protéines et anticorps. On peut donc émettre l'hypothèse que ces taux élevés de cystatine à 15 jours, proviennent du colostrum.

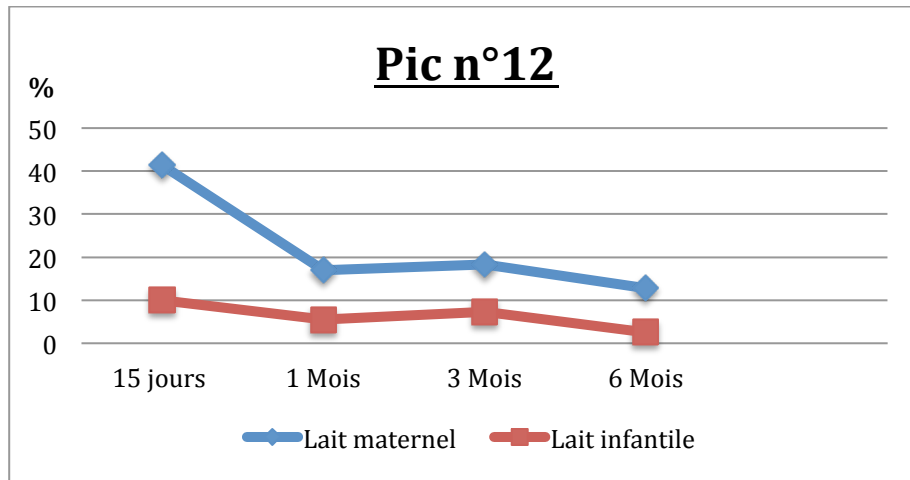


Figure 30 : Evolution du pourcentage du pic n°12, entre 15 jrs et 6 mois, chez les enfants allaités au sein et nourris par des laits infantiles (Source personnelle)

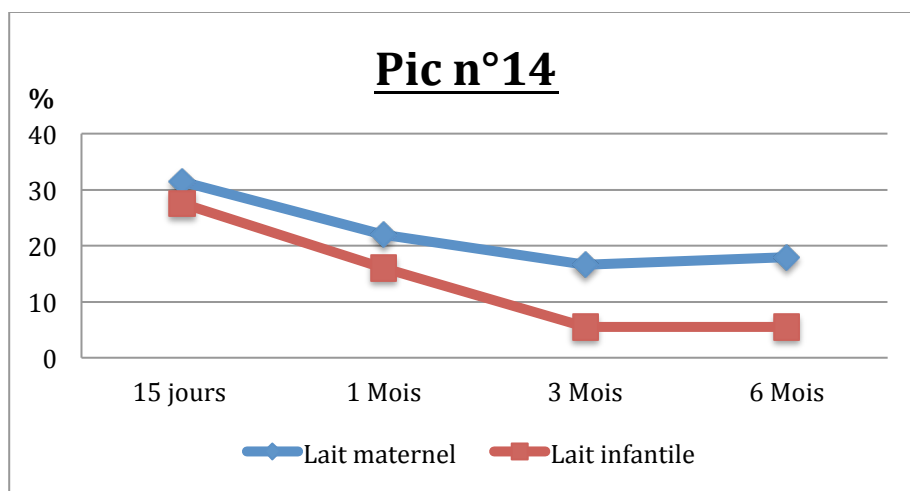


Figure 31 : Evolution du pourcentage du pic n°14, entre 15 jrs et 6 mois, chez les enfants allaités au sein et nourris par des laits infantiles (Source personnelle)

Les pics n°12 et n°14 sont importants dès la naissance, ne cessent de diminuer au cours du temps, et se stabilisent entre 3 mois et 6 mois. La baisse, de ces peptides antimicrobiens non

identifiés, est néanmoins moins importante chez les enfants nourris au lait maternel.

La comparaison des pourcentages des peptides antimicrobiens majoritaires nous a permis de voir que ces peptides suivent des courbes similaires dans les deux études, mais que les taux diffèrent. Les taux des mucines, PRP, et cystatine sont globalement plus élevés dans l'étude sur les laits infantiles de 15 jours à 6 mois. A l'inverse les taux de l'histatine, du pic n°12 et n°14 restent plus importants dans l'étude sur les laits maternels. Il semblerait donc que les laits infantiles favorisent une apparition plus précoce de certains peptides antimicrobiens dans la salive, il y aurait une anticipation de la protection salivaire pour ces nourrissons, sur la période étudiée.

CONCLUSION

Le lait maternel, par sa composition unique et évolutive, permet de satisfaire les besoins du nourrisson. Il présente des bénéfices pour la mère ainsi que pour l'enfant. Malgré cela, toutes les femmes ne sont pas en mesure d'allaiter leur enfant pour des raisons professionnelles ou personnelles, et ont recours à des laits infantiles. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux peptides antimicrobiens de la salive des nourrissons, ainsi qu'à l'incidence de l'allaitement maternel sur ces peptides. Nous avons ensuite comparé nos résultats à ceux de l'étude de Sarah Neurohr, qui s'est intéressée à l'incidence des laits infantiles sur les peptides antimicrobiens de la salive des nourrissons. Nous nous sommes également intéressés à l'importance du lait dans la protection immunitaire du nourrisson.

Pour le lait maternel et pour les laits infantiles, on observe un enrichissement des constituants de la salive en fonction de l'âge des nourrissons. L'analyse des activités antimicrobiennes des constituants de la salive nous a révélé que l'ensemble des pics majoritaires analysés présente une activité antimicrobienne sur *M. luteus*, et antifongique sur *C. albicans*, à des valeurs similaires. La comparaison des pourcentages des peptides antimicrobiens majoritaires nous a permis de voir que ces peptides suivent des courbes similaires dans les deux études, mais que les taux diffèrent. Les taux des histatines et des protéines antimicrobiennes éluées en fin de chromatogramme (pic n°12 et n°14) restent plus importants dans l'étude sur les laits maternels mais les taux des mucines, des PRPs, et de la cystatine sont plus élevés dans l'étude sur les laits infantiles. Les laits infantiles favoriseraient donc l'apparition de certains peptides antimicrobiens. Une explication pourrait se trouver dans la composition de ces laits, qui sont généralement plus riches en protéines que le lait maternel. Les techniques de l'électrophorèse et du Western Blot nous ont permis de caractériser des fragments dérivés des CGA et CGB. Les fragments retrouvés sont plus nombreux dans les échantillons salivaires de l'étude sur le lait maternel, et c'est uniquement dans cette étude que la vasostatine I et le CCB peptide, qui sont des peptides antimicrobiens, ont été mis en évidence. Ces résultats confèrent, dans le cas des laits maternels, une meilleure mise en place du système enzymatique qui assure la dégradation protéolytique des CGs pour produire les PAMs. Cette comparaison montre donc que les deux laits présentent des bénéfices pour la protection immunitaire du nourrisson, sur la période étudiée. Il serait intéressant de poursuivre cette étude sur une plus longue période pour observer l'évolution de ces peptides avec la diversification alimentaire par exemple, et identifier les peptides bloqués de fin de chromatogramme. En partant de l'étude de Davidopoulou [Davidopoulou, 2012] qui émettait l'hypothèse que des taux élevés de peptides antimicrobiens augmenteraient les résistances aux caries, nous aurions pu observer la variation de la cario-susceptibilité chez les enfants de nos deux études.

BIBLIOGRAPHIE

Albrethsen J, Bøgebo R, Gammeltoft S, Olsen J, Winther B, Raskov H. Upregulated expression of human neutrophil peptides 1, 2 and 3 (HNP 1-3) in colon cancer serum and tumours: a biomarker study. *BMC Cancer*. 2005 Jan 19;5:8

Albrethsen J, Møller CH, Olsen J, Raskov H, Gammeltoft S. Human neutrophil peptides 1, 2 and 3 are biochemical markers for metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2006 Nov;42(17):3057-64. Epub 2006 Oct 2

Amerongen AV, Veerman EC, Saliva : the defender of the oral cavity. *Oral Dis*. 2002

Arnold R, Brewer M, and Gauthier J, Bactericidal activity of human lactoferrin : sensitivity of a variety of microorganismes. *Infect Immun*. 1980

Arsan A, Mosser F, Dartois AM, du Fraysseix M, Alimentation de l'enfant de la naissance à 3 ans. 5^{ème} ed. Doin. 2011

Atindehou MM, Caractérisation structurale et biologique de nouveaux agents antibactériens naturels actifs dans les infections intestinales : des peptides de la chromogranine A et des principes actifs de *Chromolaena odorata* [Thèse pour le grade de Doctorat d'Université, Science du Vivant]. Strasbourg, Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, 2012

Aung, G, Niyonsaba F, Ushio H, Hoq MI, Ikeda S, Ogawa H and Okumura, K, A neuroendocrine antimicrobial peptide, catestatin, stimulates interleukin-8 production from human keratinocytes via activation of mitogen-activated protein kinases. *J Dermatol Sci*. 2011

Baker MA, Maloy WL, Zasloff M, Jacob LS, Anticancer efficacy of Magainin2 and analogue peptides. *Cancer Res*. 1993

Banks P and Helle K, The release of protein from the stimulated adrenal medulla. *Biochem*. 1965

Bartolomucci A, Pasinetti GM, Salton SR. Granins as disease-biomarkers: translational potential for psychiatric and neurological disorders. *Neuroscience*. 2010 Sep 29;170(1):289-97. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.06.057. Epub 2010 Jul 1. Review. Erratum in: *Neuroscience*. 2011 Jan 13;172:580

Beaudry M, Chiasson S, Lauzière J, Biologie de L'Allaitement: Le Sein - le Lait - le Geste. 2006

Beeley JA, Basic proline-rich proteins: multifunctional defence molecules. *Oral Dis*. 2001

Bennick A, Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002

Beuret N, Stettler H, Renold A, Rutishauser J, Spiess M. Expression of regulated secretory proteins is sufficient to generate granule-like structures in constitutively secreting cells. *J Biol Chem*. 2004 May 7; 279(19):20242-9. Epub 2004 Mar 2

Blaschko H, Comline RS, Schneider FH, Silver M, Smith AD. Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splanchnic stimulation. *Nature*.

1967 Jul 1; 215(5096):58-9

Bonass WA, High AS, Owen PJ, Devine DA, Expression of beta-defensin genes by human salivary glands. *Oral Microbiol Immunol.* 1999

Borenstein LA1, Selsted ME, Lehrer RI, Miller JN, Antimicrobial activity of rabbit leukocyte defensins against *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. *Infect Immun.* 1991

Bowdish DM, Davidson DJ, Lau YE, Lee K, Scott MG, Hancock RE., Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J Leukoc Biol.* 2005

Braff MH, Bardan A et al., Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *J Invest Dermatol.* 2005

Briolat J, Wu SD, Mahata SK, Gonthier B, Bagnard D, Chasserot-Golaz S, Helle KB, Aunis D and Metz-Boutigue MH, New antimicrobial activity for the catecholamine release-inhibitory peptide from chromogranin A. *Cell Mol Life Sci.* 2005

Brogden KA, Ackermann M, McCray PB Jr, Tack BF. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int J Antimicrob Agents.* 2003 Nov; 22 (5) :465-78.

Brogden KA, Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005

Carpenter GH. The secretion, components, and properties of saliva. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2013; 4:267-76. doi: 10.1146/annurev-food-030212-182700.

Chakraborty TR, Tkalych O, Nanno D, Garcia AL, Devi LA, Salton SR. Quantification of VGF- and pro-SAAS-derived peptides in endocrine tissues and the brain, and their regulation by diet and cold stress. *Brain Res.* 2006 May 17;1089(1):21-32. Epub 2006 May 2.

Chen FY, Lee MT, Huang HW. Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. *Biophys J.* 2003 Jun;84(6):3751-8.

Davidopoulou S, Eudoxia D, Georgios Menexes, Sotirios Kalfas, Salivary concentration of the antimicrobial peptide LL-37 in children. *Oral Biology.* 2012

Dabirian, S, Taslimi Y, Zahedifard F, Gholami E, Doustdari F, Motamedirad M, Khatami S, Azadmanesh K, Nylen S, Rafati S, Human neutrophil peptide-1 (HNP-1): A new anti-leishmanial drug candidate. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013

Dermer A. Breastfeeding and Women's Health. *J Womens Health.* 1998

Derwenskus KH, Sprinzl M, Scheit KH, Inhibition of cell proliferation by basic proteins from bull seminal plasma. *Bio Chem Hoppe Seyler.* 1989

Devine DA, Antimicrobial peptides in defence of the oral and respiratory tracts. *Mol Immunol.* 2003

Diamond G, Beckloff N, Weinberg A and Kisich KO, The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr Pharm Des.* 2009

- Dimarcq JL, Zachary D, Hoffmann JA, Hoffmann D, Reichhart JM. Insect immunity: expression of the two major inducible antibacterial peptides, defensin and dipteracin, in *Phormia terranova*. *EMBO J*. 1990 Aug;9(8):2507-15.
- Dimarcq JL, Bulet P, Hetru C, Hoffmann J. Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymers*. 1998;47(6):465-77.
- Edman P, Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta chemica scandivanica*. 1950
- Egger M, Beer AG, Theurl M, Schgoer W et al., Monocyte migration: a novel effect and signaling pathways of catestatin. *Eur J Pharmacol*. 2008
- Ellison R, Giehl TJ, LaForce F, Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infect Immun*. 1988
- Etienne O, Gasnier C, Taddei C, Voegel JC, Aunis D, Schaaf P, Metz-Boutigue MH, Bolcato-Bellemin AL, Egles C. Antifungal coating by biofunctionalized polyelectrolyte multilayered films. *Biomaterials*. 2005 Nov;26(33):6704-12.
- Fabiano Pinheiro da Silva, Cerqueira M, César Machado, Antimicrobial peptides: Clinical relevance and therapeutic implications. Emergency Medicine Department, University of Sao Paulo, Brazi- Review. 2012
- Fischer-Colbrie R, Schober M. Isolation and characterization of chromogranins A, B, and C from bovine chromaffin granules and a rat pheochromocytoma. *J Neurochem*. 1987 Jan;48(1):262-70.
- Gasnier C, Lugardon K, Ruh O, Strub JM, Aunis D, Metz-Boutigue MH. Characterization and location of post-translational modifications on chromogranin B from bovine adrenal medullary chromaffin granules. *Proteomics*. 2004
- Georges D, Pathologies générales et salive [Thèse pour le Doctorat en Chirurgie Dentaire]. Nancy, Faculté de chirurgie Dentaire. 2012
- Ghia JE, Crenner F, Metz-Boutigue MH, Aunis D, Angel F. Effects of a chromogranin-derived peptide (CgA 47-66) in the writhing nociceptive response induced by acetic acid in rats. *Regul Pept*. 2004 Jul 15;119(3):199-207
- Goumon Y, Strub JM, Moniatte M, Nullans G, Poteur L, Hubert P, Van Dorsselaer A, Aunis D, Metz-Boutigue MH. The C-terminal bisphosphorylated proenkephalin-A-(209-237)-peptide from adrenal medullary chromaffin granules possesses antibacterial activity. *Eur J Biochem*. 1996 Feb 1;235(3):516-25. Erratum in: *Eur J Biochem* 1996 May 1;237(3):883.
- Gremmo-Féger G, L'allaitement en 36 questions. 2000
- Guani-Guerra E, Santos-Mendoza T et al., Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol*. 2010
- Hamann KJ, Gleich GJ, Checkel J et al., In vitro killing of microfilariae of *Brugia pahangi* and *Brugia malayi* by eosinophil granule proteins. *J. Immunol*. 1990

- Hancock RE, Chapple DS. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Jun;43(6):1317-23.
- Helle KB, The granin family of uniquely acidic proteins of the diffuse neuroendocrine system: comparative and functional aspects. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2004
- Helle KB, Regulatory peptides from chromogranin A and secretogranin II: putative modulators of cells and tissues involved in inflammatory conditions. *Regul Pept*. 2010
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*. 1999 May 21;284(5418):1313-8.
- Huttner WB, Gerdes HH and Rosa P, The granin (chromogranin/secretogranin) family. *Trends Biochem Sci*. 1991
- Izadpanah A and Gallo RL, Antimicrobial peptides. *J Am Acad Dermatol* 52(3 Pt 1). 2005
- Jia HP, Mills JN, Barahmand-Pour F, Nishimura D, Mallampali RK, Wang G, Wiles K, Tack BF, Bevins CL, McCray PB Jr, Molecular cloning and characterization of rat genes encoding homologues of human beta-defensins. *Infect Immun*. 1999
- Jenssen H, Hamill P and Hancock RE, Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 2006
- Kagan BL, Ganz T, Lehrer RI, Defensins: a family of antimicrobial and cytotoxic peptides. *Toxicology*. 1994
- Kennedy BP, Mahata SK, O'Connor DT, Ziegler MG. Mechanism of cardiovascular actions of the chromogranin A fragment catestatin in vivo. *Peptides*. 1998; 19(7):1241-8.
- Kim T, Tao-Cheng JH, Eiden LE, Loh YP. Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell*. 2001 Aug 24; 106(4):499-509.
- Kopp et Ghosh, NF-kappa B and rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol*. 1995
- Kruger PG, Mahata SK and Helle KB, Catestatin (CgA344-364) stimulates rat mast cell release of histamine in a manner comparable to mastoparan and other cationic charged neuropeptides. *Regul Pept*. 2003
- Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T, Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol*. 1993
- Lehrer RI, Ganz T. Endogenous vertebrate antibiotics. Defensins, protegrins, and other cysteine-rich antimicrobial peptides. *Ann N Y Acad Sci*. 1996 Oct 25; 797:228-39
- Levy O. Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes. *J Leukoc Biol*. 2004 Nov;76(5):909-25. Epub 2004 Aug 3
- Li J, Helmerhorst EJ, Yao Y, Nunn ME, Troxler RF, Oppenheim FG, Statherin is an in vivo pellicle constituent: identification and immuno-quantification. *Arch Oral Biol*. 2004
- Li X, Li Y, Han H, Miller DW, Wang G, Solution structures of human LL-37 fragments and

NMR-based identification of a minimal membrane-targeting antimicrobial and anticancer region. *J. Am. Chem. Soc.* 2006

Lichtenstein A, Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI In vitro tumor cell cytotoxicity mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes. *Blood.* 1986

Lönnerdal B, Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr.* 2003

López-García B, Lee PH, Yamasaki K, Gallo RL, Anti-fungal activity of cathelicidins and their potential role in *Candida albicans* skin infection. *J. Invest. Dermatol.* 2005

Lugardon K, Raffner R, Goumon Y, Corti A, Delmas A, Bulet P, Aunis D, Metz-Boutigue MH, Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1, the N-terminal fragment of chromogranin A. *J Biol Chem.* 2000

Lugardon K, Chasserot-Gola S, Kieffer AE, Maget-Dana R, Nullans G, Kieffer B, Aunis D and Metz-Boutigue MH, Structural and biological characterization of chromofungin, the antifungal chromogranin A-(47-66)-derived peptide. *J Biol Chem.* 2001

Mahata SK, Mahata M, Wen G, Wong WB, Mahapatra NR, Hamilton BA, O'Connor DT. The catecholamine release-inhibitory "catestatin" fragment of chromogranin a: naturally occurring human variants with different potencies for multiple chromaffin cell nicotinic cholinergic responses. *Mol Pharmacol.* 2004 Nov;66(5):1180-91. Epub 2004 Aug 23

Malcolm J, Sherriff A, Lappin DF, Ramage G, Conway DI, Macpherson LMD, and Culshaw S, Salivary antimicrobial proteins associate with age-related changes in streptococcal composition in dental plaque. *Molecular oral microbiology.* 2014

Mamouni I, Influence des comportements alimentaires sur la morphogénèse maxillo-faciale. Thèse : chir dent : université de Strasbourg. 2007

Maróti G, Kereszt A, Kondorosi E, Mergaert P. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Res Microbiol.* 2011 May; 162(4):363-74. doi: 10.1016/j.resmic.2011.02.005. Epub 2011 Feb 12

Marquis G, Montplaisir S, Garzon S, Auger P, Fungitoxicity of muramidase. Ultrastructural damage to *Candida albicans*. *Lab Invest.* 1982

Metz-Boutigue MH, Jollès J, Mazurier J, Schoentgen F, Legrand D, Spik G, Montreuil J, Jollès P. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur J Biochem.* 1984

Metz-Boutigue MH, Garcia-Sablone P, Hogue-Angeletti R, Aunis D, Intracellular and extracellular processing of chromogranin A. Determination of cleavage sites. *Eur J Biochem.* 1993

Metz-Boutigue MH, Goumon Y, Lugardon K, Strub JM and Aunis D, Antibacterial peptides are present in chromaffin cell secretory granules. *Cell Mol Neurobiol,* 1998

- Mizukawa N, Sugiyama K, Fukunaga J, Ueno T, Mishima K, Takagi S, Sugahara T, Defensin-1, a peptide detected in the saliva of oral squamous cell carcinoma patients. *Anticancer Res.* 1998
- Mizukawa N, Sugiyama K, Ueno T, Mishima K, Takagi S, Sugahara T, Levels of human defensin-1, an antimicrobial peptide, in saliva of patients with oral inflammation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999
- Montero-Hadjadje M, Vaingankar S, Elias S, Tostivint H, Mahata SK, Anouar Y. Chromogranins A and B and secretogranin II: evolutionary and functional aspects. *Acta Physiol (Oxf).* 2008 Feb;192(2):309-24. Epub 2007 Nov 15
- Nakamura Y, Kano R, Watanabe S, Takahashi H, Hasegawa A, Enhanced activity of antifungal drugs by lysozyme against *Cryptococcus neoformans*. *Mycoses.* 1998
- Nizet V, Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr Issues Mol Biol*, 8, 11-26 - 2006
- OMS collectif. «Soins à la mère et au nouveau-né dans le post-partum: guide pratique ». Espacement des naissances. 1999
- Oppenheim FG, Xu T, McMillian FM, Levitz SM, Diamond RD, Offner GD, Troxler RF. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *J Biol Chem.* 1988 Jun 5;263(16):7472-7
- Pellat B, Salives et milieu buccal. In : EMC (Elsevier Masson SAS) Médecine buccale. 2010
- PNNS. Allaitement maternel. Les bénéfices pour la santé de l'enfant et de la mère. Comité de nutrition de la société française de pédiatrie. Coll. Synthèse du programme national nutrition-santé, PNNS. 2005
- Prommegger R, Bale R, Ensinger C, Sauper T, Profanter C, Knoflach M, Moncayo R. Gastric carcinoid type I tumour: new diagnostic and therapeutic method. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2003 Jun;15(6):705-7
- Puri S, Edgerton M, How does it kill?: understanding the candidacidal mechanism of salivary histatin 5. *Eukaryot Cell.* 2014
- Rajanbabu V and Chen JY, Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future. *Peptides.* 2011
- Rao F, Wen G, Gayen JR, Das M, Vaingankar SM, Rana BK, Mahata M, Kennedy BP, Salem RM, Stridsberg M, Abel K, Smith DW, Eskin E, Schork NJ, Hamilton BA, Ziegler MG, Mahata SK and O'Connor DT, Catecholamine release- inhibitory peptide catestatin (chromogranin A(352-372)): naturally occurring amino acid variant Gly364Ser causes profound changes in human autonomic activity and alters risk for hypertension. *Circulation.* 2007
- Rayhan R, Xu L, Santarpia RP 3rd, Tylenda CA, Pollock JJ, Antifungal activities of salivary histidine-rich polypeptides against *Candida albicans* and other oral yeast isolates. *Oral*

Microbiol Immunol. 1992

Ren SX, Shen J, Cheng AS, Lu L, Chan RL, Li ZJ, Wang XJ, Wong CC, Zhang L, Ng SS, FK-16 derived from the anticancer peptide LL-37 induces caspase-independent apoptosis and autophagic cell death in colon cancer cells. PLoS One. 2013

Rosenblatt KA, Thomas DB, Lactation and the risk of epithelial ovarian cancer. The WHO collaborative study of neoplasia and steroid contraceptives. Int J Epidemiol. 1993 Apr;22(2):192-7

Salle BL, Le lait de femme. In : RICOUR C., GHISOLFI J., PUTET G., GOULET O. Traité de nutrition pédiatrique Paris : Maloine. 1993

Sanchez L, Calvo M, and Borck JH, Biological role of lactoferrin. Arch Dis Child. 1992

Sanderson JM, Peptide-lipid interactions: insights and perspectives. Org Biomol Chem. 2005 Jan 21;3(2):201-12. Epub 2004 Nov 26

Scariati PD, Grummer-Strawn LM, Fein SB, A longitudinal analysis of infant morbidity and the extent of breast feeding in the United-States. Pediatrics. 1997

Siqueira WL, Margolis HC, Helmerhorst EJ, Mendes FM, Oppenheim FG, Evidence of intact histatins in the in vivo acquired enamel pellicle. J. Dent. Res. 2010

Schittek B, Hipfel R et al, Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. Nat Immunol. 2001

Song X, Zhang Y and Wang Y, Antimicrobial peptides peptaibols from trichoderma. Wei Sheng Wu Xue Bao. 2011 Apr; 51(4):438-44

Strub JM, Hubert P, Nullans G, Aunis D, Metz-Boutigue MH, Antibacterial activity of secretolytin, a chromogranin B-derived peptide (614-626), is correlated with peptide structure. FEBS Lett. 1996

Thirion M, L'allaitement : de la naissance au sevrage. Paris : Albin Michel. 1999

Tossi A, Sandri L, Giangaspero A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. Biopolymers. 2000;55(1):4-30

Triaa Benhammadi I, Les déterminants du choix du mode d'allaitement ; Étude prospective auprès de 111 femmes À la maternité de Max Fourestier de Nanterre [Thèse de Doctorat en Médecine]. Université Paris Diderot, Paris 7, Faculté de Médecine. 2009

Van Abel RJ, Tang YQ, Rao VS, Dobbs CH, Tran D, Barany G, Selsted ME. Synthesis and characterization of indolicidin, a tryptophan-rich antimicrobial peptide from bovine neutrophils. Int J Pept Protein Res. 1995 May; 45(5):401-9

Van den Broek I, Sparidans RW, Engwegen JY, Cats A, Depla AC, Schellens JH, Beijnen JH, Evaluation of human neutrophil peptide-1, -2 and -3 as serum markers for colorectal cancer. Cancer Biomark. 2010

Wang G, Li X, Wang Z, The updated antimicrobial peptide database and its application in

peptide design. *Nucleic Acids Res.* 2009

WHO and United Nations Children's Fund. Innocenti Declaration on the Protection, Promotion and support of breastfeeding. New York, NY, UNICEF.1990

Willis M, Leitner I, Jellinger KA, Marksteiner J. Chromogranin peptides in brain diseases. *J Neural Transm.* 2011 May; 118(5):727-35. Doi:10.1007/s00702-011-0648-z. Epub 2011 Apr 30

Winder D, Günzburg WH, Erfle V, Salmons B, Expression of antimicrobial peptides has an antitumour effect in human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998

Winkler H and Fischer-Colbrie R, The chromogranins A and B: the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience.* 1992 Aug; 49(3):497-528

Yount NY, Yeaman MR, Emerging themes and therapeutic prospects for anti-infective peptides. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2012

Zhang D, Lavaux T, Voegeli AC, Lavigne T, Castelain V, Meyer N, Sapin R, Aunis D, Metz-Boutigue MH, Schneider F. Prognostic value of chromogranin A at admission in critically ill patients: a cohort study in a medical intensive care unit. *Clin Chem.* 2008 Sep; 54(9):1497-503. doi: 10.1373/clinchem.2007.102442. Epub 2008 Jul 17

Zasloff M, Antibiotic peptides as mediators of innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 1992 Feb; 4(1):3-7