

Université de Strasbourg
Faculté de Chirurgie Dentaire

Année 2015

N°14

THESE

Présentée pour le diplôme d'Etat de Docteur en Chirurgie Dentaire

Par

Sarah NEUROHR

Née le 8 Juillet 1990 à Phalsbourg

**Incidence de l'allaitement par du lait infantile sur la
caractérisation des peptides antimicrobiens dans la salive du
nourrisson**

Présentée et soutenue publiquement le 25 Mars 2015

JURY :

Président : Professeur Marie-Cécile MANIERE

Assesseurs : Docteur Frédéric OBRY

Docteur Olivier HUCK

Docteur Marie-Hélène METZ-BOUTIGUE

Remerciements

Merci à Mme la présidente le Professeur Marie-Cécile Manière d'avoir accepté de présider ce jury et de s'être montrée toujours disponible.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse le Docteur Frédéric Obry qui a su me faire confiance pour ce travail et qui a su m'aiguiller dans la rédaction de cette étude.

Merci tout particulièrement au Docteur Marie-Hélène Metz-Boutigue qui a su me guider dans mon travail et qui m'a aidé à trouver des solutions pour avancer. Merci pour votre temps, votre patience et votre grande gentillesse.

Merci au Docteur Olivier Huck d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Merci à toute l'équipe du Dr Metz-Boutigue sans qui toutes ces heures passées au laboratoire n'auraient pas été si agréables. Merci à vous Céline, Camille, Sophie et Cosette pour votre aide précieuse et votre indéniable bonne humeur.

Je tiens également à remercier le Docteur Romain Favre ainsi que toute l'équipe de sages femmes du CMCO pour votre implication au bon déroulement de cette étude et pour votre accueil chaleureux. Merci à toi Justine de t'être énormément impliquée dans l'avancée de cette étude.

Un grand merci aux mamans ainsi qu'à leurs adorables bébés de m'avoir permis de mener à bien cette étude, de m'avoir fait entrer dans votre intimité et de vous être toujours montré souriantes et disponibles.

Merci à toi Papa de m'avoir toujours soutenue et poussée pendant toutes ces années. J'ai hâte de porter avec fierté le patronyme Docteur Neurohr.

Merci Maman d'avoir été le réconfort dont j'avais besoin et d'avoir toujours su trouver les mots justes.

Merci à vous d'avoir fait ce que je suis devenue.

Je tiens à remercier ma grande sœur Julie qui m'a vu grandir et qui a su me donner un modèle à suivre.

Merci à mes grands parents pour leur authenticité et leur amour pendant toutes ces années.

A mes beaux-parents, Roland et Véronique, merci de m'avoir accueilli comme votre propre fille dans votre famille et de m'avoir toujours soutenue.

Merci à toi Jojo d'avoir été le soutien dont j'avais besoin pendant toutes ces années, d'avoir été là dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci d'avoir accepté de te lancer dans cette aventure à deux.

Merci à toutes mes chays Magou, Marie-Charlotte, Perrine, Alice de m'avoir accompagné durant ces 6 années et de les avoir égayées. Particulièrement merci à vous Lélé et Christel d'avoir fait de ces années un ensemble de fous rires à jamais graver. Cette belle amitié ne fait que commencer.

Et enfin merci à toi Babe pour avoir fait preuve de patience et d'avoir été toujours là à mes côtés depuis bientôt 9 ans. Merci d'être qui tu es, mon âme sœur.

Introduction	8
Les laits infantiles	
I.1 Historique	10
I.2 Composition des laits artificiels.....	11
I.2.1 Législation.....	11
I.2.2 Laits 1er âge ou préparations pour nourrissons	12
I.2.3 Laits 2ème âge ou préparation de suite	17
I.2.4 Laits de croissance ou préparations pour enfant en bas âge	17
I.2.5 Etudes comparatives lait maternel et lait infantile.....	18
La salive	
II.1 Définition	20
II.2 Anatomie des glandes salivaires.....	21
II.2.1 Les glandes salivaires majeures	21
II.2.2 Les glandes salivaires mineures	22
II.3 Composition	23
II.3.1 Les constituants organiques	23
II.3.1.1 Enzymes salivaires.....	23
II.3.1.2 Les protéines riches en proline	24
II.3.1.3 Les mucines	25
II.3.1.4 La lactoferrine.....	25
II.3.1.5 Les histatines	26
II.3.1.6 Les stathérines	27
II.3.1.7 Les cystatines.....	27
II.3.1.8 Les défensines.....	28
II.3.1.9 Les immunoglobulines.....	28
II.3.2 Les constituants inorganiques	29
II.4 Rôles de la salive.....	29
II.4.1 Protection et lubrification des muqueuses.....	29
II.4.2 Pouvoir tampon.....	30
II.4.3 Maintien de l'intégrité des tissus dentaires	30
II.4.4 Propriétés antimicrobiennes	31
II.4.5 Gustation, déglutition et digestion	31
Les peptides antimicrobiens	
III.1 Structure des peptides antimicrobiens (PAMs).....	33
III.2 Classification des PAMs	35
III.2.1 Les peptides cationiques	35
III.2.1.1 Les peptides linéaires formant des hélices α	35
III.2.1.2 Les peptides linéaires riches en certains acides aminés.....	36
III.2.1.3 Les peptides riches en cystéine.....	37
III.2.2 Les peptides anioniques	40

III.2.3 Les PAMs dérivés des protéines : cas particulier de la chromogranine	41
III.3 Mode d'action des peptides antimicrobiens	42
III.3.1 Mécanisme d'action membranaire	43
III.3.1.1 Modèle en tapis ou « carpet-like »	45
III.3.1.2 Modèle en douve de tonneau ou « barrel stave »	45
III.3.1.3 Modèle des pores toroïdaux	46
III.3.2 Mécanismes d'action intracellulaire	47
Matériels et Méthodes	
IV.1 Matériels	48
IV.1.1 Prise de contact avec les futures mamans	48
IV.1.2 Collecte de la salive	49
IV.1.3 Protéines solubles des granules chromaffines	50
IV.2 Méthodes	50
IV.2.1 Purification des peptides par HPLC de phase inverse	50
IV.2.2 Tests antimicrobiens	52
IV.2.3 La spectrométrie de masse	55
IV.2.4 Le séquençage	56
IV.2.5 Quantification des pics majoritaires	59
IV.2.6 L'électrophorèse SDS-PAGE	59
IV.2.6.1 L'électrophorèse en condition dénaturantes	60
IV.2.6.2 Le support	60
IV.2.7 Le Western Blot	61
IV.2.7.1 Transfert des protéines du gel à la membrane	61
IV.2.7.2 L'immunodétection	61
Résultats et discussion	
V.1 Cinétique des profils HPLC en fonction de l'âge du nourrisson	63
V.2 Activités antimicrobiennes	65
V.3 Caractérisation structurale des peptides antimicrobiens	66
V.4 Caractérisation des fragments dérivés de la CGA et de la CGB	67
V.5 Comparaison des résultats lait artificiel/lait maternel	70
V.5.1 Comparaison des cinétiques	70
V.5.2 Comparaison de nos protéines d'intérêt	72
V.5.3 Comparaison des fragments dérivés des CGA et CGB	77
Conclusions générales et perspectives	78
Bibliographie	80
Webographie	85

Liste des abréviations

AA : Acide Aminé
AGE : Acides Gras Essentiels
AGPILC : Acides Gras Poly-Insaturés à Longue Chaîne
AZT : AnilinoThiaZolinone
BSA : Albumine Bovine Sérique
CAT : Catestatine
CGA : Chromogranine A
CGB : Chromogranine B
CGs : Chromogranines
CHR : Chromofungine
DO : Densité Optique
ESPGHAN : European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition
H⁺ : Hydrogène
H₂O₂ : Peroxyde d'Hydrogène
HNP : Peptide Neutrophile Humain
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
IgA : Immunoglobuline A
LPO-SH : Lactoperoxydase Salivaire Humaine
LPS : Lipopolysaccharide
MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight
MPO : Myéloperoxydase
NK : Cellules Natural Killer
PAM : Peptide Antimicrobien
PBS : Phosphate Buffered Saline
PITC : Phényl IsoThioCyanate
PM : Poids Moléculaire
PMN : Polymorphonucléaire
PRP : Protéines Riches en Proline
PSG : Protéines Solubles des Granules Chromaffines
PTH-aa : PhénylThioHydantoine-acides aminés
PVDF : Difluorure de Polyvinylidène
SCN⁻ : Thiocyanate
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
TFA : Acide Trifluoroacétique
TGSDS : Tris Glycine SDS

Liste des figures

- Figure 1** : Représentation schématique des principales fonctions de la salive
- Figure 2** : Localisation des glandes salivaires
- Figure 3** : Séquence de la Cathélicidine LL-37
- Figure 4** : Modèle 3D de la structure secondaire de l’Histatine 5
- Figure 5** : Structures tri-dimensionnelles d’une α -défensine humaine HNP-3 (a) et d’une β -défensine humaine hBD-1(b)
- Figure 6** : Modèle d’insertion membranaire des PAMs dans les cellules
- Figure 7** : Autres modèles d’insertion membranaire
- Figure 8** : Principe de fonctionnement de l’HPLC
- Figure 9** : HPLC DionexUltimate 3000
- Figure 10** : Calcul du pourcentage d’inhibition
- Figure 11** : Principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF
- Figure 12** : Séquenceur automatique d’Edman
- Figure 13** : Profil HPLC type des PTH- acides aminés
- Figure 14** : Réaction de couplage dans la réaction d’Edman
- Figure 15** : Réaction de clivage dans la réaction d’Edman
- Figure 16** : Réaction de conversion dans la réaction d’Edman
- Figure 17** : Cinétique des profils HPLC
- Figure 18** : Résultats des tests antimicrobiens effectués sur les pics majoritaires
- Figure 19** : Caractérisation structurale des peptides antimicrobiens
- Figure 20** : Caractérisation des fragments dérivés de la CGA
- Figure 21** : Caractérisation des fragments dérivés de la CGB
- Figure 22** : Comparaison des profils type HPLC pour 15jours
- Figure 23** : Comparaison des profils type HPLC pour 1mois
- Figure 24** : Comparaison des profils type HPLC pour 3mois
- Figure 25** : Comparaison des profils type HPLC pour 6mois
- Figure 26** : Courbes comparatives du pourcentage de PRPC par rapport aux protéines totales en fonction de l’âge
- Figure 27** : Courbes comparatives du pourcentage de mucine par rapport aux protéines totales en fonction de l’âge
- Figure 28** : Courbes comparatives du pourcentage d’histatine par rapport aux protéines totales en fonction de l’âge
- Figure 29** : Courbes comparatives du pourcentage de stathérine par rapport aux protéines totales en fonction de l’âge
- Figure 30** : Courbes comparatives du pourcentage de cystatine par rapport aux protéines totales en fonction de l’âge
- Figure 31** : Courbes comparatives du pourcentage du pic 42 par rapport aux protéines totales en fonction de l’âge
- Figure 32** : Courbes comparatives du pourcentage du pic 44 par rapport aux protéines totales en fonction de l’âge
- Figure 33** : Courbes comparatives du pourcentage du pic 46 par rapport aux protéines totales en fonction de l’âge

Liste des tableaux

Tableau I : Composition souhaitée pour les préparations de laits pour nourrissons

Tableau II : Teneurs autorisées pour les laits 1^{er} âge pour 100Kcal

Tableau III : Comparaison de la composition de lait de vache et du lait humain

Tableau IV : Nomenclature des acides-aminés

Tableau V : Les différents prélèvements de salive analysés

Tableau VI : Exemple de plaque avec les différents témoins : contrôle, T- et T+ et les fractions des peptides à analyser

Introduction

De nos jours, l'allaitement maternel est encouragé et promu. Le lait maternel est « considéré » comme le meilleur lait pour la croissance et le développement de l'enfant. L'allaitement maternel contribue à retrouver la proximité qui unissait la mère et son enfant avant sa naissance et protégerait mieux les enfants grâce à ses propriétés nutritionnelles et immunologiques. L'importance du lait maternel pour la santé de l'enfant a conduit les experts de l'Organisation Mondiale de la Santé à recommander un allaitement maternel exclusif pendant les six premiers mois de vie pour tous les nouveau-nés.

Cependant, dans les cas d'impossibilité pour la mère de nourrir son enfant, elle peut décider d'utiliser une préparation infantile pour nourrissons dont la composition est conçue pour être très proche de celle du lait maternel et assurer une croissance et un état nutritionnel satisfaisants.

Afin d'analyser l'incidence du type d'allaitement sur la protection immunologique de la cavité buccale, j'ai étudié l'expression des peptides antimicrobiens (PAMs) dans la salive de nourrissons nourris avec du lait infantile pendant la période (0-6mois). Les résultats obtenus seront comparés avec ceux d'enfants nourris avec du lait maternel.

La salive est un liquide biologique complexe qui participe de manière importante aux défenses de l'organisme. Elle est riche de ces nouveaux acteurs de l'immunité innée appelé PAMs. Dans cette étude nous avons cherché à évaluer la protection salivaire des nourrissons par l'analyse des PAMs présents dans la salive. Notre travail s'est donc tourné sur l'analyse d'échantillons salivaires de nourrissons soigneusement recrutés.

L'objectif de cette étude intitulée « Incidence de l'allaitement par du lait infantile sur la caractérisation des peptides antimicrobiens dans la salive du nourrisson » est de pouvoir comparer la caractérisation de ces peptides naturels et principalement les peptides antimicrobiens entre des nourrissons allaités exclusivement par du lait maternel et des nourrissons allaités exclusivement par des laits infantiles.

Le manuscrit de ma thèse comprend quatre grandes parties :

- Les données bibliographiques

Cette première partie présentera les données bibliographiques récentes importantes pour la compréhension de mon travail. Il s'agit des données relatives à la composition de la salive, aux peptides antimicrobiens et aux laits infantiles.

- Matériels et Méthodes

Cette deuxième partie présentera les matériels et méthodes mis en œuvre pour mener à bien nos expériences. Il s'agit d'expériences de biochimie analytique et de microbiologie.

- Résultats et discussion

Cette troisième partie présentera les résultats expérimentaux sous la forme de figures (33) et tableaux (VI). Les résultats obtenus à partir de la salive d'enfants nourris avec des laits infantiles seront analysés au cours de la période 15j-6mois et comparés puis discutés avec les résultats obtenus à partir de la salive d'enfants nourris avec du lait maternel.

- Conclusions générales et perspectives

Cette dernière partie présentera mes conclusions propres à l'étude sur les laits infantiles mais également des conclusions générales intégrant les conclusions de l'étude sur le lait maternel. Des perspectives de suite seront également présentées pour pouvoir affiner cette étude.

I.1 Historique

Lorsque l'allaitement maternel n'est pas possible, l'Homme a toujours trouvé des solutions. L'histoire relate le rôle important des nourrices, l'apparition des biberons et les formules de préparation des laits infantiles.

Avant l'invention des biberons et des formules infantiles, le recours à une nourrice était l'alternative la plus sûre et la plus courante au lait maternel de la mère. Mais une vision négative de la société envers les nourrices, combinée à l'amélioration du biberon, la disponibilité du lait d'origine animale, et les progrès dans le développement de formules lactées, ont conduit progressivement à l'abandon de l'alimentation par une nourrice. De plus, la publicité ainsi que la sécurité des formules lactées augmentent leur popularité et leur utilisation dans la société.

Au cours du temps, plusieurs types de récipients se sont succédé pour contenir les laits infantiles. Certains furent constitués à partir de bois, de céramique, et de cornes de vaches. Au Moyen-âge, les cornes de vache perforées étaient le récipient le plus utilisé. Le biberon moderne apparaît lui au début du XXème siècle.

L'accumulation de bactéries dans les dispositifs d'alimentation était préjudiciable à la santé de l'enfant. Au début du 19e siècle, l'utilisation de dispositifs d'alimentation sales, combinée à l'absence d'un bon stockage du lait et de stérilisation, ont conduit à la mort d'un tiers de tous les nourrissons nourris artificiellement pendant leur première année de vie. Grâce aux observations et aux expériences de certains médecins, les recommandations de l'Académie de médecine vont se faire de plus en plus précises et l'hygiène va devenir la principale préoccupation des fabricants. La condamnation des anciens systèmes et la stérilisation poussent les fabricants à faire évoluer leurs modèles vers une forme plus moderne (Stevens et al 2009).

Le lait maternel possède une quantité de nutriments et d'éléments fonctionnels indispensable au bon développement de l'enfant. Les laits infantiles sont capables de se rapprocher au mieux du lait maternel. Lorsque l'allaitement maternel n'est pas ou plus possible, les laits

infantiles contribuent à assurer les besoins nutritionnels de l'enfant et ce de la naissance jusqu'à l'âge de 3 ans.

I.2 Composition des laits artificiels

I.2.1 Législation

Les préparations pour nourrissons sont élaborées avec une composition spécialement conçue pour répondre aux besoins nutritionnels particuliers du nourrisson depuis la naissance jusqu'à 12 mois et de l'enfant en bas âge (de 12 mois à 36 mois).

Les préparations pour nourrissons doivent répondre à des normes fixées par arrêtés ministériels et publiées aux Journaux Officiels de la République Française et de l'Union Européenne (AFPA).

Leur composition est définie par la directive 2006/141/CE du 22 décembre 2006, transcrite en droit français par l'arrêté du 11 avril 2008. Il faut distinguer les préparations pour nourrisson des préparations de suite (Légifrance).

L'arrêté du 11 avril 2008 fixe notamment pour ces préparations :

- La limitation du terme lait aux seules préparations contenant des protéines entières de lait de vache
- L'interdiction d'utilisation des termes « maternisé » ou « humanisé » pouvant laisser croire à une équivalence de ces préparations avec le lait maternel,
- Des limites maximales de composition,
- Une liste d'additifs autorisés,
- Une supplémentation systématique de ces préparations par de la vitamine D,
- Des normes d'étiquetage à respecter

Il faut noter également que la publicité pour ces préparations est interdite vis-à-vis du grand public et que ces préparations doivent comporter sur leur étiquetage une mention relative à la supériorité de l'allaitement maternel (Légifrance).

On entend par « préparation pour nourrissons », un substitut du lait maternel formulé industriellement, conformément aux normes applicables du Codex Alimentarius, pour satisfaire les besoins nutritionnels normaux du nourrisson de la naissance jusqu'à l'âge de 4 à 6 mois et adapté à ses caractéristiques physiologiques (Koletzko et al. 2005).

I.2.2 Lait 1er âge ou préparations pour nourrissons

Les préparations pour nourrissons sont des produits à base de lait de vache ou d'autres animaux et/ou d'autres ingrédients qui se sont avérés être appropriés pour l'alimentation du nourrisson. La valeur nutritionnelle, la sécurité et l'adéquation des préparations pour nourrissons doivent être scientifiquement démontrées pour soutenir la croissance normale et le développement des nourrissons.

Un apport énergétique trop important entraînerait une augmentation du gain de poids, un risque d'obésité infantile trop important, c'est pourquoi la limite supérieure de la densité énergétique autorisée pour les préparations pour nourrissons est de 70kcal/100mL. La limite minimale se définit autour de 60kcal/100mL.

Le tableau I présente pour 100kcal les nutriments nécessaires à l'élaboration des laits infantiles avec leur niveau minimum et leur niveau maximum.

Component	Unit	Minimum	Maximum
Energy	kcal/100 ml	60	70
Proteins			
Cows' milk protein	g/100 kcal	1.8*	3
Soy protein isolates	g/100 kcal	2.25	3
Hydrolyzed cows' milk protein	g/100 kcal	1.8†	3
Lipids			
Total fat	g/100 kcal	4.4	6.0
Linoleic acid	g/100 kcal	0.3	1.2
α -linolenic acid	mg/100 kcal	50	NS
Ratio linoleic/ α -linolenic acids		5:1	15:1
Lauric + myristic acids	% of fat	NS	20
Trans fatty acids	% of fat	NS	3
Erucic acid	% of fat	NS	1
Carbohydrates			
Total carbohydrates‡	g/100 kcal	9.0	14.0
Vitamins			
Vitamin A	μ g RE/100 kcal§	60	180
Vitamin D ₃	μ g/100 kcal	1	2.5
Vitamin E	mg α -TE/100 kcal	0.5¶	5
Vitamin K	μ g/100 kcal	4	25
Thiamin	μ g/100 kcal	60	300
Riboflavin	μ g/100 kcal	80	400
Niacin#	μ g/100 kcal	300	1500
Vitamin B ₆	μ g/100 kcal	35	175
Vitamin B ₁₂	μ g/100 kcal	0.1	0.5
Pantothenic acid	μ g/100 kcal	400	2000
Folic acid	μ g/100 kcal	10	50
Vitamin C	mg/100 kcal	8	30
Biotin	μ g/100 kcal	1.5	7.5
Minerals and trace elements			
Iron (formula based on cows' milk protein and protein hydrolysate)	mg/100 kcal	0.3**	1.3
Iron (formula based on soy protein isolate)	mg/100 kcal	0.45	2.0
Calcium	mg/100 kcal	50	140
Phosphorus (formula based on cows' milk protein and protein hydrolysate)	mg/100 kcal	25	90
Phosphorus (formula based on soy protein isolate)	mg/100 kcal	30	100
Ratio calcium/phosphorus	mg/mg	1:1	2:1
Magnesium	mg/100 kcal	5	15
Sodium	mg/100 kcal	20	60
Chloride	mg/100 kcal	50	160
Potassium	mg/100 kcal	60	160
Manganese	μ g/100 kcal	1	50
Fluoride	μ g/100 kcal	NS	60
Iodine	μ g/100 kcal	10	50
Selenium	μ g/100 kcal	1	9
Copper	μ g/100 kcal	35	80
Zinc	mg/100 kcal	0.5	1.5
Other substances			
Choline	mg/100 kcal	7	50
Myo-inositol	mg/100 kcal	4	40
L-carnitine	mg/100 kcal	1.2	NS

Tableau I : Composition souhaitée pour les préparations de laits pour nourrissons (Koletzko et al. 2005)

➤ Les protéines

Deux types de protéines sont présents dans le lait : les caséines et les protéines sériques. Les caséines sont des macro-protéines insolubles ayant un rôle nutritionnel et sont plus longues à digérer par l'organisme. A l'inverse, les protéines sériques sont plus petites, solubles et ont un rôle fonctionnel. Ce sont la lactoferrine, la lactalbumine, les immunoglobulines et les lysozymes : elles représentent la qualité nutritionnelle des protéines. Elles présentent l'avantage d'une meilleure valeur biologique et apportent des acides aminés essentiels que le nourrisson ne peut synthétiser. Le lait de femme comporte 40% de caséines et 60% de protéines sériques. Le lait de vache contient lui 80% de caséines et 20% de protéines sériques : il n'est donc pas adapté à l'enfant. Les préparations pour nourrissons

peuvent présenter un profil protéique et glucidique variable, les rendant plus proches du lait maternel ou du lait de vache. La teneur en protéines des « laits 1er âge » est fixée, depuis le 31 décembre 2009, entre 1.8 et 3.0 g/100kcal de protéines (Commission 2006). Un chiffre en baisse qui permet de se rapprocher de celui du lait maternel (0.8 à 1.2 g/100kcal).

Plus un nourrisson consomme de grandes quantités de protéines et plus son risque d'être en surpoids en grandissant est important.

Concernant l'apport en acides aminés, l'ESPGHAN (European Society for Pediatric gastroenterology, Hepatology and Nutrition) se base sur plusieurs études effectuées à partir de la teneur en acides aminés du lait maternel. La directive de 2006 impose que ces préparations pour nourrissons contiennent au moins les mêmes quantités en acides aminés essentiels que le lait maternel, sachant qu'aucune limite supérieure n'a été fixée (Koletzko et al. 2005).

On dit que les protéines d'un lait ne sont pas modifiées lorsque le rapport : caséine sur protéines solubles se rapproche de celui du lait de vache (80 / 20). On parle de protéines modifiées lorsque ce rapport est inversé, se rapprochant ainsi de la composition du lait maternel (Boquet 2006).

Les laits infantiles sont fabriqués à partir du lait de vache et « héritent » de sa fraction protéique. Pour limiter le risque allergisant des protéines du lait de vache une hydrolyse de ces protéines peut être réalisée : selon le degré d'hydrolyse, on parlera de laits hypoallergéniques (HA) ou d'hydrolysats (Boquet 2006).

➤ Les glucides

Les glucides représentent une source d'énergie essentielle : parmi eux se retrouvent dans les préparations pour nourrissons le lactose (principal glucide du lait maternel), le maltose, saccharose, glucose, les malto-dextrines et les amidons ; sachant que l'utilisation du glucose et du saccharose se limite aux préparations pour nourrissons à base d'hydrolysats de protéines, d'après la directive 2006/141/CE. Les amidons étant bien digérés par les nourrissons, ils peuvent faire partie de la composition des laits infantiles dans le but d'augmenter l'apport calorique. La teneur en glucides des préparations pour nourrissons est fixée par la directive de 2006 à des valeurs comprises entre 9 à 14 g/100kcal.

La majorité des laits infantiles ont une composition mixte : lactose et dextrose maltose.

➤ Les lipides

Les lipides contenus dans ces préparations pour nourrissons représentent les acides gras essentiels (AGE), les acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPILC), et les autres acides gras retrouvés dans ces « laits 1er âge ». Concernant les acides gras essentiels, la teneur en acide linoléique (acide gras w3) est comprise entre 300 et 1200mg/100kcal et permet de couvrir les besoins de l'enfant (Koletsko et al. 2005). L'acide α -linoléique (acide gras w6) aurait des effets néfastes, tels une accélération de l'oxydation des lipides et une perturbation de la stabilité du produit, s'il était présent en trop grande quantité, la limite maximale est fixée à une valeur de 240mg/100kcal. Idéalement il faut que le lait ait un rapport w3/w6 le plus bas possible (inférieur à 8, de préférence proche de 5) pour que l'organisme puisse fabriquer dans de bonnes proportions d'autres substances qui diminueront les réactions inflammatoires et peut être même aideront à limiter le surpoids. Le nourrisson étant incapable de mettre en action son système de désaturation afin d'allonger les chaînes d'acides gras polyinsaturés, il est essentiel d'incorporer aux laits infantiles des acides gras polyinsaturés à longue chaîne, fondamentaux pour le développement du cerveau, le développement sensoriel et psychomoteur, ainsi que pour la vision. La directive européenne de 2006 n'impose pas l'adjonction des AGPI-LC mais en revanche l'autorise.

D'autres acides gras sont retrouvés dans la composition des préparations de laits pour nourrissons comme l'acide myristique et l'acide laurique qui sont une source d'énergie importante, mais dont la teneur ne doit pas dépasser 20% du total des lipides.

Les précurseurs des acides gras polyinsaturés à longue chaîne, acide linoléique pour la famille oméga 6 et acide alpha linoléique pour la famille oméga 3, sont présents dans les laits infantiles (Bocquet 2006).

➤ Les minéraux

Les teneurs en minéraux autorisées sont validées par la Directive de 2006 ainsi que par l'ESPGHAN. Seul le Fer engendre des doutes concernant les quantités contenues dans les préparations pour nourrissons, malgré son rôle essentiel lors de la croissance des nouveau-nés. Compte tenu qu'un apport excessif de fer causerait une accumulation de celui-ci dans l'organisme, la teneur en fer de ces laits 1^{er} âge a donc été abaissée à 1.3mg/100kcal, car des valeurs supérieures ne permettraient d'obtenir aucun bénéfice (**Tableau II**).

Eléments	Minimum	Maximum
Sodium (mg)	20	60
Potassium (mg)	60	160
Chlore (mg)	50	160
Calcium (mg)	50	140
Phosphore (mg)	25	90
Magnésium (mg)	5	15
Fer (mg)	0.3	1.3
Zinc (mg)	0.36	1.5
Cuivre (mg)	25	100
Iode (µg)	10	50
Sélénium (µg)	1	9
Manganèse (µg)	1	100
Fluor (µg)	-	100
Vitamines	Minimum	Maximum
Vit C ou AC. Ascorbique (mg)	10	30
Vit A (µg)	60	180
Vit D (µg)	1	2.5
Vit E (mg)	0.5	5
Vit K (µg)	4	25
Vit B1 ou Thiamine (µg)	60	300
Vit B2 ou Riboflavine (µg)	80	400
Vit B3 ou Niacine (µg)	300	1500
Vit B5 ou Ac.Panhotémique (µg)	400	2000
Vit B6 (µg)	35	175
Vit B8 ou Biotine (µg)	1.5	7.5
Vit B9 ou Ac folique (µg)	10	50
Vit B12 ou Cobalamine (µg)	0.1	0.5

Tableau II : Teneurs autorisées pour les laits 1^{er} âge pour 100Kcal (Commission)

I.2.3 Laits 2ème âge ou préparation de suite

Les préparations de suite sont considérées comme des denrées alimentaires destinées à l'alimentation particulière des nourrissons lorsqu'une alimentation complémentaire appropriée est introduite et constituant le principal élément liquide d'une alimentation progressivement diversifiée de ces nourrissons (Arrêté du 11 Avril 2008).

Ces préparations sont destinées aux nourrissons après l'âge de 4 à 6 mois chez lesquels la diversification alimentaire a commencé et pour lesquels le lait n'est plus l'aliment exclusif. En effet, la période de la diversification alimentaire, même bien conduite, s'accompagne d'une augmentation des apports en protéines et en sodium ainsi qu'une insuffisance d'apport en acides gras essentiels, en vitamine D et surtout en fer. Néanmoins, les constituants de ces laits sont en concentration plus importante que dans les préparations pour nourrissons afin de compenser la réduction de consommation de lait liée à l'établissement de la diversification alimentaire

Les préparations de suite ont un apport plus adapté en protéines, leur teneur est plus élevée que dans les « laits 1er âge ». Le rapport caséines/protéines solubles est comparable à celui du lait de vache soit 80/20. Par rapport aux préparations pour nourrissons, les préparations de suite contiennent un sucrage mixte, composé de 70% de lactose environ et 30% de dextrine maltose. Ces préparations de suite sont 24 fois plus riches en Fer que le lait de vache, ce qui aide à réduire les risques de carence martiale chez le nouveau-né. Le taux d'AGE est 7 fois plus élevé que le lait de vache, or un enrichissement en AGE permet un bon développement cérébral et rétinien.

I.2.4 Laits de croissance ou préparations pour enfant en bas âge

De 1 à 3 ans le lait infantile reste essentiel dans l'alimentation de l'enfant. En effet, il a encore des besoins nutritionnels spécifiques auxquels le lait de vache ne répond pas. Le Programme National Nutrition Santé recommande donc le lait de croissance jusque l'âge de 3 ans. L'enfant est toujours en phase de croissance rapide, avec des besoins nutritionnels encore importants en protéines, calcium, fer et acides gras essentiels. Certains considèrent que le lait de croissance recommandé entre 1 et 3 ans n'est qu'un pur produit commercial et pourtant des

arguments sérieux plaident contre cette idée. La raison principale pour prescrire les laits de croissance plutôt que du lait de vache entre 1 et 3 ans est leur enrichissement en fer. Après l'âge d'un an, l'alimentation de l'enfant est alors totalement diversifiée. Cependant, elle risque de ne pas apporter assez de fer et d'acides gras essentiels. Les laits de croissance sont donc capables de pallier à ces carences et d'assurer les apports recommandés : 250mL de lait de croissance par jour apportent 3,3mg de fer contre seulement 0,1mg pour le même volume de lait de vache natif (Salle 2009). L'enrichissement des laits de croissance en acides gras essentiels et en vitamine D et leur appauvrissement en protéines sont des arguments moins déterminants mais à prendre également en compte. En contrepartie, l'inconvénient, souvent mis en avant par les familles en défaveur des laits de croissance, est leur prix plus élevé. L'autre reproche qui leur est fait est leur aromatisation constante qui pourrait entraîner des difficultés à accepter le goût des laits ordinaires.

I.2.5 Etudes comparatives lait maternel et lait infantile

Peu d'études comparatives entre les deux types d'alimentation ont été menées. En effet, les données bibliographiques ne présentent que les différences de composition entre les deux types de lait (**Tableau III**).

Nutriment	Lait de vache (/100g)	Lait humain (/100g)
Protéines (g)	3,3	1,0
Caséines	2,7 (82%)	0,6 (60%)
Lactosérum	0,6 (18%)	0,4 (40%)
Matières grasses (g)	3,3	4,4
Lactose (g)	4,7	6,9
Minéraux (mg)	0,7	0,2
Calcium (mg)	119	32
Phosphore (mg)	93	14
Magnésium (mg)	13	3
Potassium (mg)	152	51
Vitamines		
Riboflavines (mg)	0,16	0,04
Vit B12 (µg)	0,36	0,04

Tableau III : Comparaison de la composition de lait de vache et du lait humain (Lebeuf et al. 2002)

Ce tableau permet de constater que la proportion de chaque constituant est différente dans les deux laits. La quantité de protéines est supérieure dans le lait de vache alors que le lactose se retrouve en plus grande quantité dans le lait humain. On remarque également des taux de minéraux plus élevés pour le lait de vache, par exemple le calcium est présent presque 4 fois plus dans le lait de vache que dans le lait humain.

II.1 Définition

La salive est un liquide biologique essentiel au maintien de la santé bucco-dentaire et au bon déroulement de nombreuses fonctions orales (mastication, gustation, digestion, phonation, etc.). Sa production est assurée, dès le huitième mois *in utero*, par un ensemble de glandes dites majeures (glandes parotides, submandibulaires et sublinguales) et mineures (disséminées dans la muqueuse buccale).

La salive est aujourd'hui reconnue comme fluide tissulaire riche et complexe. La salive est impliquée dans une grande variété de processus biologiques essentiels au bon déroulement des fonctions orales (**Figure 1**).

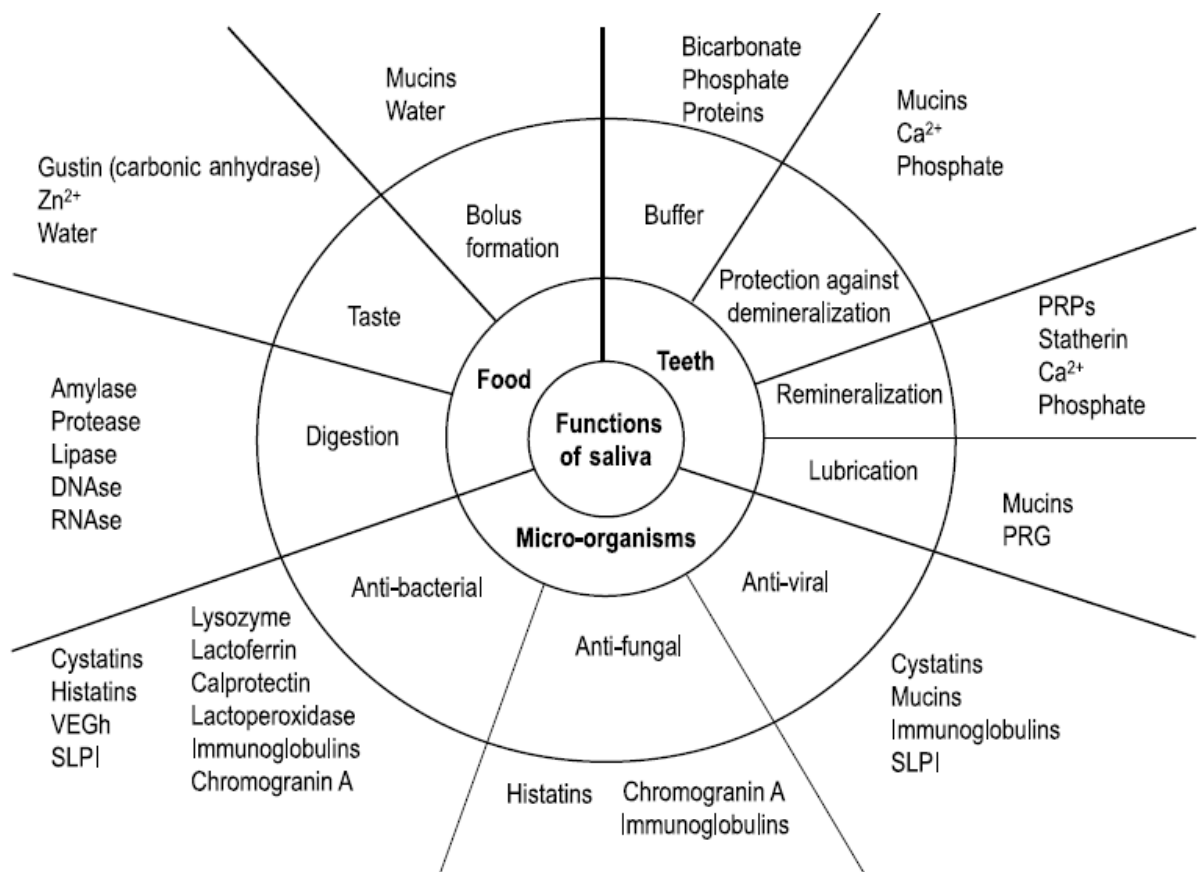


Figure 1 : Représentation schématique des principales fonctions de la salive (Amerogen et al. 2002)

Elle participe également de manière importante aux défenses de l'organisme et au maintien d'une balance biologique.

II.2 Anatomie des glandes salivaires

La sécrétion salivaire fait partie intégrante des processus physiologiques de la cavité buccale. Elle est assurée par un ensemble de glandes exocrines dites majeures (parotides, submandibulaires et sublinguales) et de glandes mineures (**Figure 2**).

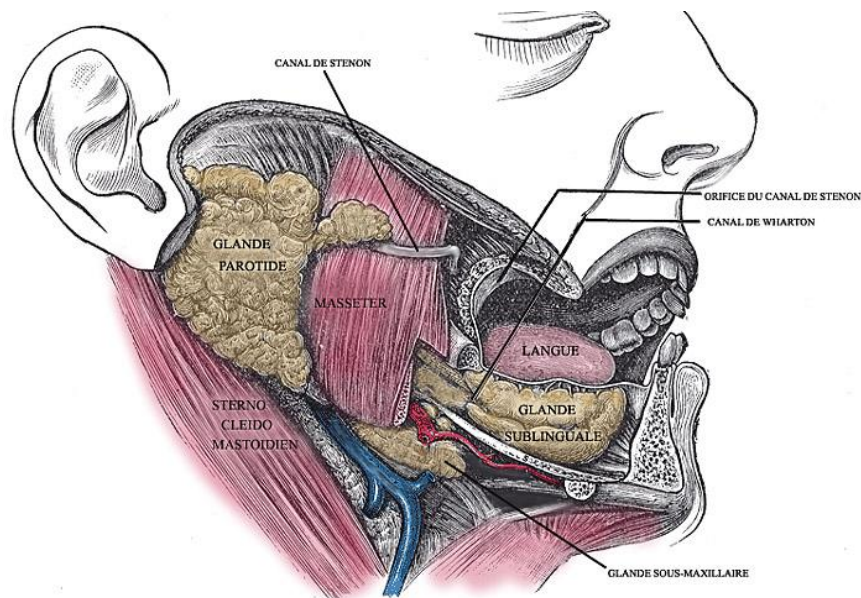


Figure 2: Localisation des glandes salivaires (Henry Gray, Anatomy of the Human Body. 1918)

II.2.1 Les glandes salivaires majeures

On distingue 3 paires de glandes salivaires majeures

- Les glandes parotides

Elles sont de forme pyramidale, moulées sur les parois de la loge parotidienne entre le muscle masséter et la peau ; leur forme irrégulière est adaptée à la dépression qui s'interpose

entre le ramus mandibulaire et les apophyses styloïde et mastoïde de l'os temporal. Elles possèdent un canal excréteur, le conduit parotidien ou canal de Sténon (4cm de longueur et 3mm de diamètre) qui débouche dans la cavité buccale à la face interne de la joue, en regard des molaires supérieures.

- Les glandes submandibulaires

Les glandes submandibulaires ont la taille d'une grosse amande. Elles sont situées dans la partie latérale de la région sus-hyoïdienne et longent la base de la branche horizontale de la mandibule. Leurs canaux excréteurs, ou canaux de Wharton (longs de 5 à 6cm), cheminent entre les glandes sublinguales et le muscle génioglosse ; ils s'abouchent au sommet des caroncules sublinguales.

- Les glandes sublinguales

Les glandes sublinguales ont une forme allongée et aplatie transversalement. Chacune d'elles repose sur le plancher de la bouche entre la mandibule et le muscle génioglosse. Les glandes sublinguales droite et gauche s'unissent en fer à cheval autour du frein de la langue. Elles sont constituées d'une agglomération de petites glandes et possèdent autant de conduits excréteurs. On compte 15 à 30 conduits sublinguaux mineurs (canaux de Walther) et un canal sublingual majeur, le canal de Rivinus ou de Bartholin. Ce dernier s'abouche au niveau de la papille sublinguale, en dehors de la caroncule linguale.

II.2.2 Les glandes salivaires mineures

Les glandes salivaires « mineures », ou « accessoires », sont les seules annexes de la muqueuse buccale. Grâce à leur sécrétion salivaire continue, elles assurent l'humidification permanente de la cavité buccale. Très nombreuses, elles sont disséminées sur toute la surface de la muqueuse buccale, excepté au niveau des gencives, du vermillon des lèvres, de la partie antérieure du palais dur et de la face dorsale de la langue. Leur existence et leur situation est variable selon les individus. Elles sont constituées de grappes d'acini unilobulaires (les plus simples) ou paucilobulaires (formées de deux ou trois lobules séparés par du conjonctif). Elles sont formées de cellules muqueuses, séreuses ou mixtes. Une couche de cellules

myoépithéliales, douées d'une activité musculaire contractile, circonscrit ces acinis, qui déversent leurs sécrétions dans des canaux excréteurs (Dawes et al. 2008).

II.3 Composition

La salive est un mélange complexe de sécrétions produites par les glandes salivaires, de résidus alimentaires, de fluide gingival, de cellules épithéliales desquamées, de bactéries orales non adhérentes, de transsudat de la muqueuse orale, de nombreux électrolytes d'origine plasmatique, etc. Elle est composée à 99% d'eau, le 1% restant est représenté par des constituants organiques et inorganiques (Humphrey et al. 2001).

II.3.1 Les constituants organiques

II.3.1.1 Enzymes salivaires

➤ Amylase

L'enzyme la plus abondante dans la salive est l' α - amylase, allant de 100 à 2600tg /ml des sécrétions de la parotide. Elle a également été identifiée comme constituant de la pellicule exogène acquise. Elle participe à la dégradation des amidons alimentaires en maltose par l'hydrolyse des liaisons glucidiques (α 1-4) (Scannapieco et al. 1994).

➤ Lipase

Cette enzyme est néanmoins et principalement produite par les glandes linguales. Cette enzyme est assez active. On estime ainsi que, chez l'homme 20% à 30% des triglycérides peuvent être hydrolysés par la lipase salivaire avant d'atteindre l'intestin. Cette enzyme peut hydrolyser les triglycérides, mais aussi les phospholipides, les esters de cholestérol, ainsi que de nombreux autres esters.

➤ Les lactoperoxydases.

Les peroxydases présentes dans la salive ont deux origines :

- la lactoperoxydase salivaire humaine (LPO-SH), synthétisée et sécrétée par les glandes salivaires ;
- la myéloperoxydase (MPO), synthétisée par les polynucléaires neutrophiles migrant dans la cavité orale par le sulcus gingival. Les MPO représentent entre 30% et 75% du total des peroxydases.

Les lactoperoxydases sont des enzymes contribuant à rendre un milieu antiseptique en utilisant le thiocyanate (SCN-) comme substrat. Le SCN- est oxydé par l'enzyme en utilisant le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), produisant des ions qui dénaturent les protéines bactériennes (Scannapieco et al. 1994). De nombreux dentifrices et bains de bouche ont d'ailleurs été supplémentés en H₂O₂ afin de renforcer l'activité de ces enzymes (Amerogen et al. 2002).

Les peroxydases salivaires peuvent également neutraliser les effets délétères du H₂O₂ produit par un certain nombre de micro-organismes oraux, réduire la production acide de la plaque dentaire stimulée par le glucose (Scannapieco et al. 1994).

➤ Le lysozyme.

Celui-ci est présent à hauteur de 10% des protéines totales. Le lysozyme a aussi un pouvoir antiseptique et agit comme une enzyme lytique capable de lyser des bactéries, en particulier celles à Gram positif, indépendamment de leur pouvoir pathogène. En revanche, les bactéries à Gram négatif sont généralement résistantes à cette enzyme, grâce à la couche externe de lipopolysaccharides (LPS) qui les caractérise. Le lysozyme est capable également de lyser la paroi des germes fongiques (Amerogen et al. 2002).

II.3.1.2 Les protéines riches en proline

La famille des protéines riches en proline (PRP) représente chez l'homme près des deux tiers du total des protéines de la salive parotidienne (1,251-230µg/ml) et submandibulaire (1,335-270µg/ml). Bien que le rôle de ces protéines soit resté obscur pendant un long temps, des recherches récentes suggèrent qu'elles possèdent de multiples fonctions telles que la protection des cellules épithéliales orales contre les bactéries buccales, et les tanins alimentaires, y compris un rôle dans la fixation du calcium. Il a été aussi montré que la salive possède des propriétés antivirales mais la nature exacte de ces propriétés reste encore

incertaine. Il a été démontré *in vitro* que les PRPs ainsi que dans une moindre mesure les cystatines seraient impliqués pour supprimer de façon sélective le virus de l'herpès simplex (Beeley et al. 2001). Il existe deux principaux groupes de PRP, basiques et acides ; ils peuvent être glycosylés ou non glycosylés (Beeley et al. 2001).

Les PRP acides contribuent au maintien de l'homéostasie du calcium dans la cavité buccale. Les PRP basiques glycosylées agissent comme lubrifiant. Le rôle des PRP basiques n'est pas encore bien compris ; leur rôle serait de protéger le tractus gastro-intestinal des effets toxiques des tanins (Bennick et al. 2002).

II.3.1.3 Les mucines

Approximativement 16 % des protéines présentes dans la salive mixte sont de la famille des mucines. Elles sont sécrétées principalement par les cellules à mucus des glandes sublinguales. Ces glycoprotéines 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 (Humphrey et al. 2001).

En raison de leur teneur élevée en hydrate de carbone (> 80 %), leurs grandes dimensions (> 1 μm), et leur structure filiforme prolongée, les sécrétions classiques à de faibles concentrations de mucines forment un gel viscoélastique hydrophile. Ces gels fonctionnent comme des barrières pour la protection de l'épithélium sous-jacent contre des dommages mécaniques et pour prévenir l'entrée directe d'agents nocifs, y compris les bactéries et les virus. Fait intéressant, le domaine N-terminal riche en histidine de MUC7, qui englobe la séquence 23-37 a des propriétés bactéricides, probablement parce qu'il est capable de se lier et de perturber les membranes bactériennes (Amerogen et al. 2002).

II.3.1.4 La lactoferrine

La lactoferrine est une protéine capable de fixer le fer et appartenant à la famille des transferrines. Elle possède des effets bactéricides, virucides et fongicides. Il a également été décrit un effet antitumoral. Elle interviendrait ainsi dans la régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire, et aurait des propriétés anti-inflammatoires par modulation de la

réponse immunitaire (Singh et al. 2002). Sa production est majoritairement assurée par les polynucléaires neutrophiles présents au niveau du parenchyme glandulaire et, parfois, par les cellules épithéliales des muqueuses orales (Baker et al. 2005).

Le rôle de la lactoferrine dans les sécrétions comme les larmes, le lait et la salive est généralement relié à ses propriétés de fixation du fer. Il est généralement admis que les propriétés bactériostatiques de la lactoferrine soient dues à la fixation au fer. De plus, dans les années quatre-vingt-dix, il a été montré que les lactoferrines humaines et bovines contiennent un domaine antimicrobien cryptique qui est exprimé à partir de la molécule après digestion protéolytique par la pepsine.

Il est concevable que les domaines antimicrobiens soient relargués pendant la digestion de la lactoferrine dans le tractus gastro-intestinal. Cela soutiendrait l'idée que les protéines salivaires, en plus de la bouche, peuvent également être impliquées dans la protection en aval le long du tractus gastro-intestinal (Amerogen et al. 2002).

II.3.1.5 Les histatines

En raison de sa puissante propriété fongicide (Oppenheim et al. 1988), l'histatine 5 a fait l'objet de nombreuses études. Les histatines sont des petites protéines (3 à 5KDa) riches en histidine, sécrétées par les glandes parotides, submandibulaires et sublinguales. Leurs formes prédominantes sont l'histatine 1, 3 et 5 contenant respectivement 38, 32 et 24 acides aminés.

L'intérêt majeur des histatines provient du fait qu'elles présentent des activités bactéricides contre une large gamme de champignons pathogènes, y compris *C. albicans*, *C. neoformans* et *A. fumigatus*.

L'histatine 1 contient une sérine phosphorylée au niveau du résidu 2. Les histatines 1 et 3 sont codées par deux gènes différents. Les histatines mineures 2, 4, et 5 à 12 proviennent du clivage protéolytique post-traductionnel des histatines 1 et 3. Les histatines auraient une activité antifongique (Baker et al. 2005). Leur concentration est maximale dans les sécrétions parotidiennes et submandibulaires (entre 30 et 150µg/ml) ; dans la salive totale, elle est de seulement 2 à 4µg/ml (Helmerost et al. 2001 ; Johnson et al. 2005 ; Tsai et al. 1998).

Dans la salive humaine au moins 12 histatine –like peptides ont été identifiées, dont la majorité sont des fragments de dégradation de deux molécules parentes, l’histatine 1 et l’histatine 3.

En plus de tuer des bactéries telles que *S. mutans* (Mackay et al. 1984) et des levures, l’histatine 5 a été impliquée dans une variété de processus, y compris la formation de la pellicule, la neutralisation de substances potentiellement nocives, par exemple les polyphénols, la chélation d'ions métalliques, l’inhibition de l’induction des cytokines inflammatoires et l'inhibition de protéases de l’hôte et bactériennes, y compris les métalloprotéinases et protéases à cystéine (Amerogen et al. 2002).

II.3.1.6 Les stathérines

Elles sont sécrétées par les glandes parotides (16-147µg/ml) et sont riches en résidus tyrosine et tyrosine phosphorylée (Ser2 et Ser-3) ; (Helmerost et al. 2004).

Les stathérines sont les seules protéines salivaires capables d’inhiber la précipitation spontanée des phosphates de calcium dans une salive sursaturée. Les stathérines ont aussi un rôle de lubrification des surfaces dentaires et participent à l’élaboration de la pellicule exogène acquise. En effet, elles sont reconnues par certaines bactéries orales. Celles-ci adhèrent d’ailleurs préférentiellement aux stathérines liées à l’hydroxyapatite, plutôt qu’à la forme libre de la protéine (meilleure exposition des sites de reconnaissance du fait d’une structure tridimensionnelle plus compacte après liaison à l'hydroxyapatite (Goobes et al. 2006).

II.3.1.7 Les cystatines

Sur la base des caractéristiques structurales et fonctionnelles, les cystatines peuvent être classées en trois familles : la première famille des cystatines (stefins A and B) se trouve principalement en milieu intracellulaire avec des poids moléculaires de 12kDa, la deuxième famille des cystatines (S, SA, SN, C) se trouve essentiellement en milieu extracellulaire pour un poids moléculaire de 14kDa, et la troisième famille sont les trois cystatines kininogènes de haut poids moléculaires (Henskens et al. 1994).

Les cystatines salivaires sont sécrétées par les glandes salivaires parotides (1,2-1,6µg/ml), submandibulaires et sublinguales (92-130µg/ml). Les gènes salivaires des

cystatines humaines font partie d'une famille multigénique composée de sept membres séparés sur le chromosome 20 (Aguirre et al. 1991). Les cystatines sont des inhibiteurs naturels des protéases à cystéine. Leur rôle serait de protéger les tissus buccaux de ces enzymes.

Dans la salive au moins neuf isoformes différentes de cystatine sont sécrétées : la cystatine SN, trois isoformes modérément anioniques de cystatine SA, trois ou quatre isoformes plus anioniques que la cystatine S et la cystatine C et une cystatine cationique. En raison de leurs propriétés inhibitrices de protéase, les cystatines ont été proposées pour jouer un rôle dans le contrôle de l'activité protéolytique de l'hôte (au cours des processus inflammatoires) ou des microorganismes (Amerogen et al. 2002).

II.3.1.8 Les défensines

Les défensines sont des peptides antimicrobiens cationiques, allant de 3,5 à 4,5kDa, qui sont stabilisés par trois ponts disulfures intramoléculaires. Il existe deux familles de défensines humaines, l' α et β -défensines. Les β - défensines constituent une barrière de protection pour la surface des muqueuses, comme la langue, la muqueuse nasale, les voies respiratoires intra pulmonaires et l'intestin grêle (Matthews et al. 1999). Ces peptides interviennent également dans la régulation du volume cellulaire et du chimiotactisme. Ils ont aussi une action inhibitrice sur l'activité des cellules natural killer (NK). Ils sont présents dans le plasma, la moelle osseuse, les intestins et la peau. On retrouve dans la salive humaine les défensines de type HNP-1, HNP-2, HNP-3, ainsi que les β -1 et β -2 défensines (Goebel et al. 2000).

II.3.1.9 Les immunoglobulines

Les plus représentées sont les immunoglobulines A (IgAs), dont la concentration salivaire est largement supérieure à la concentration sérique. Leur concentration varie de 20 à 230 μ g/ml pour la salive produite par les glandes parotides et de 41 à 56 μ g/ml pour la salive issue des glandes submandibulaires et sublinguales. La concentration des IgAs dans la salive varie largement entre les individus. Ces dernières représentent une importante ligne de défense contre les bactéries et les virus qui s'introduisent dans l'organisme. La capacité des IgAs à se lier aux antigènes est plus certainement un processus bénéfique. En effet, la médiation locale des IgAs entraînant l'agglutination des micro-organismes oraux empêcherait

leur adhésion aux surfaces et permettrait d'éviter ainsi l'invasion microbienne dans les tissus profonds (Scannapieco et al. 1994).

II.3.2 Les constituants inorganiques

Les constituants inorganiques de la salive sont les ions sodium, potassium, calcium, hydrogène (H⁺), chlorures, phosphates inorganiques, bicarbonates, thiocyanates, des halogènes (iode et fluor) et des métaux (cuivre, fer). Parmi ces constituants, le sodium, les chlorures et les bicarbonates ont une concentration salivaire inférieure à la concentration plasmatique, à l'inverse du potassium, du calcium, des phosphates inorganiques, et des thiocyanates. Les ions H⁺ sont responsables du pH salivaire et sont tamponnés par différentes substances, en particulier les bicarbonates. Son pH varie entre 5,3 et 7,8 chez l'homme en fonction de l'origine de la salive (glandes parotides, glandes sublinguales ou glandes submandibulaires).

II.4 Rôles de la salive

La salive a de multiples fonctions : mécanique, d'humidification et de lubrification, protectrice, digestive, trophique pour les dents et une fonction d'élimination et de détoxification.

II.4.1 Protection et lubrification des muqueuses

Les mucines de la salive et les PRPs glycosylées jouent un rôle majeur dans la lubrification des tissus buccaux. Cette lubrification diminue les traumatismes provoqués par la mastication, la déglutition et la phonation sur les tissus mous. Elle limite aussi la déshydratation buccale induite par la respiration. Le caractère viscoélastique de la salive aide à maintenir un film continu et intact sur les tissus mous et durs. Quand le flux salivaire est diminué, des zones de muqueuse non protégées apparaissent, deviennent plus sensibles à l'abrasion et s'ulcèrent (Dawes et al. 2008).

II.4.2 Pouvoir tampon

Le pouvoir tampon de la salive augmente avec la stimulation. Il est presque inefficace pendant les périodes de faible débit (le pH salivaire peut descendre alors à un niveau de 5,3).

Ce pouvoir tampon repose sur la présence de bicarbonates, de phosphates, d'urée, d'amphotères et de certaines protéines et enzymes. Les bicarbonates ont un rôle prépondérant dans la neutralisation des acides de par leurs propriétés intrinsèques. Ces bicarbonates, tout comme l'urée, permettent aussi la synthèse d'ammoniac qui, après avoir été métabolisé par le biofilm, a la capacité d'augmenter le pH. Hormis ces bicarbonates, plus de 90 % du pouvoir tampon de la salive est attribué à des peptides de bas poids moléculaire riches en histidine (Mandel et al. 1989).

II.4.3 Maintien de l'intégrité des tissus dentaires

Les tissus dentaires peuvent subir des pertes de substance par des mécanismes variés comme l'abrasion, l'attrition et l'érosion. L'abrasion est due au frottement de corps étrangers contre les dents. La plupart des aliments que nous mangeons ne sont pas abrasifs et ne sont pas une source fréquente de perte d'émail. L'abrasion survient principalement chez des personnes utilisant des dentifrices abrasifs, des brosses à dents inadaptées ou ayant des parafonctions (onychophagie, fumeur de pipe, etc.). Le processus d'attrition, très similaire au précédent, est cette fois dû aux contacts répétés entre dents antagonistes. Il est une caractéristique naturelle du vieillissement. Cependant, une usure excessive peut se produire chez des personnes atteintes de bruxisme. L'érosion est causée par l'action d'acides extrinsèques sur les dents. L'émail est sensible à un environnement dont le pH est inférieur à son pH critique. Pour la salive, le pH critique à l'égard des minéraux dentaires est compris entre 5,5 et 6,5. Il est inversement proportionnel à la concentration salivaire en calcium et en phosphate. Il existe de nombreuses sources possibles d'acides (boissons gazeuses, jus de fruits, vin, exposition professionnelle à des vapeurs acides, médicaments acides comme l'aspirine, etc.), y compris lors de maladies (reflux gastro-œsophagien, boulimie, anorexie, etc.).

L'effet protecteur de la salive repose sur son action lubrifiante par formation de la pellicule exogène acquise sur émail. La salive inhibe les phénomènes de déminéralisation grâce à son pouvoir tampon, qui contrôle la neutralité du pH salivaire (Dawes et al. 2008). Elle renforce la charge minérale de surface par sursaturation locale d'éléments tels que le calcium, les phosphates et le fluor, permettant les phénomènes de maturation et de reminéralisation des cristaux d'hydroxyapatite de l'émail après attaque acide.

II.4.4 Propriétés antimicrobiennes

Une quatrième fonction de la salive est son activité antimicrobienne. Les glandes salivaires sécrètent un fluide contenant des agents immunologiques et non immunologiques, impliqués dans la protection des dents et des muqueuses. Le contenu immunologique de la salive repose sur la présence d'IgA, d'IgG et d'IgM. Le contenu non immunologique est représenté par des enzymes (lysozyme, lactoperoxydases, etc.), des protéines (mucines, cystatines, histatines, défensines, etc.) et des peptides antimicrobiens. Le mécanisme antimicrobien se résume souvent en une interaction entre les molécules de surface des éléments pathogènes et les cellules immunitaires afin de faciliter leur reconnaissance, puis leur élimination. Leur action est souvent complémentaire par agrégation des germes (bactériens, viraux, fongiques) par les mucines et les IgAs, mise en contact avec les éléments de défense et, enfin, élimination par la déglutition. Ces molécules jouent également un rôle dans la médiation anti-inflammatoire.

Le flux salivaire assure aussi un nettoyage mécanique des surfaces muqueuses et dentaires, éliminant en partie la flore polymicrobienne. Ce phénomène est amplifié par le mouvement de la langue et des lèvres (Dawes et al. 2008).

II.4.5 Gustation, déglutition et digestion

La salive facilite la formation du bol alimentaire, ainsi que la déglutition, grâce aux substances mucilagineuses qu'elle contient. Les enzymes, telles l' α -amylase et la lipase, participent aux premières étapes de la digestion des sucres et des graisses. La salive joue également un rôle dans la gustation. Les aliments contiennent des substances gustatives

diverses telles que des minéraux, des ions, des polysaccharides et des acides aminés. Certaines d'entre elles interagissent chimiquement avec la salive avant leur fixation aux sites récepteurs du goût. Les bicarbonates salivaires sont les meilleurs tampons vis-à-vis d'une baisse de pH. Cette capacité fait ainsi baisser l'intensité du goût aigre de certains aliments dont le récepteur spécifique est sensible aux ions H⁺ (Mese et al. 2007).

Les peptides antimicrobiens

III.1 Structure des peptides antimicrobiens (PAMs)

Les peptides sont, par convention, des protéines de petite taille : ils font moins de 100 acides aminés (AA) ; la plupart des peptides antimicrobiens ont moins de 50 AA. Chaque AA est représenté par une lettre (**Tableau IV**).

Nom complet de l'acide aminé	Code à une lettre
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 IV : Nomenclature des acides aminés

La nature des acides aminés constituant la chaîne peptidique est importante pour déterminer le caractère anionique ou cationique du peptide ainsi que pour son activité.

La structure primaire est la séquence en AA. Par convention, elle se définit de l'extrémité amine N-terminale à l'extrémité carboxyl C-terminale. A partir de cette séquence,

les AAs peuvent interagir entre eux et former des repliements, correspondant à des structures secondaires plus complexes.

La structure secondaire peut se décrire sous deux formes :

- *l'hélice α* constituée d'une chaîne principale enroulée permettant des liaisons hydrogène entre les AAs (Pauling et al. 1951). Le caractère amphiphile des peptides vient du fait que les résidus hydrophobes s'assemblent sur une face et les résidus hydrophiles sur l'autre face de l'hélice. L'hélice α est très polarisée du fait que toutes les liaisons hydrogènes sont parallèles (Zasloff et al. 1987).

- *Le feuillet β* est une structure où la chaîne des résidus est repliée sur elle-même de façon parallèle ou antiparallèle et est stabilisée par des liaisons hydrogènes maintenant la structure. En raison des polarités les assemblages antiparallèles sont plus stables.

- *La structure en coude* peut s'apparenter à une structure secondaire particulière. Il s'agit en fait d'un repliement particulier du squelette carboné. Le plus souvent, le coude relie deux structures secondaires (hélices ou brins) (Bränden et al. 1996).

La structure secondaire des PAMs est considérée comme un point important dans la compréhension du mode de fonctionnement de ces derniers (Gottler et al. 2009).

La structure tertiaire correspond au repliement de la chaîne protéique. Ces repliements sont liés à l'existence de résidus encombrants ou chargés. Cette structure est stabilisée par :

- des liaisons hydrogènes entre les acides aminés (exemple : serine ---lysine)
- des liaisons ioniques (exemple : glycine ---lysine)
- des liaisons hydrophobes (ou Van der Waals) entre les résidus apolaires
- des ponts disulfures entre les résidus de cystéine.

La fonction biologique d'un peptide est intimement liée à sa structure tridimensionnelle : si la structure est cassée (par l'emploi d'un agent dénaturant par exemple), le peptide perd sa fonction, il est dénaturé.

Certains peptides présentent des structures mixtes en hélice α et feuillet β , d'autres sont des peptides riches en certains AA, 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.

A l'heure actuelle, près de 2000 peptides antimicrobiens d'origines différentes ont été identifiés : Antimicrobial Peptide Database : <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>

Il s'agit d'un vaste ensemble de peptides comportant en moyenne de 20 à 50 AAs, principalement de type lévogyre, qui présentent un caractère cationique et des propriétés amphiphiles.

III.2 Classification des PAMs

III.2.1 Les peptides cationiques

Leur diversité structurale est grande, à l'origine de trois grandes familles de peptides antimicrobiens cationiques :

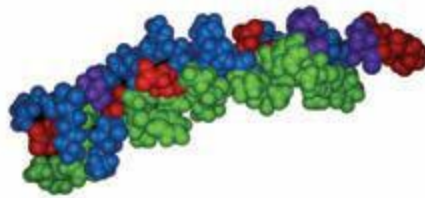
- les peptides linéaires formant des hélices
- les peptides riches en cystéine avec un ou plusieurs ponts disulfure
- les peptides contenant un pourcentage élevé d'un type d'acide aminé

III.2.1.1 Les peptides linéaires formant des hélices α

Chez les mammifères, on retrouve les PAMs dans les cellules phagocytaires, sur la peau et au niveau des muqueuses. Une seule famille de peptides linéaires en hélice α est décrite chez les mammifères, il s'agit des Cathélicidines. La plus connue et plus étudiée est la cathélicidine humaine LL-37 (De Smet et al. 2005; Hancock et al. 2006; Lai et al. 2009).

On la retrouve dans les granules des neutrophiles, les mastocytes et les monocytes, mais également dans les kératinocytes (Guani-Guerra et al. 2010). Elle est présente également dans la bouche, la langue, l'œsophage, le liquide broncho-alvéolaire lorsqu'il y a une inflammation, mais aussi au niveau du tractus génito-urinaire ou dans le liquide séminal.

Chez l'Homme, le seul gène codant une cathélicidine est localisé sur le chromosome 3p21, nommé CAMP. Ce gène code une protéine précurseur inactive, appelé *human cationic antimicrobial peptide18* (hCAP18), dont la longueur totale est de 170 AAs. La protéine hCAP18 est stockée essentiellement dans les granules des neutrophiles mais est aussi produite dans d'autres granules, dans les cellules NK et les mastocytes. L'expression de hCAP18 est détectée pour la première fois dans les cellules de la moelle épinière, ainsi que dans les kératinocytes au niveau des sites inflammatoires. L'extrémité C-terminale de hCAP18 est formée d'un domaine hautement cationique, contenant le peptide qui porte l'activité antibactérienne. Un processus de clivage est essentiel pour l'activation de cette activité antibactérienne *in vivo*, et est réalisé par des sérine-protéases au niveau des kératinocytes. Il s'agit des kallikréines, ou de la protéase 3 (**Figure 3**) (Guani Guerra et al. 2010).



LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES

Figure 3 : Séquence de la Cathélicidine LL-37 (Hancock et al. 2006)

Le LL-37, une fois mature, est donc libéré de la partie C-terminale de hCAP18. Il a une action rapide, puissante et un large spectre d'activité antibactérien (Zanetti et al. 2004). Il est particulièrement actif sur *Shigella spp*, *S. aureus*, *E. coli* ou encore *S. pyogenes* et *S. agalactiae* (Guani-Guerra et al. 2010).

III.2.1.2 Les peptides linéaires riches en certains acides aminés

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

Chez les mammifères, on peut citer l'histatine, PAM riche en histidine, retrouvée dans la salive des primates dont l'Homme (Lehrer et al. 1999; De Smet et al. 2005) (**Figure 4**), l'Indolicidine riche en tryptophane, découverte dans les neutrophiles des bovins (Van Abel et al. 1995) et la PR-39, peptide dérivé des cathélicidines, isolé chez le porc, contenant respectivement 49% et 24% de proline et d'arginine (Brogden et al. 2005).

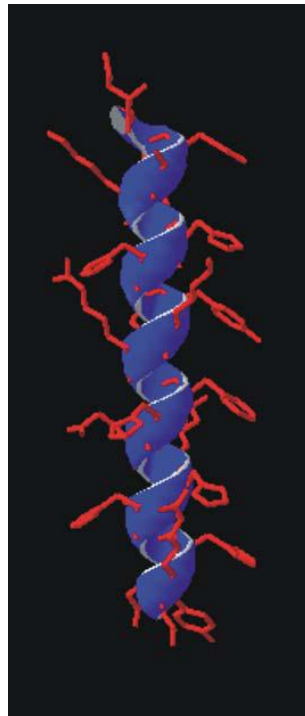


Figure 4 : Modèle 3D de la structure secondaire de l'Histatine 5 (De Smet et al. 2005)

III.2.1.3 Les peptides riches en cystéine

Ces peptides dits cycliques sont stabilisés par un ou plusieurs ponts disulfures intramoléculaires formés grâce à la présence de cystéine (Brogden et al. 2005; Andres et al. 2007). C'est un groupe très diversifié et le nombre de ponts disulfures conditionne leur structure et leur activité : ces ponts disulfure peuvent être situés entre des feuillets β (ex. des α défensines), ou entre des structures mixtes α et β .

➤ Peptides à un pont disulfure

Chez les mammifères, on retrouve la Bacténécine, un dodcapeptide cyclique isolé dans les neutrophiles de bovins (Romeo et al. 1988), mais également la vasostatine-1, peptide naturel dérivé de la chromogranine A (CGA) qui conserve son pont disulfure en C17-C38 (Lugardon et al. 2000).

➤ Peptides à deux ponts disulfure

Chez les mammifères, les seuls représentants sont les Protégrines, constituées de 16 à 18 résidus, et isolées dans les leucocytes porcins (Bulet et al. 2004). Notons que les Protégrines ont 17% d'homologie avec la Gomesine et 25% avec l'Androctocine, ce qui peut faire penser à l'existence d'un gène ancestral codant ces peptides.

➤ Peptides à quatre ponts disulfure

Une seule famille prenant une conformation en épingle à cheveux avec quatre ponts disulfure a été mise en évidence à ce jour chez les vertébrés : il s'agit des Hepsidines.

➤ Peptides à 3 ou 4 ponts disulfure : les défensines

Chez les vertébrés, on compte actuellement plus de 100 défensines, principalement chez les mammifères et les oiseaux (Diamond et al. 2009). Il existe trois sous-familles, selon leur gène précurseur :

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

Les deux premières sous-familles auraient un gène ancestral commun (Diamond et al. 2009). La structure de ces peptides est composée de trois feuillets β , incluant une boucle en épingle à cheveu et contenant trois ponts disulfures. C'est l'emplacement différent des ponts qui conditionne la sous-classification.

Les défensines sont des peptides cationiques de poids moléculaire compris entre 3 et 5kDa contenant 6 résidus de cystéine en position invariante qui forment trois ponts disulfures

intramoléculaires. Ces peptides sont composés de trois feuillets β , incluant une boucle en épingle à cheveux (**Figure 5**).

Chez l'homme on ne retrouve que les défensines α et β , le gène codant pour ces défensines est retrouvé sur le chromosome 8, locus p23 (Guani Guerra et al. 2010).

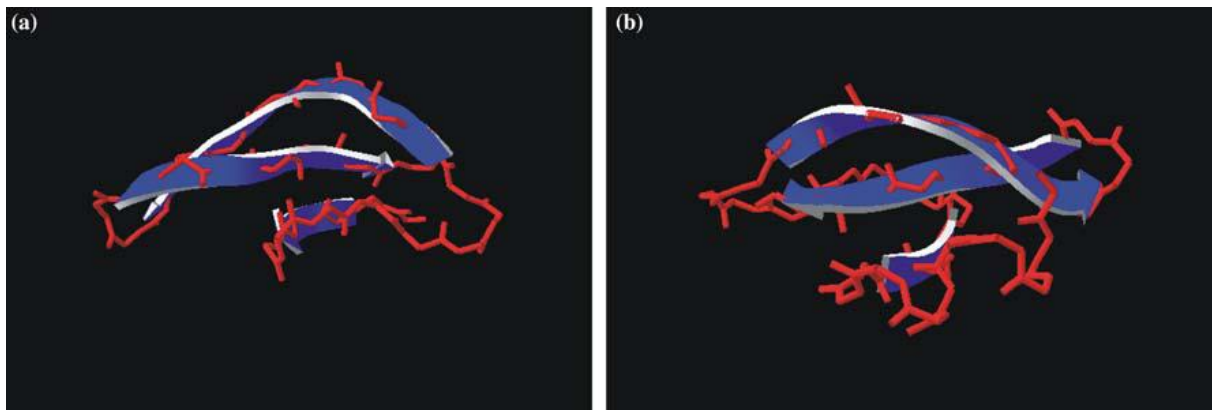


Figure 5 : Structures tri-dimensionnelles d'une α -défensine humaine HNP-3 (a) et d'une β -défensine humaine hBD-1(b) (De Smet et al. 2005)

Les α défensines

Les α -défensines sont largement présentes chez l'Homme, le singe, les rongeurs. Ce sont de petites molécules comportant 29 à 35 AAs. On les retrouve dans les granules azurophiles des neutrophiles, dans les cellules intestinales de Paneth, mais également dans les macrophages (Diamond et al. 2009).

Ce groupe est caractérisé par la présence de ponts disulfure entre les résidus 1 et 6, 2 et 4, et 3 et 5. Chez l'Homme, six α -défensines ont été mises en évidence. Quatre de ces peptides se nomment peptides neutrophiles humains (HNPs) car ils ont été découverts dans les neutrophiles : HNP-1, -2, -3, -4 (Guani Guerra et al. 2010 ; White et al. 1995).

Ces PAMs se trouvent dans les granules azurophiles des polynucléaires neutrophiles (Guani-Guerra et al. 2010), mais également dans les lymphocytes B, les cellules NK (Natural Killer) et les monocytes (Selsted et al. 2005)

Les deux autres α -défensines se nomment défensines humaines 5 et 6 (HD-5 et HD-6). Elles sont exprimées en grande concentration dans les cellules de Paneth au niveau de l'intestin grêle, mais aussi dans les cellules épithéliales du tractus génital de la femme (Guani Guerra et al. 2010).

Les β défensines

Ce groupe des β -défensines a une distribution beaucoup plus large dans l'organisme que les α -défensines. Les β -défensines sont constituées de 36 à 42AAs. Les ponts disulfures intramoléculaires se situent au niveau des résidus 1-5, 2-4 et 3-5. Elles sont produites au niveau des tissus épithéliaux de la peau, les tractus respiratoire et génito-urinaire, ainsi que dans les polynucléaires (Diamond et al. 2009).

La première β -défensine humaine HBD-1 a été isolée de l'hémofiltrat des patients dialysés en 1995. Elle a ensuite été retrouvée dans le plasma, au niveau des poumons, de la glande mammaire, de l'appareil reproducteur féminin, de la prostate, des glandes salivaires ou encore du pancréas et de la langue (De Smet et al. 2005). HBD-2 a été isolée pour la première fois en 1997 au niveau des callosités des malades atteints de psoriasis, puis dans les leucocytes et dans la moelle épinière, au niveau du prépuce, des poumons, de la trachée, de la muqueuse vaginale et de l'utérus. HBD-1 est exprimée de façon constitutive dans les épithéliums, tandis que HBD-2 doit subir une activation, notamment lors d'inflammation.

La β -défensine HBD-3, découverte en 2000, est un peptide de 5kDa, hautement basique, découvert également dans les extraits de lésions psoriasiques. L'ARNmessenger de ce peptide est exprimé dans les épithéliums de nombreux organes. Ainsi, cette défensine est retrouvée en concentration élevée dans la salive et les fluides cervico-vaginaux, mais aussi la peau, les amygdales, les cellules épithéliales des voies respiratoires, le cœur, l'appareil reproducteur féminin, les muscles squelettiques, le placenta, ou encore l'œsophage (De Smet et al 2005 ; Selsted et al. 2005).

La troisième sous-famille de défensines, les θ -défensines, se trouve seulement chez les mammifères, plus précisément chez le singe (Rhésus macaque), et diffère des deux autres par sa structure (Selsted et al. 2005). En effet, les θ -défensines sont totalement cycliques.

III.2.2 Les peptides anioniques

Dans de nombreux organismes, en plus des peptides cationiques, les peptides anioniques qui sont souvent riches en acide glutamique ou en acide aspartique peuvent présenter des propriétés antimicrobiennes. Ces peptides anioniques découverts en 1992 dans le liquide broncho-alvéolaire des bovins requièrent la présence de zinc pour que leur activité soit

maximale (Brogden et al. 2003). Certains peptides antimicrobiens dérivés des neuropeptides sont anioniques et ont été isolés par notre groupe dans des exsudats infectieux des bovins et de l'Homme : le Peptide B et l'Enkélytine.

III.2.3 Les PAMs dérivés des protéines : cas particulier de la chromogranine

La chromogranine est une protéine de la famille des granines issus des granules de sécrétion des cellules chromaffines. Les cellules chromaffines sont les cellules de la partie centrale de la glande surrénale : la médullosurrénale. Elles secrètent les catécholamines, des enzymes protéolytiques, de la morphine ou encore d'autres protéines (chromogranine A, B, C, proenképhaline-A) (Metz boutique et al. 1998). Les granules de sécrétion permettent la libération de ces composés après stimulation par exocytose (fusion complète des granules avec la membrane plasmique) des cellules sous l'effet d'un stress par les voies nerveuses et endocrines.

C'est en 1965 que Banks découvre la CGA, premier membre de cette famille de protéines, qui est libérée en même temps que la catécholamine lors de l'exocytose (Banks et Helle 1965).

Les chromogranines (CGs) 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 neuroendocrines du tractus intestinal et pulmonaire (Montero Hadjadjé et al. 2008). Les chromogranines ont été retrouvés dans de nombreuses espèces : Humain, Bovin, Rat, Souris, Poisson, Batracien. Bien que ce soit la chromogranine B (CGB) qui est majoritaire chez l'Homme, c'est la CGA qui est la plus étudiée car plus accessible en quantité importante chez les bovins.

La CGA est une protéine acide composée de 439 résidus (457 avec la séquence signal) chez l'Homme, le gène responsable est localisé sur le chromosome 14. La masse moléculaire apparente de la CGA est de 49kDa (www.uniprot.org/uniprot/P10645)

Les CGs possèdent des sites potentiels de clivage protéolytique dibasique et tribasique qui permettent l'obtention de nombreux peptides dérivés (Metz Boutique et al. 1993).

Principaux peptides dérivés de la CGA :

- La catestatine (CAT) est décrite pour la première fois par Mahata en 1997 (Mahata et al. 1997). C'est un peptide naturel, inhibiteur non compétitif de la nicotine, obtenue par clivage protéolytique de la CGA qu'on retrouve dans les granules de sécrétions des cellules chromaffines. De plus, elle est présente dans les granules de sécrétions des neutrophiles (PMNs) (Zhang et al. 2009). Elle exerce un rétrocontrôle sur la libération des cathécolamines par les cellules chromaffines de la médullosurrénale. Elle présente un effet vasodilatateur et intervient dans la régulation de l'activité cardiovasculaire (Helle et al. 2010).

Son rôle antimicrobien a été montré par le groupe du Dr Metz-Boutigue sur des bactéries, des champignons et des levures (Briolat et al. 2005)

- La chromofungine (CHR) a la séquence la plus conservée de la CGA tout au long de l'évolution. Il s'agit du peptide actif de la Vasostatine I, fragment naturel de la CGA. Elle est présente dans les granules de sécrétion des cellules chromaffines ainsi que dans les granules de sécrétions des PMNs. Elle possède des propriétés antifongiques et des propriétés antibactériennes (Lugardon et al. 2001). Elle adopte une structure hélicoïdale et pénètre dans les monocouches lipidiques. Elle provoque l'influx de calcium dans les PMNs (Zhang et al. 2009). La chromofungine induit la sécrétion des cellules BOM des tumeurs neuroendocrines (METs) (Thèse de Menonve Atindehou 2013).

III.3 Mode d'action des peptides antimicrobiens

In vitro, la plupart des PAMs sont actifs contre différents types d'organismes, comme les bactéries à Gram positif et négatif, les protozoaires, les champignons filamenteux mais aussi certains virus enveloppés (Lai et al. 2009).

La plupart des PAMs cationiques ont une action directe sur la membrane des bactéries, mais certains agissent au niveau intra-cytoplasmique. Le mode d'action des PAMs est surtout connu pour les peptides en hélice α , notamment les magainines et les cécropines, qui ont été beaucoup étudiés (Lai et al. 2009).

Le mode d'action de la plupart des PAMs cationiques dépend de l'interaction entre le peptide et la membrane bactérienne pour aboutir à la déstabilisation de la membrane. Une question subsiste comment les PAMs peuvent-ils être actifs *in-vivo* et ne pas être toxiques pour les cellules de défenses de l'hôte. Plusieurs hypothèses ont été citées, la plus répandue est le fait que les PAMs cationiques produits par l'homme n'agissent pas sur les cellules eucaryotes car les membranes de celles-ci contiennent du cholestérol. A l'inverse de la membrane des cellules eucaryotes, la membrane des cellules microbiennes ne contient pas de cholestérol. (Lai et al. 2009), mais d'autres acides gras qui favorisent l'insertion du peptide dans la membrane microbienne. C'est par exemple le cas de l'ergostérol, spécifique des champignons (Lugardon et al. 2000).

Les peptides cationiques à hélice α possèdent différents modes d'action en fonction de leurs cibles cellulaires et de leurs activités. Ils peuvent se résumer en deux groupes : les mécanismes d'action membranaire (activité directe) et les mécanismes d'action intracellulaire (pour les autres activités)

III.3.1 Mécanisme d'action membranaire

Diamond et ses collègues différencient trois étapes dans les mécanismes d'action des PAMs : l'attraction entre le peptide et le pathogène, l'attachement du peptide à la surface du pathogène et la pénétration du peptide à l'intérieur du pathogène (**Figure 6**).

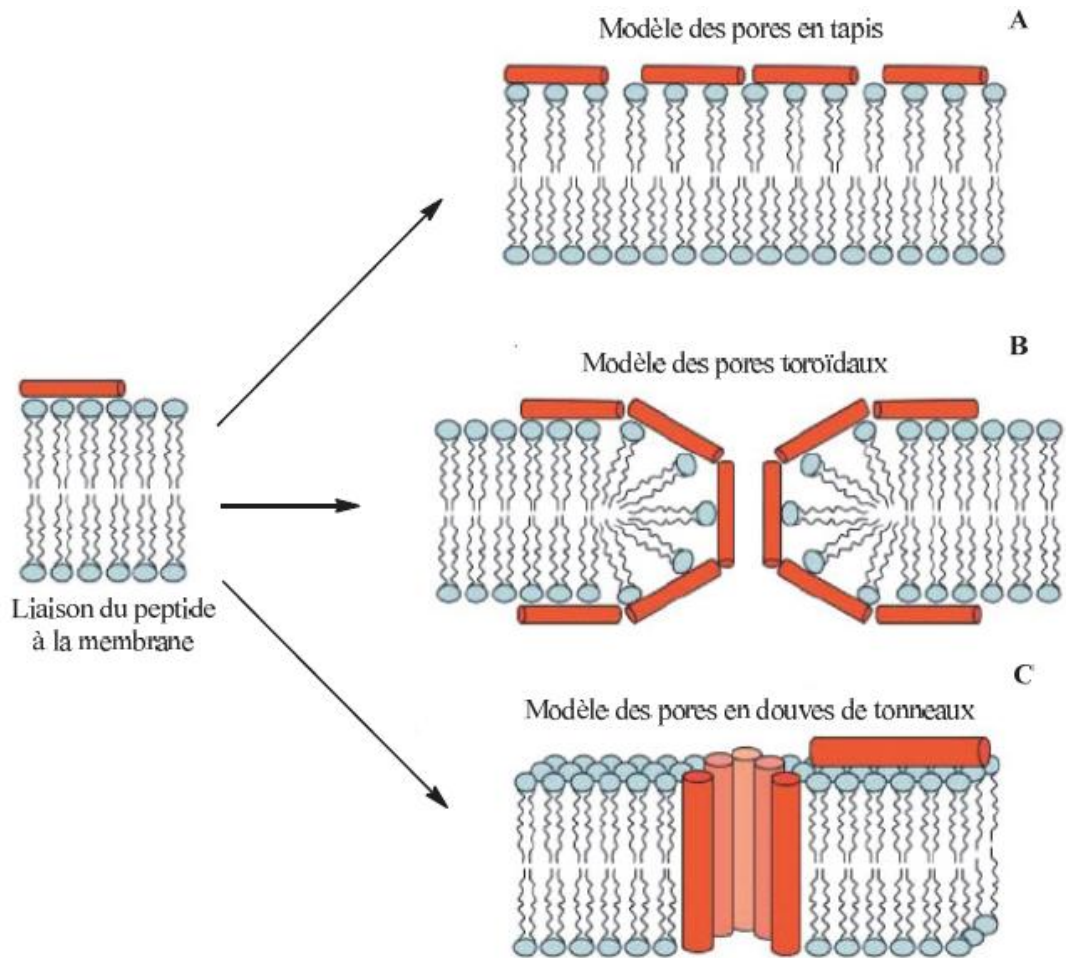


Figure 6 : Modèle d'insertion membranaire des PAMs dans les cellules (Sanderson et al. 2005)

Pour tous les peptides antimicrobiens, la première étape du mécanisme d'action est *l'attraction* entre le peptide et le microorganisme. Ce comportement est finalement régi par la charge et le caractère amphiphile du peptide. Cette étape est supposée se produire par des interactions électrostatiques entre le peptide cationique et des groupements chargés négativement sur la membrane bactérienne, il s'agit du LPS dans le cas de bactéries Gram- et les membranes externes des acides téchoïques dans le cas de membranes à Gram+.

C'est à ce moment qu'on parle d'*attachement* du peptide à la surface du pathogène et cette étape entraîne une déstabilisation de la membrane externe du pathogène.

Un facteur important pour la pénétration du peptide est son caractère amphipatique permettant son *insertion* dans la membrane du microorganisme puis la pénétration dans la cellule pour interagir avec les cibles cytoplasmiques.

La présence de résidus basiques tels que Lysine ou Arginine joue également un rôle clé dans l'insertion du peptide dans la membrane *via* les interactions électrostatiques des chaînes latérales du résidu basique avec le groupement phosphate des phospholipides de la membrane cytoplasmique.

On distingue trois modèles d'insertion différents (**Figure 7**) :

III.3.1.1 Modèle en tapis ou « carpet-like »

Les peptides s'accumulent sur la membrane et forment un tapis qui va écarter les têtes hydrophiles des phospholipides et provoquer des perturbations entraînant la rupture de la membrane cytoplasmique (**Figure 7a**) (Jenssen et al. 2006).

III.3.1.2 Modèle en douve de tonneau ou « barrel stave »

Dans ce modèle, un nombre variable de canaux sont formés par les peptides qui se positionnent encercle formant un pore aqueux (Yeaman et al. 2003). Les peptides s'insèrent ainsi dans la bicouche, les « lattes » du tonneau étant constituées de peptides en hélice α (Yang et al. 2001; Yeaman et al. 2003).

En premier lieu, les monomères en hélice α doivent s'associer à la surface membranaire. Une fois attachés, ces peptides vont subir des changements de conformation, les résidus hydrophobes des hélices vont être en contact avec la partie hydrophobe de la membrane, les résidus hydrophiles des peptides constituant la lumière du pore (Yang et al. 2001; Yeaman et al. 2003).

Un recrutement progressif de peptides au niveau de la membrane permet d'agrandir la taille des pores. La translocation des phospholipides et l'agrandissement des pores entraînent le transport des peptides à l'intérieur de la membrane cytoplasmique par le biais du gradient de concentration induit par les peptides liés à la surface (**Figure 7b**).

III.3.1.3 Modèle des pores toroïdaux

Le troisième modèle combine les actions des deux autres avec une agrégation à la surface de la membrane. Pour ce modèle, les peptides vont s'insérer perpendiculairement et entrainer le pliage de la monocouche. Au cours de cette action, les faces polaires des peptides interagissent avec les groupements des têtes polaires des lipides entrainant la formation d'un pli continu qui relie les deux feuilletts de la membrane. Ce mécanisme crée des pores toroïdaux dans la membrane, causant la formation de micelles par les lipides et une rupture de la membrane. (Diamond et al. 2009) qui induit la fuite du contenu cytoplasmique par le pore ainsi formé et la mort de la bactérie (**Figure 7c**).

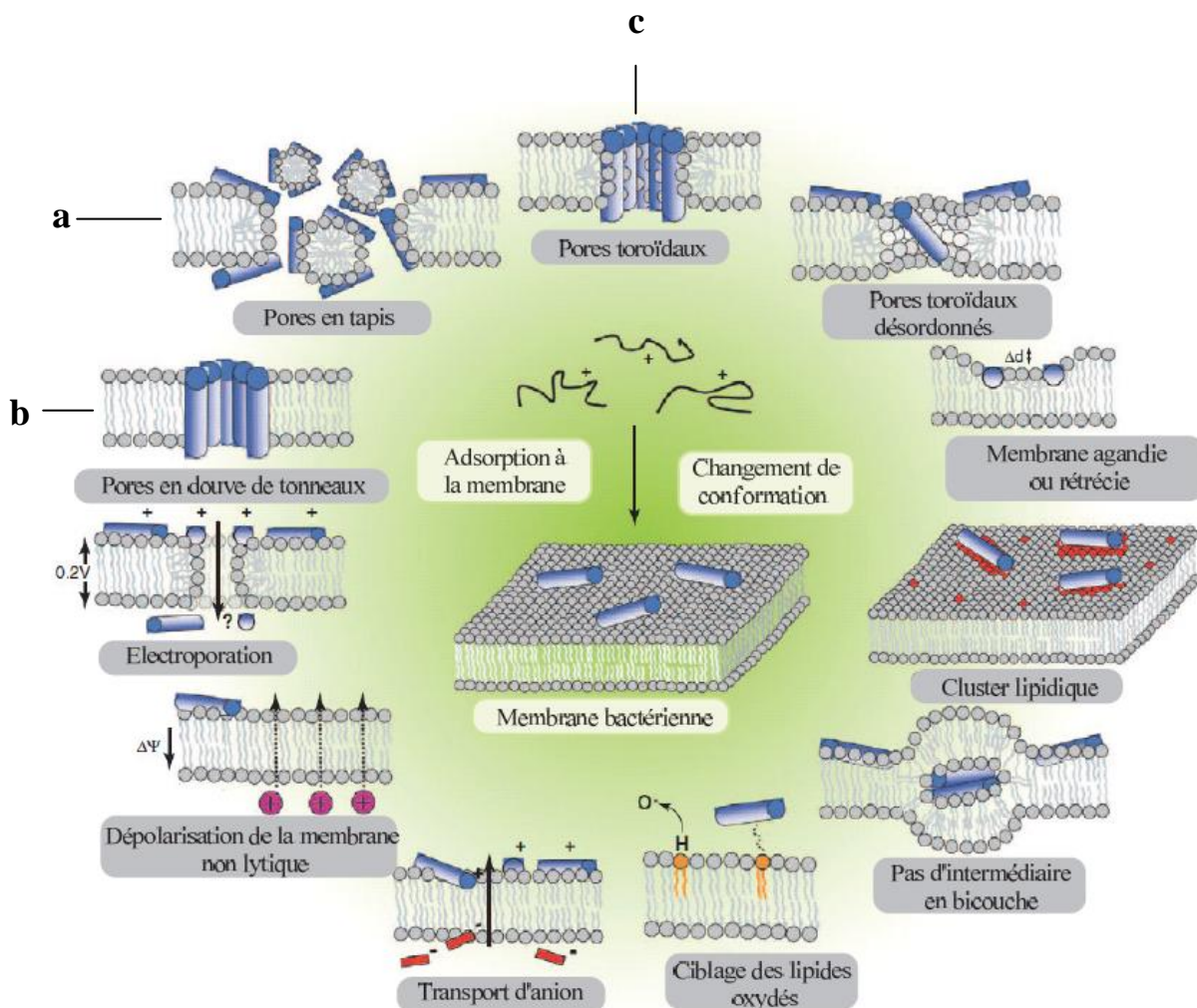


Figure 7 : Autres modèles d'insertion membranaire (Nguyen et al. 2011)

III.3.2 Mécanismes d'action intracellulaire

En plus des peptides transloqués par désintégration des membranes, les PAMs peuvent aussi pénétrer dans les membranes par différents modèles d'insertion (**Figure 7**) et se retrouver dans le cytoplasme. A l'intérieur du cytoplasme, 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 (Brodgen et al. 2003 ; Brodgen et al. 2005 ; Jenssen et al. 2006).

IV.1 Matériels

IV.1.1 Prise de contact avec les futures mamans

Mon étude porte sur l'analyse et la caractérisation des peptides antimicrobiens de la salive chez des nourrissons nourris exclusivement par du lait maternisé de la naissance jusqu'à 6 mois.

C'est grâce à l'étroite collaboration avec le Centre Obstétrical de Schiltigheim que nous avons réussi à toucher un grand nombre de futures mamans. En effet, les sages-femmes de la surveillance de grossesse parlaient de notre projet aux mamans à l'aide d'une lettre d'information rédigée par mes soins et s'adressant aux mamans pour leur expliquer le principe de cette étude. Lorsque les futures mamans étaient intéressées, elles signaient alors un consentement éclairé permettant la réalisation des prélèvements salivaires des nourrissons.

J'ai alors obtenu l'accord de 7 mamans pour mon étude. Il s'agit d'un accouchement par voie basse pour les 7 mamans. Les sages-femmes réalisaient le premier prélèvement de salive à la naissance et le conservaient à 4°C, jusqu'à ce que je le récupère dans les deux jours qui suivaient. Les prélèvements ultérieurs ont été réalisés par nos soins directement chez les mamans (**Tableau V**).

	Bastien	Tom	Gaspard	Alicia	Sacha	Elsa	Juliette
Jo	G	G	G	G			M
15j	G	G	G	G		DM	M
1mois	G	G	G	G	Gz	DM	M
3mois	G	G	N	G	Gz	BN	M
6mois	G	G	N	G	GZ	BN	M

Tableau V : Les différents prélèvements de salive analysés

Type de lait maternisés utilisés : G : Gallia ; N : Novalak ; Gz : Guigoz ; DM : lait provenant du DM ; BN : Beba Nestlé ; M : Milumel

IV.1.2 Collecte de la salive

Les prélèvements salivaires sont réalisés à l'aide d'une micropipette de 1mL aux temps suivants : J0 (dès la naissance du bébé sans premier contact avec le sein ou le biberon), J15, 1 mois, 3 mois et 6 mois. Lorsque la salive est prélevée dans la pipette, elle est ensuite transférée dans un tube Eppendorf de 1,5mL puis aliquotée en plusieurs tubes de 50µL qui seront ensuite conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation future.

La salive pure récoltée à différents temps servira pour les différents protocoles décrits dans ce document.

IV.1.3 Protéines solubles des granules chromaffines

Ce mélange de protéines est utilisé comme contrôle positif de l'immunodétection des chromogranines dans la salive.

IV.2 Méthodes

IV.2.1 Purification des peptides par HPLC de phase inverse

Cette technique permet d'isoler les différents constituants de la salive analysée et d'identifier les PAMs présents.

L'High Performance Liquid Chromatography (HPLC) de phase inverse est une technique permettant de séparer les constituants d'un mélange en fonction de leur hydrophobicité et de leur taille. L'HPLC utilise la pression produite par les pompes pour pousser la phase mobile à travers la phase stationnaire de la colonne (**Figure 8**). Une phase stationnaire est dite « normale » quand elle est polaire et hydrophile et on parle de phase « inverse » quand elle est apolaire et hydrophobe. Dans des conditions chromatographiques données, le « temps de rétention » caractérise qualitativement une substance. L'amplitude de ces pics, ou encore l'aire limitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté. Dans le cas d'une phase inverse, 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 retenu par le support.

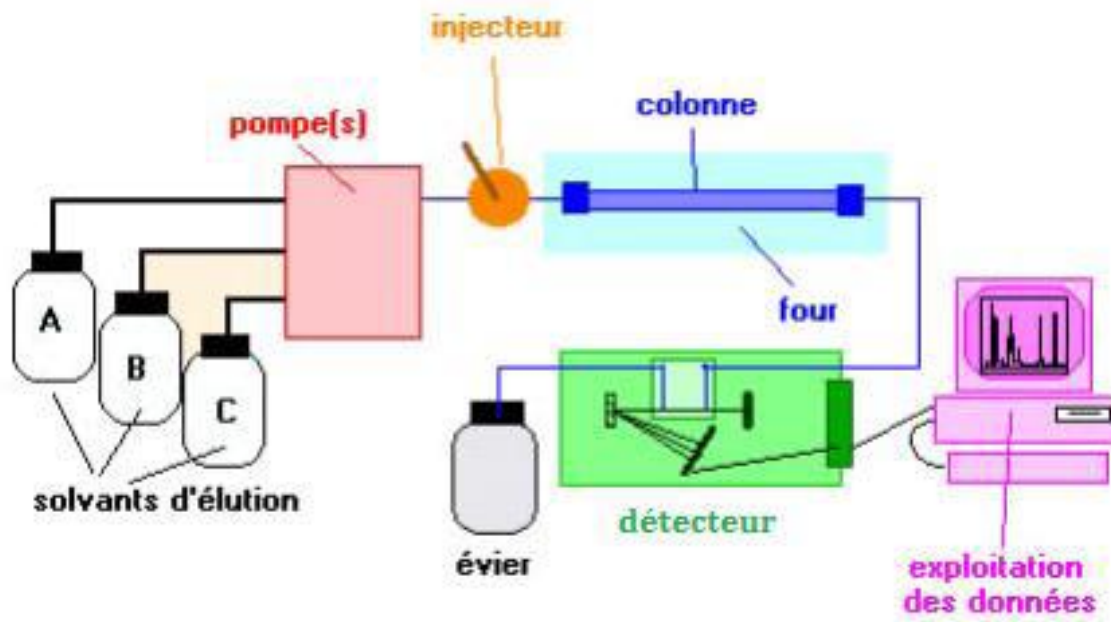


Figure 8: Principe de fonctionnement de l'HPLC

La pompe permet de travailler en mode isocratique (100% d'un même éluant tout au long de l'analyse) ou en mode gradient c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange.

Le système de boucle d'injection permet d'avoir un volume constant injecté, ce qui est important pour l'analyse quantitative.

La colonne permet la séparation des composants du mélange en fonction de leur hydrophobicité

Le détecteur UV-visible mesure l'absorption de la lumière (λ 214nm) par le matériel élué à la sortie de la colonne.

La phase stationnaire utilisée dans le laboratoire est un support de silice greffé par des chaînes aliphatiques de 18 atomes de carbone (phase inverse). Elle est utilisée pour la séparation des peptides ($PM < 10000Da$). La phase mobile est constituée de deux solvants : un solvant A polaire (0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) et 99,9% d'eau) et un solvant B hydrophobe (70% d'acétonitrile, 29,1% d'eau et 0,09% de TFA). Dans les deux solvants on retrouve un contre-ion (CF_3-COO^-) qui est hydrophile et qui permet de fragiliser la liaison entre les molécules à séparer et les chaînes carbonées de la phase stationnaire. Un traitement de « End-capping » (remplacement dans la phase stationnaire des groupes silanol accessibles par des groupes triméthylsilyle de la résine facilite la désorption des molécules et l'obtention d'une meilleure résolution.

Les peptides présents dans la salive sont purifiés à l'aide d'une HPLC Dionex, Ultimate 3000 (**Figure 9**). La colonne utilisée est une Vydac 218TP de longueur 25 cm et de diamètre 1 cm, dont la taille des particules est comprise entre 3.5 et 10 μm et la taille des pores est de 300Å. La boucle d'injection a un volume de 250 μL .

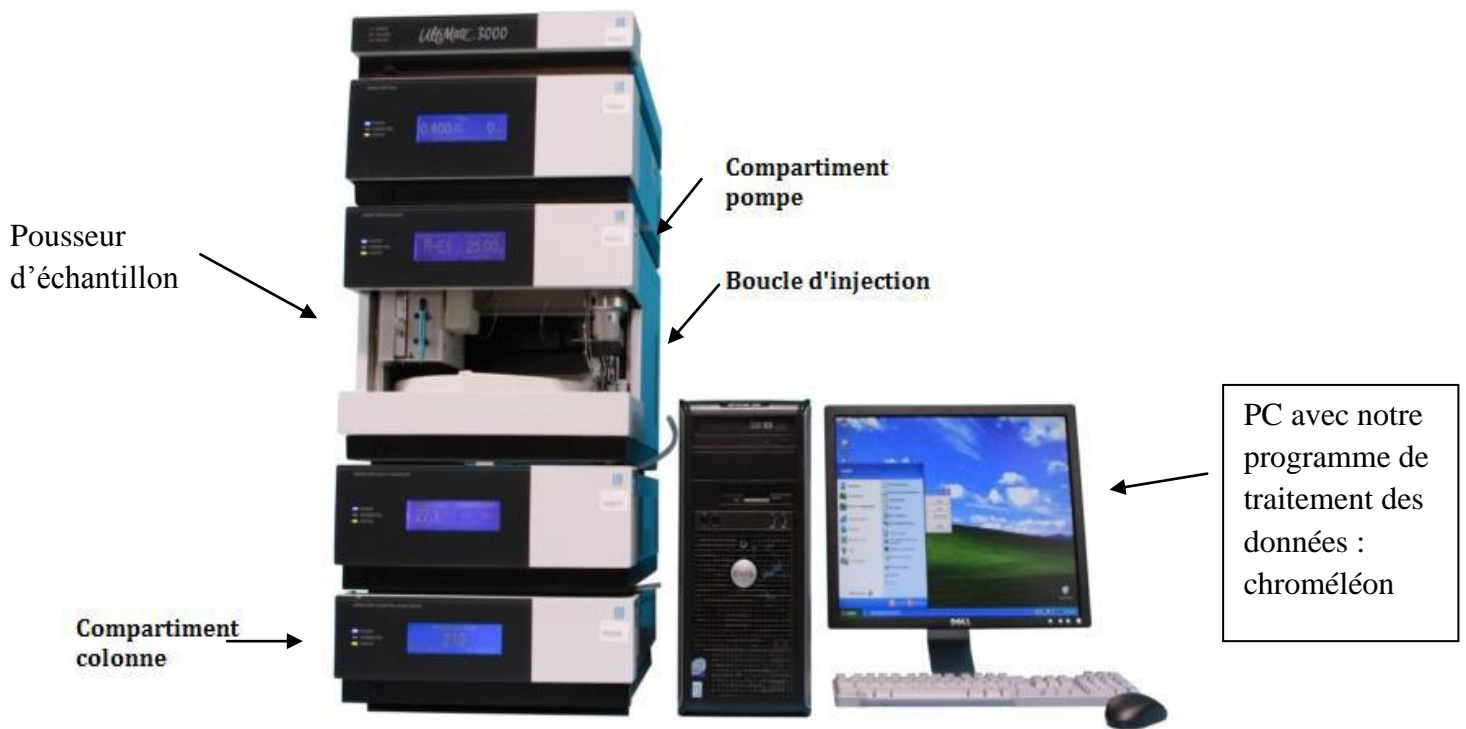


Figure 9 : HPLC DionexUltimate 3

Nous travaillons à une température dans la colonne de 40°C et à un débit de 0,2mL/min. Nous déposons sur la colonne une quantité de salive de 50µL. La méthode de détection de l'HPLC s'effectue à une longueur d'onde de 214nm, spécifique du maximum d'absorption de la liaison peptidique. Toutes les fractions détectées à 214nm sont collectées, puis conservées à 4°C pendant quelques jours ou à -20°C pour une période plus longue.

IV.2.2 Tests antimicrobiens

Les tests antimicrobiens sont effectués selon le protocole décrits par Lugardon (Lugardon et al. 2000). On utilise des microplaques 96 puits (Nunc surface, Nuncbrand). Les pics obtenus par HPLC sont au préalable concentrés à la speed vac et rincés 3 fois avec de l'eau milliQ (mQ) pour enlever toute trace de TFA. A la fin des lavages, l'échantillon est concentré jusqu'à 20µL et doit avoir un PH neutre.

Dans chaque puits de la plaque sont déposées 10µL des fractions collectées par HPLC et 90µL de la suspension bactérienne (à une DO600 nm = 0.001). Trois témoins sont réalisés en parallèle : un contrôle (c) correspondant au milieu de culture seul, un témoin négatif (T-) correspondant à la suspension bactérienne et un témoin positif (T+) où la suspension bactérienne a été traitée avec des antibiotiques (Céfotaxime et Tétracycline à 1µg/mL) (**Tableau VI**).

Parmi les souches microbiennes qui seront testées, nous retrouvons *M. luteus* qui est une bactérie Gram positive, sphérique, saprophyte faisant partie de la famille des Micrococcaceae, aérobic obligatoir. *M. luteus* est une bactérie du sol, des poussières, de l'eau et de l'air et fait partie de la flore naturelle de la peau des mammifères. La bactérie peut aussi coloniser la bouche, les muqueuses, de l'oropharynx et des voies respiratoires supérieures humaines. *C. albicans* est une autre souche testée, c'est un organisme vivant à l'état naturel dans les muqueuses de l'être humain. Elle provoque des infections fongiques (candidase ou candidose) essentiellement au niveau des muqueuses digestives, gynécologiques et orales. Après 24h de culture en milieu anaérobic dans un incubateur, sous agitation à 37°C (Tritamax 100, Heidolph, Germany), la croissance microbienne est évaluée par lecture de la turbidimétrie à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Multiscan EX, Shangai, Chine).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													A
B	C	T-	F1	F3	F5	F7	F9	F11	F13	F15	F17		B
C	C	T-	F1	F3	F5	F7	F9	F11	F13	F15	F17		C
D	C	T-	F1	F3	F5	F7	F9	F11	F13	F15	F17		D
E	C	T+	F2	F4	F6	F8	F10	F12	F14	F16	F18		E
F	C	T+	F2	F4	F6	F8	F10	F12	F14	F16	F18		F
G	C	T+	F2	F4	F6	F8	F10	F12	F14	F16	F18		G
H													H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Tableau VI : Exemple de plaque avec les différents témoins : contrôle, T- et T+ et les fractions des peptides à analyser

Chaque fraction (F) est analysée en triplicate pour une meilleure précision.

Le contrôle comprend 90µL de milieu + 10µL H2O

Le T- comprend 90µL de culture bactérienne+ 10µL H2O

Le T+ comprend 90µL de culture bactérienne+ 10µL de T + C (Céfotaxime et tétracycline)

Détermination du pourcentage d'inhibition

On soumet en triplicate la culture microbienne à nos différentes fractions. Après incubation à 37°C, on lit la DO à 600nm ce qui nous permet de déterminer s'il y a eu croissance de la bactérie ou de la levure. A cette longueur d'onde, les particules diffusent la lumière dans toutes les directions de l'espace et ainsi diminuent l'intensité du rayon lumineux traversant la suspension. La mesure de la turbimétrie sera alors proportionnelle à la masse microbienne.

Calcul du pourcentage d'inhibition :

On considère que la DO à 600nm pour les bactéries ou 620nm pour les levures du puits contenant uniquement le microorganisme (le témoin T-) correspond à 0% d'inhibition alors que le puits contenant le microorganisme et l'antibiotique (le témoin T+) correspond à 100% d'inhibition. De là, on peut en déduire notre $\Delta 100\%$ qui est égal à la différence de l'absorbance: (T-) - (T+). De plus, connaissant la DO des fractions analysées (F), on peut en déduire l'absorbance propre à notre échantillon donnée par la différence : (T-) – F.

De ce fait, nous pouvons obtenir notre pourcentage d'inhibition pour chacune de nos fractions **(Figure 10)**

$$\frac{T(-) - F \times 100}{T(-) - T(+)}$$

Exemple :

Fraction 20 de Nagel Juliette 1 mois (SAS20)

$$T(-) - T(+) = 0.32 - (0.009) = 0.311 = 100 \% \text{ d'inhibition}$$
$$T(-) - F = 0.32 - 0.014 = 0.306$$
$$\text{Donc } 0.306 / 0.311 * 100 = 98.3 = 98\% \text{ d'inhibition}$$

Figure 10 : Calcul du pourcentage d'inhibition.

IV.2.3 La spectrométrie de masse

Cette technique permet de détecter et d'identifier des protéines et des peptides d'intérêt par mesure de leur masse moléculaire. Après HPLC, les fractions majoritaires sont collectées, puis concentrées à la speed-vac pour être envoyées au Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique à Strasbourg (LSBMO, UM 7509) puis analysées par le docteur Jean-Marc STRUB. Cette technique permet de détecter et d'identifier des peptides d'intérêt par mesure de leur masse moléculaire. Pour nos échantillons, les analyses de spectrométrie de masse s'effectuent par Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight (MALDI-TOF).

Principe de l'ionisation par MALDI-TOF:

Une matrice (acide hydroxycinnamique) et un échantillon sont déposés sur une cible. Des tirs laser d'une longueur d'onde de 337nm sont pulsés et viennent désorber la matrice qui ionise l'échantillon par transfert de charge. Par des différences de potentiel appliquées sur des lentilles, les molécules sont accélérées puis transférées sur l'analyseur TOF. Ce dernier permet la séparation des molécules ionisées en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z), en effet les molécules les plus chargées et de faible masse ont des vitesses de vol élevées (**Figure 11**).

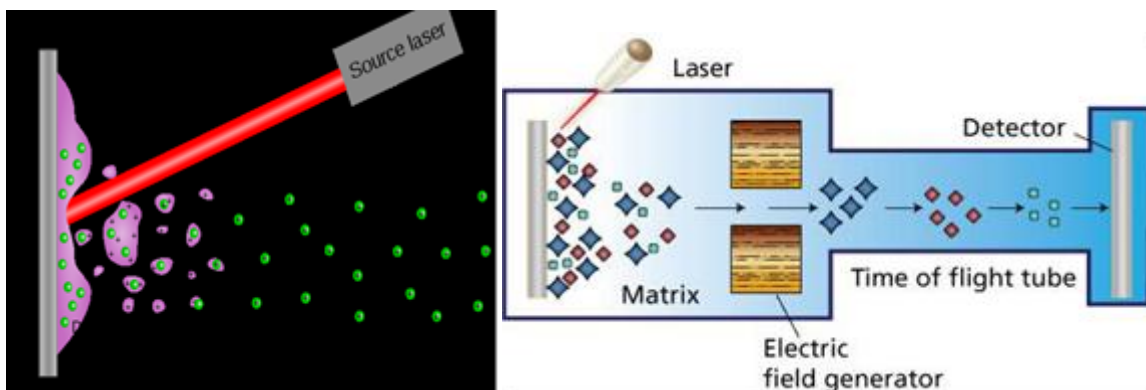


Figure 11 : Principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight) (<http://sigmaaldrich.com>)

IV.2.4 Le séquençage

Le séquençage permet d'identifier une protéine grâce à sa séquence N-terminale. Le séquenceur (Procise ; appliedbiosystem 473 A courtaboeuf, France) automatise le procédé chimique de la dégradation d'Edman, procédé permettant le clivage des acides aminés un à un à partir du N-terminal de la protéine. Le séquenceur est composé de deux cartouches (A et B), d'une chambre de conversion, d'une colonne HPLC et de flacons de réactifs (Figure 12).



Figure 12 : Séquenceur automatique d'Edman

Un cycle de séquençage se déroule en 3 étapes : le couplage, le clivage et la conversion. Après ce cycle, l'acide aminé en N-terminal est libéré sous forme liée à du PhénylThioHydantoïne (PTH - aa). Il est alors injecté dans une colonne HPLC en phase inverse et détecté à une longueur d'onde de 269nm. Il est ensuite identifié par comparaison avec un chromatogramme standard représentant les temps d'élution attendus pour les différents PTHs – aas (Figure 13).

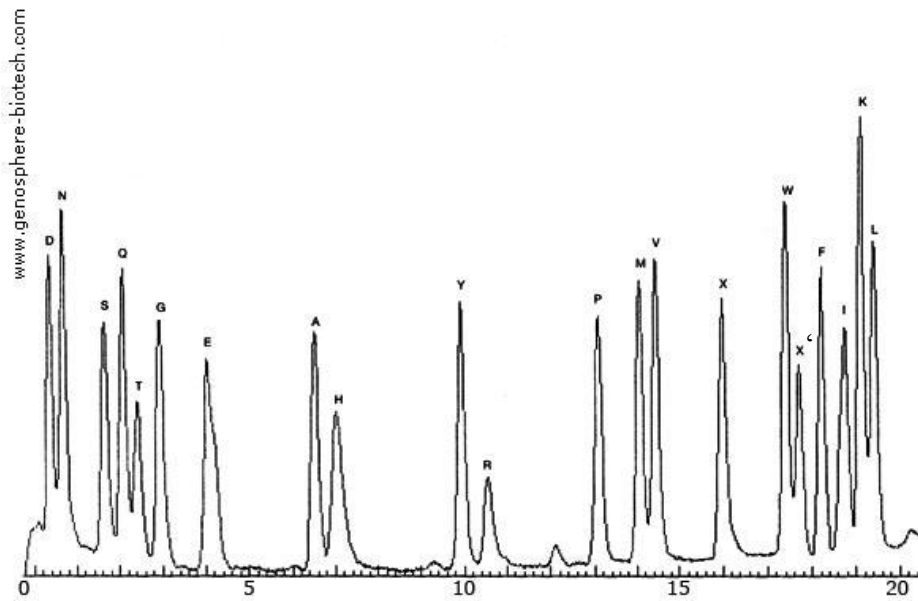


Figure 13 : Profil HPLC type des PTH-acides aminés (X : DPTU : diphenylthiourée ; X' : DPU : diphenylurée)

Par répétition du cycle de séquençage, il est donc possible de caractériser la séquence peptidique en partant du N-terminal. Pour l'analyse, 10 picomoles de peptides en solution dans l'eau sont déposés sur un disque en fibre de verre contenant du biobrane TM, composé permettant le maintien de la protéine sur le filtre, empêchant ainsi qu'elle soit entraînée par les solvants d'extraction. La réaction d'Edman est ensuite répétée 6 fois, ce qui nous permet d'identifier les 6 premiers acides aminés N-terminaux de nos peptides par comparaison avec un profil HPLC des standards PTH-acides aminés (**Figure 13**). Nous pourrions ensuite identifier les peptides par interrogation des banques de données (ExPASy, Protéomics).

La réaction d'Edman :

- **Le couplage**

Lors de cette première partie, on couple l'AA N-terminal de la protéine avec du PhénylIsoThioCyanate (PITC). Le couplage se fait dans les conditions basiques (pH= 8) en présence de N-Méthyl Pipéridine (NMP). Il faut être dans de telles conditions pour que le groupement amine du résidu N-terminal réagisse avec le PITC pour former du PhénylThioCarbamyl-protéine (PTC). Lors de cette étape, la température est alors de 45°C dans la cartouche (**Figure 14**).

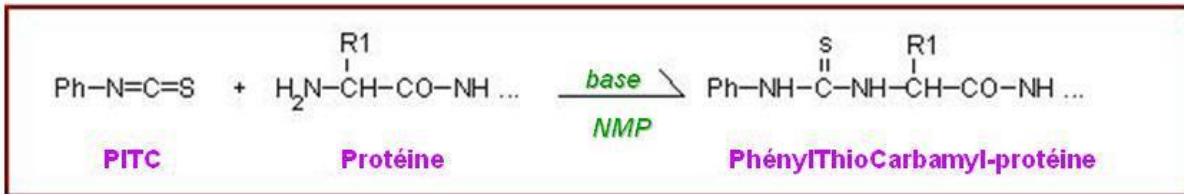


Figure 14 : Réaction de couplage dans la réaction d'Edman

Source : <http://www.ifr88.cnrs-mrs.fr/proteomique/IMG/jpg/Couplage.jpg>

- **Le clivage**

Cette opération est effectuée dans la cartouche et le clivage a lieu en milieu acide anhydre. C'est la présence de TFA pur qui va provoquer la rupture de la liaison peptidique entre l'acide aminé 1 et l'acide aminé 2. L'AnilinoThiaZolinone (AZT-aa) obtenue est très instable, il faut la convertir pour permettre l'identification de l'acide aminé détaché (**Figure 15**).

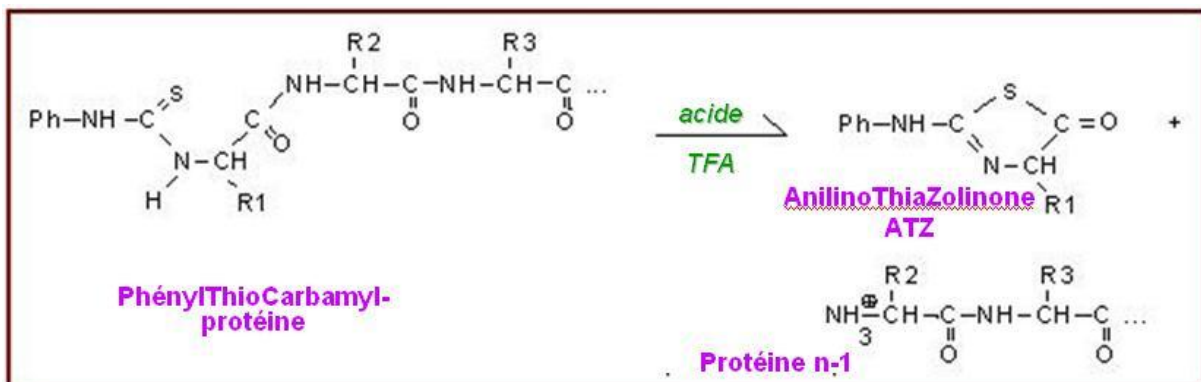


Figure 15 : Réaction de clivage dans la réaction d'Edman

Source : <http://www.ifr88.cnrs-mrs.fr/proteomique/IMG/jpg/Clivage.jpg>

- **La conversion**

Cette opération est faite dans la chambre de conversion à une température de 64°C pendant 9 minutes. Nous placerons notre composé dans un milieu acide (TFA = eau 25%). Une hydrolyse va permettre la transformation d'ATZ-aa en PhénylthioHydanthoine (PTH-aa) qui est le composé stable et porteur du radical de l'acide aminé N-terminal que l'on souhaite identifier (**Figure 16**). Le PTH-aa va être chromatographié par HPLC en phase inverse où son temps d'éluion sera comparé à un mélange des PTH-aas à 269nm (**Figure 13**).

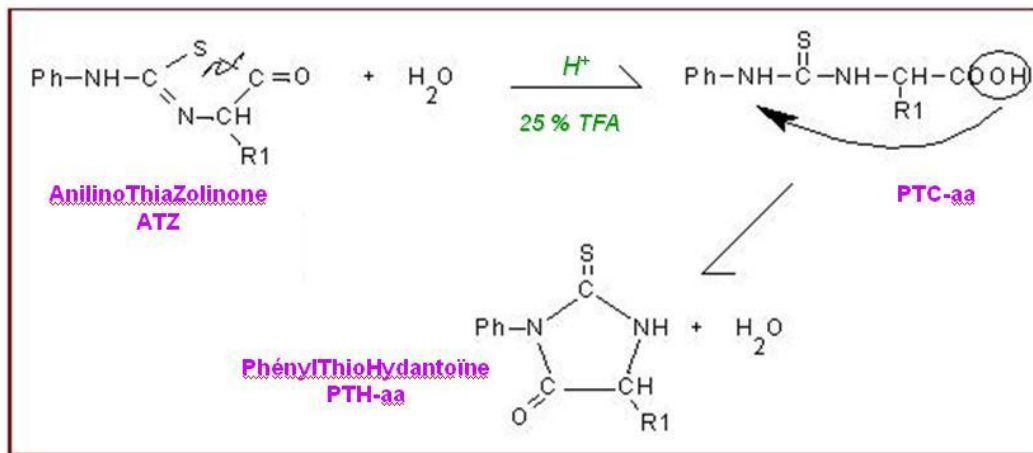


Figure 16 : Réaction de conversion dans la réaction d'Edman
 Source : <http://www.imm.cnrs.fr/proteomique/IMG/jpg/Conversion.jpg>

IV.2.5 Quantification des pics majoritaires

Pour pouvoir quantifier le pourcentage de nos protéines d'intérêt par rapport aux protéines totales de notre échantillon, nous avons mesuré la hauteur totale de l'ensemble des pics, et nous avons effectué le ratio suivant :

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

IV.2.6 L'électrophorèse SDS-PAGE

Le but de cette technique est de séparer les protéines d'un échantillon en fonction de leur poids moléculaire. Le principe consiste à soumettre un mélange de molécules immobilisées sur un support à un champ électrique ce 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). En fonction de différents paramètres (charge, masse, forme, nature du support, conditions physico-chimiques) la vitesse de migration va être variable, ce qui permet la séparation des différentes molécules. A partir de ce principe général, il existe plusieurs variantes de cette technique adaptées à différentes situations.

IV.2.6.1 L'électrophorèse en condition dénaturantes

Comme son nom l'indique, dans cette variante, préalablement à leur séparation électrophorétique les molécules sont soumises à un traitement dénaturant détruisant la structure tridimensionnelle native. Il existe différentes méthodes pour dénaturer les molécules. Dans notre cas, nous utilisons les traitements thermiques (eau à 100°C) et l'utilisation d'un agent dénaturants le SDS. Ce dernier est un détergent très utilisé pour l'électrophorèse de protéines car il possède des caractéristiques particulièrement intéressantes. Non seulement il dénature les protéines, mais il se fixe dessus avec une densité linéaire approximativement constante, c'est à dire que le nombre de molécules de SDS qui se fixe sur une protéine est approximativement proportionnel au nombre d'acides aminés qui la composent, donc à sa masse moléculaire.

IV.2.6.2 Le support

Dans notre étude, nous avons réalisé une électrophorèse dénaturante : le Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) qui utilise comme support un gel de polyacrylamide (Mini-PROTEAN TGX 4-15 %). Ce gradient de 4-15% va permettre d'obtenir un gradient de porosité de sorte que toutes les protéines vont pouvoir migrer sur le gel (les plus petites seront retenues à la fin du gel). Le SDS est chargé négativement, nos protéines vont alors se trouver englobées dans le SDS donc dans une enveloppe négative, la séparation se fera alors uniquement en fonction de la masse moléculaire. Idéalement, le support d'une électrophorèse doit être parfaitement inerte chimiquement. Seul un effet mécanique ralentissant la progression des molécules est recherché, ce qui permet d'améliorer la séparation. Plus les molécules seront de grande taille, plus leur progression sera difficile donc lente.

En fonction de la taille des pores, on peut donc efficacement séparer des molécules situées dans une fourchette approximative de masses moléculaires.

Pour notre étude, nous utilisons comme contrôle positif des protéines solubles des granules chromaffines (PSG) qui sont les organelles de stockage des chromogranines et comme contrôle négatif de l'eau et du bleu de charge. La quantité de salive de nos échantillons déposée sera de l'ordre de 10µL.

IV.2.7 Le Western Blot

Le but de cette manipulation va être la mise en évidence des protéines d'intérêt (CGA et CGB) en mettant en contact nos protéines avec des anticorps anti-CGA et anti-CGB.

Pour ce faire on réalise deux étapes :

IV.2.7.1 Transfert des protéines du gel à la membrane

Lorsque la migration des protéines sur le gel est terminée (maximum 1h), on va transférer ce gel sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF). La membrane est placée face-à-face avec le gel, et un courant électrique de 75V de tension est appliqué aux grandes plaques sur l'un des deux côtés pendant 1h dans un tampon de transfert composé de 70mL de Tris Glycine SDS 10x (TGSDS), 140mL de méthanol et 490mL d'eau milliQ. Les protéines chargées négativement par le SDS sont placées dans un champ électrique et vont migrer vers l'anode (+) où elles seront stoppées par la membrane de PVDF en conservant l'organisation relative qu'elles avaient dans le gel. Les membranes de PVDF doivent être activées par le méthanol ou l'isopropanol 100 % avant leur utilisation.

Il résulte de ce transfert que les protéines sont exposées sur une surface mince, ce qui facilite les étapes de détection ultérieures. La fixation des protéines à la membrane se fait grâce à des interactions hydrophobes et ioniques entre la membrane et les protéines.

IV.2.7.2 L'immunodétection

Pour une immunodétection, on va mettre en contact la membrane avec deux anticorps : un anticorps primaire anti CGA qui va venir se coupler sur la protéine d'intérêt et un anticorps secondaire anti anti CGA qui permettra la révélation de la présence de cet anticorps par immunofluorescence. La membrane PVDF est saturée avec de l'albumine bovine sérique (BSA) à 0.5% (w/vol) pendant 3 min. On obtient ainsi un blocage des sites d'interaction non spécifiques. On soumet ensuite la membrane à l'anticorps primaire (anti-CGA ou anti-CGB) en laissant incubé pendant 15 minutes.

Après 3 lavages avec du phosphate buffered saline (PBS) tween 20 1x, la membrane est mise à incuber pendant 15minutes avec un anticorps secondaire (BSA 0.05% et 5 µL de l'anticorps secondaire). On soumet à nouveau la membrane au PBS pour 3 lavages de 5 min. La révélation de l'activité de la peroxydase est obtenue après 5 min d'incubation de la membrane en présence du Kit Supersignal West Femto. La peroxydase, en présence de son substrat H₂O₂, permet la décomposition oxydative du luminol contenu dans le révélateur du kit. Ceci génère du 3-aminophthalate dans un état excité, qui se désactive en émettant un photon. La détection est obtenue par lecture sur un imager (Chemi Doc Biorad).

J'ai prélevé des échantillons salivaires chez 7 enfants recrutés au CMCO. Pour chaque enfant, j'ai réalisé 4 prélèvements salivaires (15j, 1mois, 3mois et 6mois) dont les profils HPLC ont été réalisés pour montrer l'évolution en fonction du temps des protéines sécrétées dans la salive.

V.1 Cinétique des profils HPLC en fonction de l'âge du nourrisson

Nous avons mis en évidence pour chaque temps de prélèvement un profil HPLC type (**Figure 17 a-d**). Dans cette première figure, il apparaît tout de suite des différences en fonction du temps. En effet, à 15j on remarque des pics nettement plus élevés élués à 42, 44, 46 et 47min alors que le reste du profil reste très plat (**Figure 17a**). A 1mois, on retrouve ces 4 pics principaux avec l'apparition de deux nouveaux pics à 22,5 et 28min (**Figure 17b**).

A 3mois, on observe un enrichissement global de notre chromatogramme, avec une nette diminution des pics élués de 42 à 47min et l'apparition d'un pic majeur élué à 32min (**Figure 17c**). Enfin, à 6 mois, on remarque cette persistance du pic majoritaire à 32min, mais une très nette diminution des pics élués de 42 à 47min (**Figure 17d**).

L'examen de ces 4 chromatogrammes montre que deux périodes distinctes correspondent à la composition de la salive.

- Du temps 0 à 1mois : période riche en protéines et peptides hydrophobes
apparition de deux nouveaux pics élués à 22,5 et 28min.
- De 3mois à 6mois : période principalement constituée de pics correspondant à des composés plus polaires (32-33min)

Afin de comprendre l'évolution de la composition de la salive en tant que liquide biologique impliqué dans l'immunité pour la protection de la cavité buccale et du système digestif, nous allons tester les activités antimicrobiennes des constituants de ces différents pics.

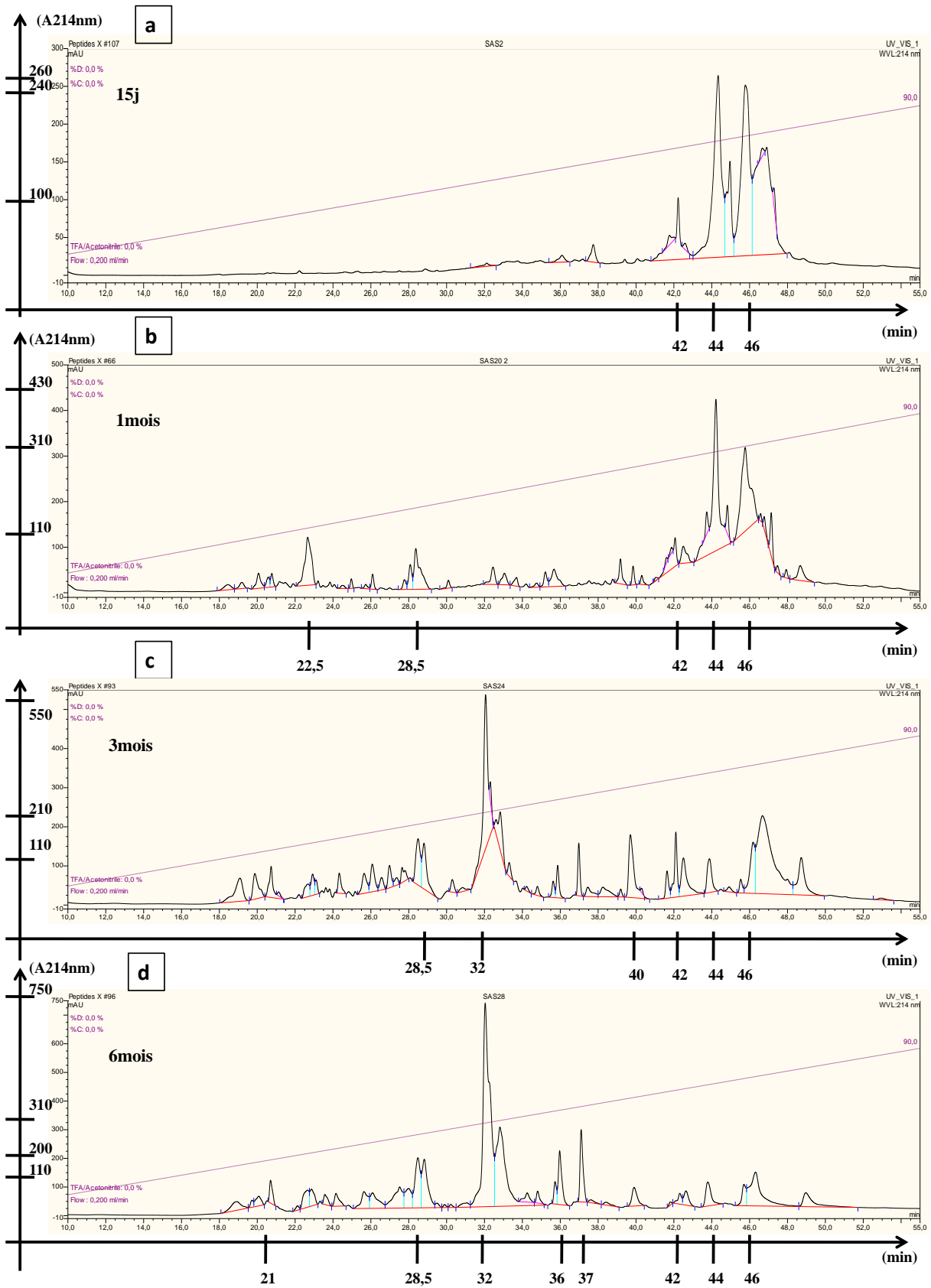


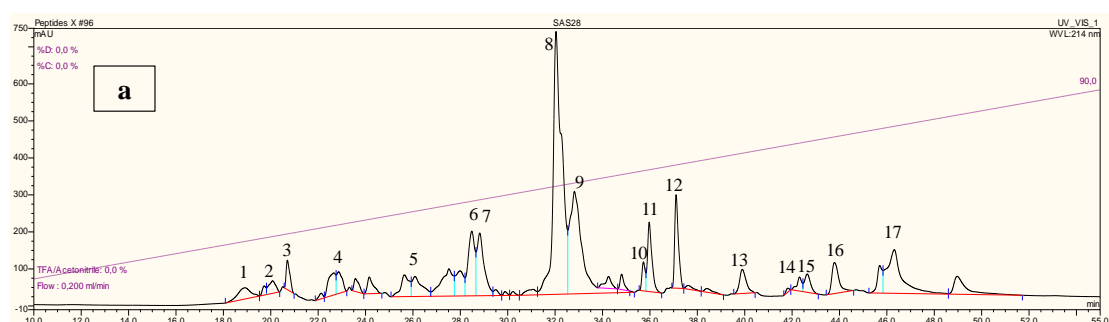
Figure 17 : Cinétique des profils HPLC (15j, 1mois, 3mois et 6mois)

V.2 Activités antimicrobiennes

Chaque pic d'intérêt est concentré à la speed vac en vue de réaliser des triplicates pour les tests antimicrobiens. Les tests antimicrobiens ont été réalisés sur l'ensemble des pics des échantillons de 6 mois (**Figure 18a**). Les souches microbiennes testées sont *M. luteus* et *C. albicans*. *M. luteus* est une bactérie Gram + et *C. albicans* une levure très présente chez les nourrissons.

Les tests sur *M. luteus* révèlent une activité antibactérienne forte pour les pics 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 13, 14 et 17 allant de 80 à 100% d'inhibition de la croissance microbienne. Les pics 9 et 15 présentent une activité antibactérienne modérée allant de 40 à 60% d'inhibition de la croissance bactérienne (**Figure 18b**).

Les tests sur *C. albicans* révèlent une activité antifongique modérée pour les pics 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 13, 14 et 17 allant de 35 à 50% d'inhibition de la croissance fongique (**Figure 18b**). Ces taux faibles peuvent être expliqués par un matériel déposé insuffisant pour obtenir de grands pourcentages d'inhibition.



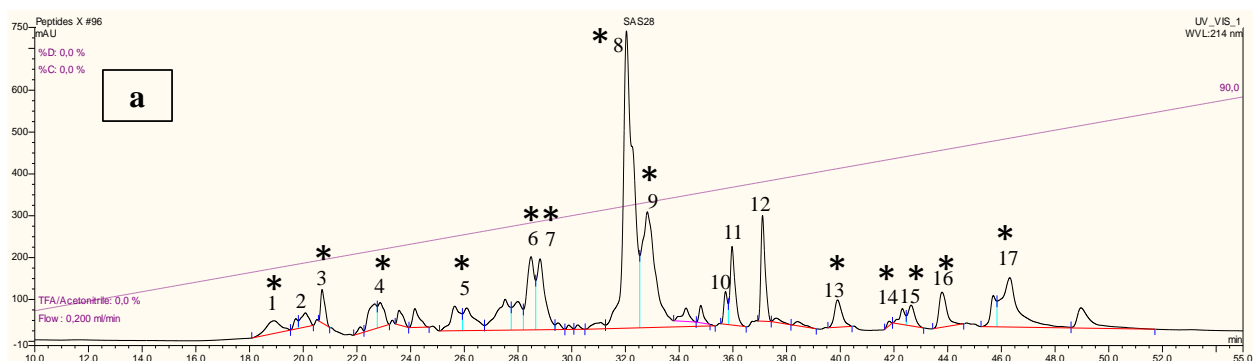
Pics	Activité antibactérienne Testé sur <i>M.luteus</i>	Activité antifongique Testé sur <i>C.albicans</i>
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	ND
5	+	+
6	+	+
7	+	+
8	+	+
9	+	ND
10	ND	ND
11	+	ND
12	ND	ND
13	+	+
14	+	+
15	+	ND
16	-	ND
17	+	+

Figure 18 : Résultats des tests antimicrobiens effectués sur les pics majoritaires (ND, non déterminé ; +, réponse positive)

V.3 Caractérisation structurale des peptides antimicrobiens

Chaque fraction majoritaire active du profil HPLC (**Figure 18/19a**) est caractérisé par le séquenceur Procise (voir Matériels et Méthodes) afin d'obtenir une séquence d'acides aminés qui nous permettra d'identifier la protéine présente (**Figure 19b**).

On identifie des PRPCs au temps 19, 22.5 et 28min (pics 1, 4, 6, 7). Les PRPCs sont des protéines qui participent au maintien de l'homéostasie du calcium dans la cavité buccale et agissent comme lubrifiant. Elles protégeraient également le tractus gastro-intestinal des effets toxiques.



b

Pics	Séquences N-ter identifiées	Identification des pics
1	GPPQGQSP	PRPC
3	ERDHEP	Mucine
4	GPPQGGHPRP	PRPC
5	LYDN	Histatine
6	DGGDSQFIDEE	PRPC
7	DGGDSQFIDEE	PRPC
8	GYGYQPVPVE	Stathérine
9	ND	ND
13	GLSEAKPATPEI	Cystatine
14	ND	ND
15	ND	ND
16	ND	ND
17	ND	ND

Figure 19 : Identification des peptides antimicrobiens ; (a) Profil HPLC étudié (*, fraction antimicrobienne) ; (b) Identification du peptide ou de la protéine actif (ND, non déterminé)

La mucine est identifiée dans le pic 3 élué à 21min. Les mucines peuvent être classées en deux groupes : les mucines à haut poids moléculaires et les mucines de bas poids moléculaires. La mucine retrouvée dans l'échantillon est une mucine 7 qui appartient aux mucines de bas poids moléculaire. Elles seraient capables de retenir 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 et protecteur du système digestif.

Le séquençage des échantillons a également permis de mettre en évidence de l'histatine 1/3 éluée au temps 26min (pic 5). Les histatines présentent des activités fongicides contre une large gamme de champignons pathogènes. Elles sont également impliquées dans la formation de la pellicule exogène acquise.

De plus, on a identifié la stathérine dans le pic 8 élué à 32min du chromatogramme. La stathérine permet d'inhiber la précipitation spontanée des phosphates de calcium, elle joue également un rôle de lubrification des surfaces dentaires et participe à l'élaboration de la pellicule exogène acquise.

Nous avons ensuite identifié la cystatine éluée à 39min (pic 13). Les cystatines sont des inhibiteurs naturels des protéases à cystéine. Leur rôle serait de protéger les tissus buccaux de ces enzymes de dégradation protéolytique.

Malheureusement, les pics 42, 44 et 46 ont résisté à la réaction d'Edman. Les raisons de ce blocage peuvent être : l'acide aminé N-terminal bloqué, une trop faible quantité d'une protéine de haut poids moléculaire, un complexe protéique hydrophobe. Pour pallier à ceci, il faut cliver la protéine bloquée par la trypsine, puis purifier les fragments de cette protéine par HPLC. Un des pics issu de l'HPLC sera séquencé, et la séquence obtenue permettra de caractériser un des fragments internes de la protéine et d'identifier la protéine concernée.

V.4 Caractérisation des fragments dérivés de la CGA et de la CGB

Parce que les CGA et CGB sont présentes dans la salive (Obayashi et al. 2013) et impliquées dans l'immunité innée, nous avons cherché à identifier leur production et celle des fragments dérivés grâce aux techniques d'électrophorèse et de Western Blot par des anticorps polyclonaux spécifiques (voir Matériels et Méthodes p.54-55).

Après immunodétection puis révélation des membranes à l'imager, nous avons identifié les fragments dérivés de la CGA présents dans les échantillons étudiés (**Figure 20**). Cette identification est possible grâce au PM apparent et aux données précédemment publiées (Gasnier et al. 2004 ; Strub et al. 1994).

Dans le puits 7 (échantillon de 15j), on remarque l'absence de fragment dérivé de la CGA (**Figure 20A**). Dans le puits 8 où se trouve l'échantillon 1mois, on observe la présence de trois fragments (Vasostatine II, 1-209, 1-315/331), enfin pour le puits 9 contenant l'échantillon 3mois on retrouve deux fragments dérivés (Vasostatine II, 1-315/331) (**Figure 20A**).

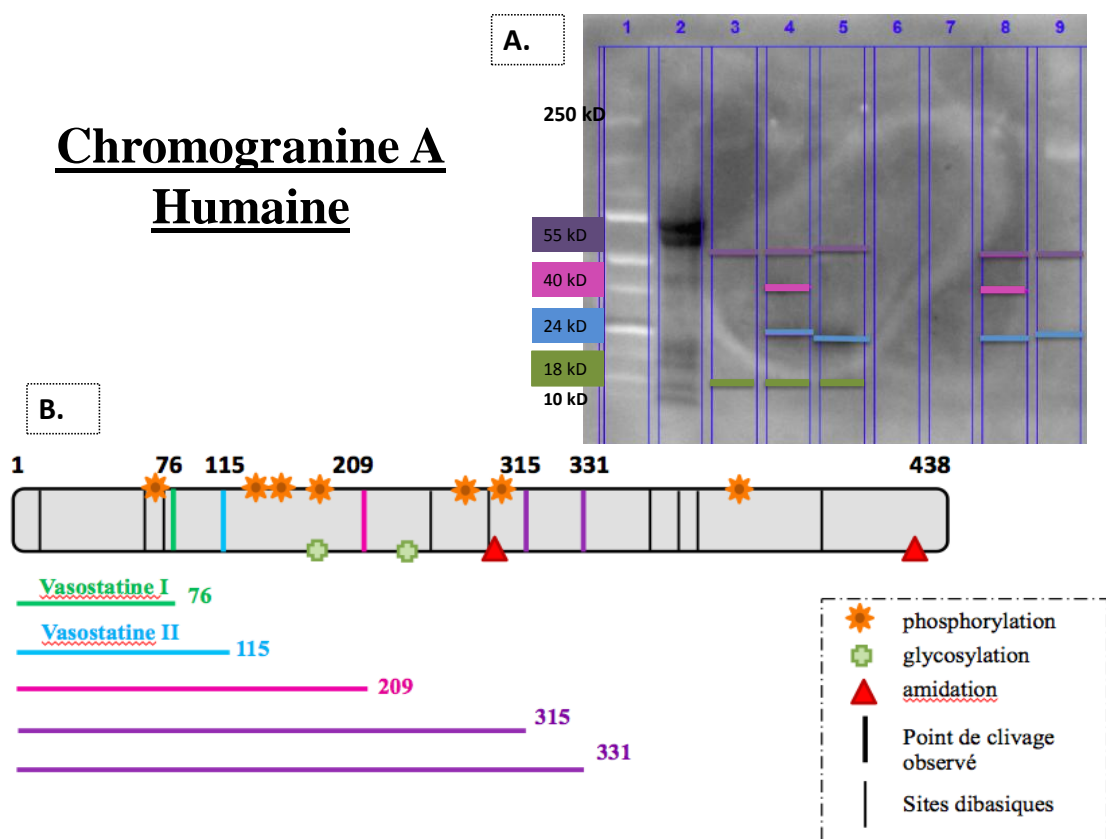


Figure 20 : Caractérisation des fragments dérivés de la CGA ; A. Western Blot avec un anticorps anti-CGA (4-16) 1/5000 v/v : 1, PM ; 2, PSG ; 3-5, allaitement maternel (15j, 1mois, 3mois) ; 7-9, lait artificiel (15j, 1mois, 3mois) ; 10, PM B. Localisation des fragments immunodétectés sur la séquence de la CGA humaine.

En ce qui concerne la CGB (**Figure 21**), nous avons traité les échantillons dans les mêmes conditions que pour la CGA.

Dans le puits 7, on retrouve la présence du fragment dérivé de la CGB (519-657). Dans le puits 8, on remarque la présence de 4 fragments dérivés de la CGB (343-657, 497-657, 519-657, 579-657). Et enfin, dans le puits 9, on observe deux fragments dérivés de la CGB (343-657, 519-657).

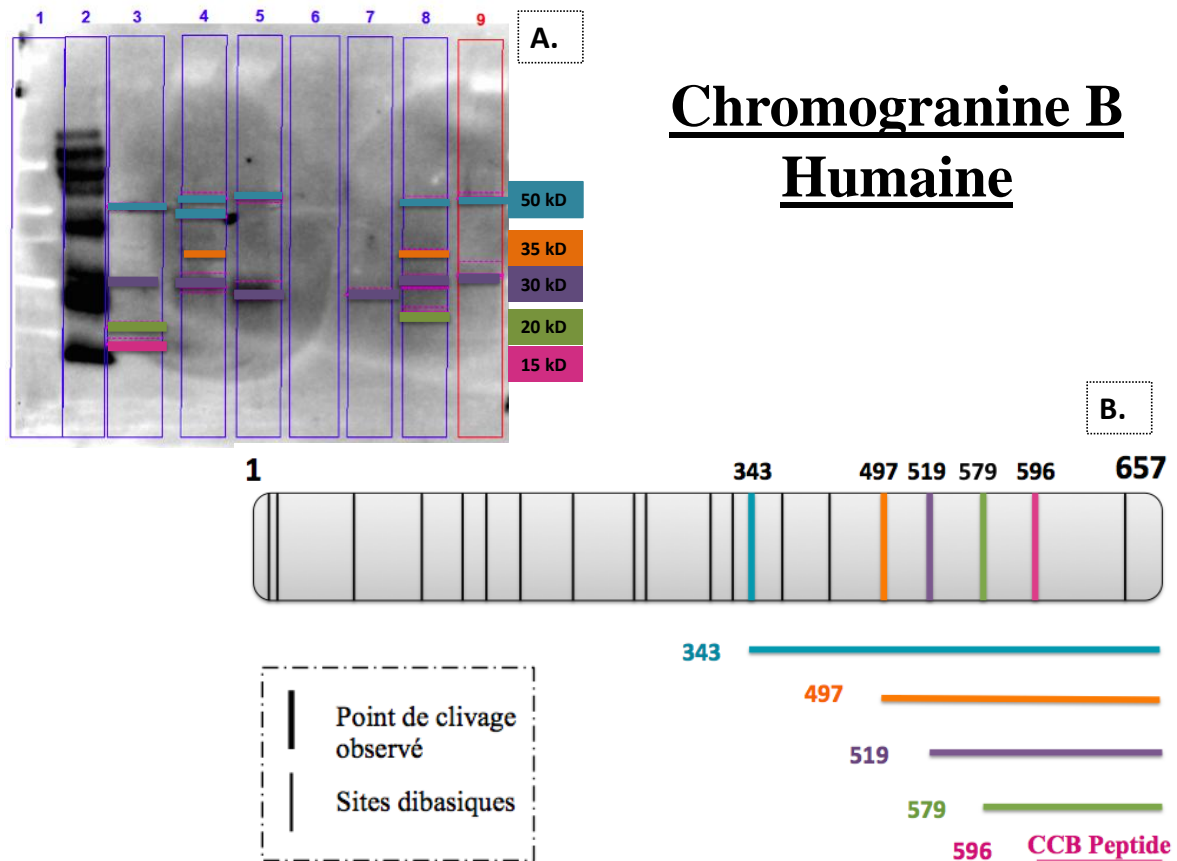


Figure 21 : Caractérisation des fragments dérivés de la CGB ; A. Western Blot avec un anticorps anti-CGB (645-657) 1/10000 v/v : 1, PM ; 2, PSG ; 3-5, allaitement maternel (15j, 1mois, 3mois) ; 7-9, lait artificiel (15j, 1mois, 3mois) ; 10, PM B. Localisation des fragments immunodétectés sur la séquence de la CGB humaine

A partir de publications antérieures (Strub et al. 1994 ; Metz Boutigue et al. 1993), on a pu reproduire sur nos figures tous les points de clivage connus de la CGA et de la CGB.

Ainsi les points de clivage retrouvés dans nos échantillons pour la CGA se trouvent en position 115, 209, 315 et 331.

En ce qui concerne les points de clivage 209 et 315/331, on remarque qu'ils contiennent des sites de glycosylation, ainsi que des phosphorylations c'est pourquoi plusieurs bandes peuvent se trouver dédoublées ou plus épaisses, on parle de modifications post-traductionnelles.

Pour la CGB, l'existence de glycosylation ou de phosphorylation n'est pas référencée.

Parmi les fragments dérivés de la CGA, on retrouve dans nos échantillons la Vasostatine II qui est reconnue comme peptide antimicrobien (Lugardon et al. 2000). De même, parmi les fragments dérivés de la CGB, on retrouve le CCB un peptide antimicrobien également (Strub et al. 1996)

V.5 Comparaison des résultats lait artificiel/lait maternel

V.5.1 Comparaison des cinétiques

Nous abordons maintenant la partie la plus intéressante de l'étude et ce pourquoi nous avons décidé de nous pencher sur ce sujet.

En effet, il est intéressant de pouvoir comparer les résultats de nos deux études et de pouvoir tenter de répondre à la question 'Des deux types d'allaitement testés quel est celui qui apporterait le plus de défenses immunitaires?'.
D'un point de vue cinétique, on observe une certaine similarité entre les deux types d'allaitement. En effet, à 15 jours pour le lait maternel on retrouve également 2 pics majoritaires au temps 42 et 46 sur le chromatogramme (**Figure 22**).

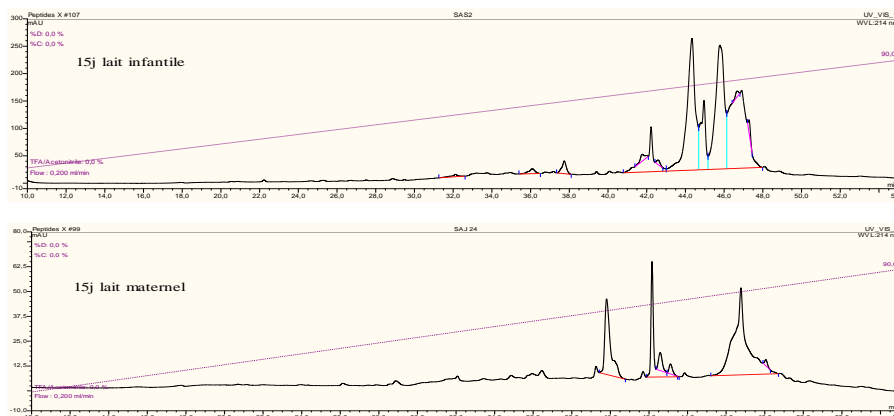


Figure 22 : Comparaison des profils type HPLC pour 15 jours

A 1mois, nous observons un enrichissement des profils pour les deux types de lait. En effet, dans les deux cas il apparait des pics à 22 et à 28 min avec persistance des pics majoritaires à 42 et 46min (**Figure 23**).

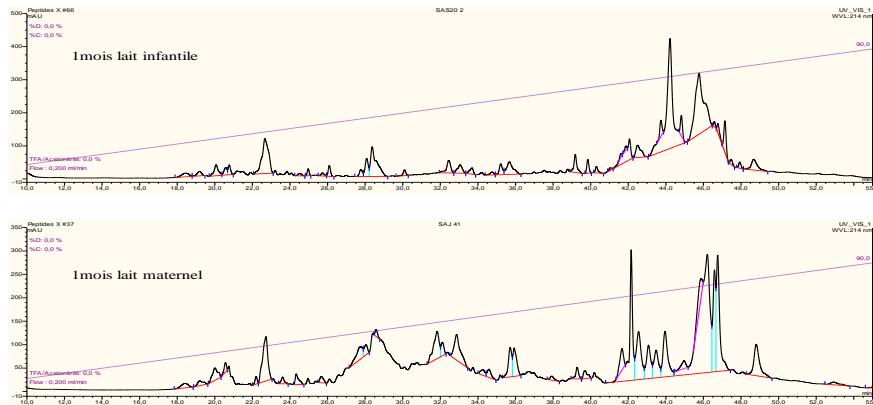


Figure 23 : Comparaison des profils HPLC type pour 1mois

A 3mois, une différence majeure apparait, il s'agit de l'apparition du pic de stathérine élué à 32min pour le lait infantile alors que pour le lait maternel il est encore inexistant. On peut également remarquer une persistance des pics élevés à 42 et 46 min pour le lait maternel alors que pour le lait infantile on observe une nette diminution de ces pics. Le reste du chromatogramme reste similaire pour le lait maternel et le lait infantile avec des pics élués à 20, 22, 28 et 36 min (**Figure 24**).

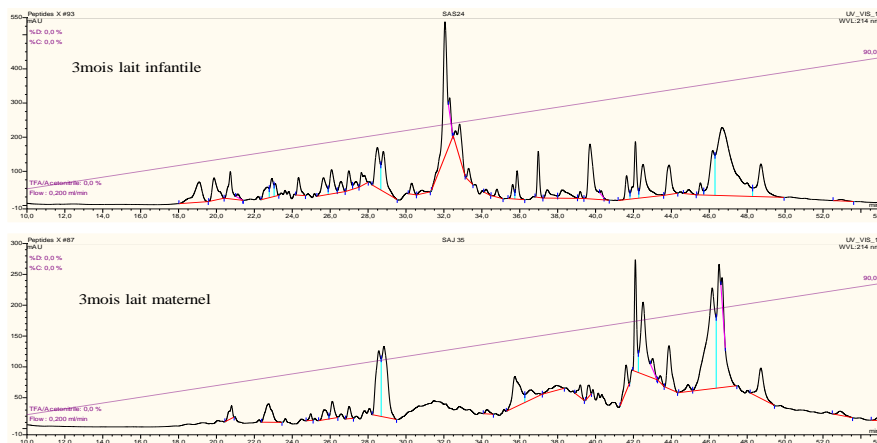


Figure 24 : Comparaison des profils HPLC type pour 3mois

Enfin, à 6mois, on observe l'apparition du pic de stathérine pour le lait maternel et il reste majoritaire pour le lait artificiel. Nous pouvons noter également une diminution constante des

pics de la fin de chromatogramme pour le lait artificiel mais qui reste plus élevé pour le lait maternel (**Figure 25**).

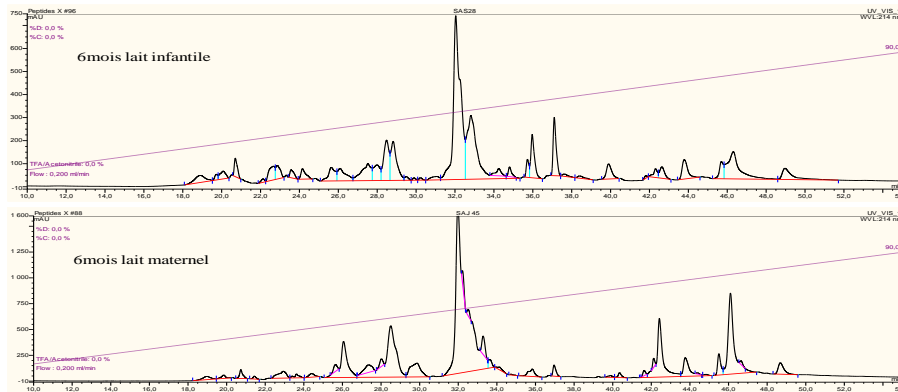


Figure 25 : Comparaison des profils HPLC type pour 6mois

V.5.2 Comparaison de nos protéines d'intérêt

Selon la méthode décrite dans la partie Matériel et Méthodes p.52, nous avons calculé le pourcentage des protéines d'intérêt en fonction des protéines totales pour tous les échantillons de l'étude cinétique. En ce qui concerne les PRPCs, on observe des courbes très proches avec peu de différences majeures, cependant la courbe du lait infantile reste plus élevée (**Figure 26**).

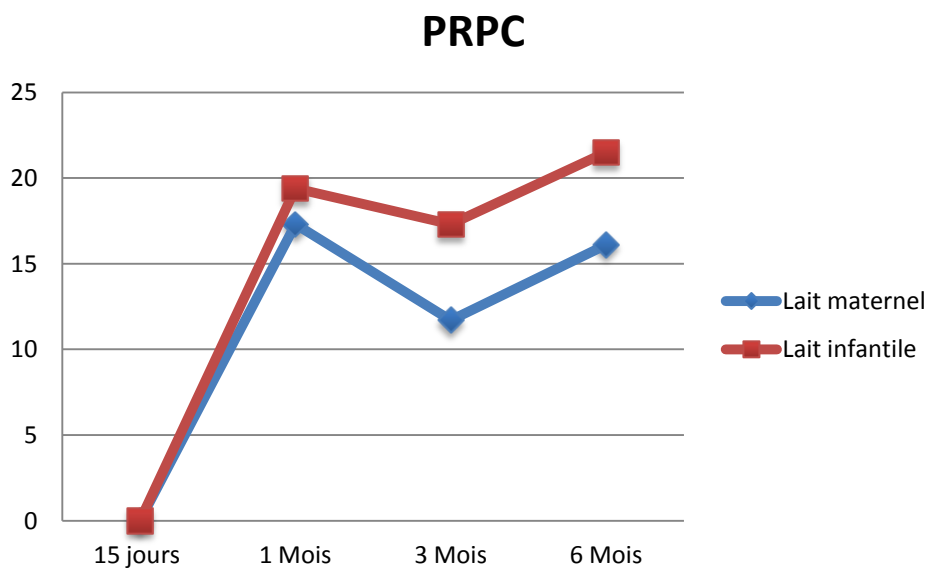


Figure 26 : Courbes comparatives du pourcentage de PRPC par rapport aux protéines totales en fonction de l'âge

Pour les mucines, il s'agit de la même conclusion, en effet les courbes affichent une même allure mais avec une courbe plus élevée pour le lait infantile (**Figure 27**).

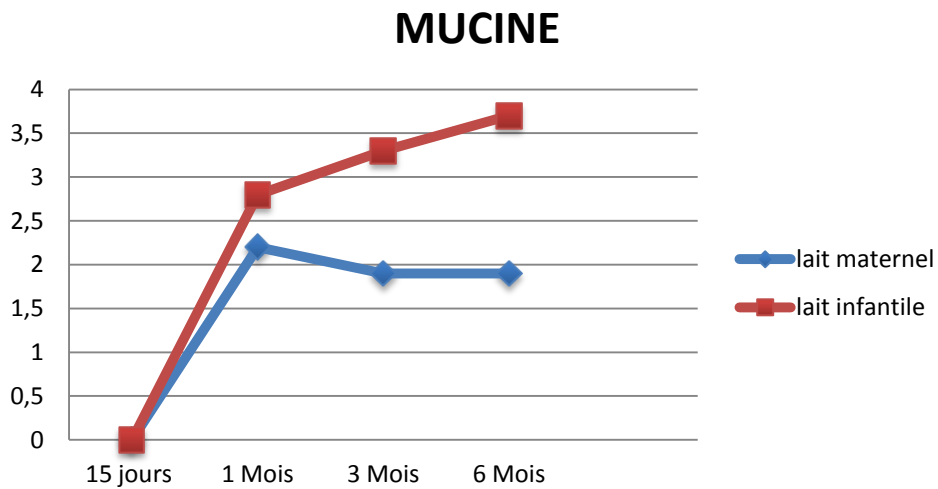


Figure 27 : Courbes comparatives du pourcentage de mucine par rapport aux protéines totales en fonction de l'âge

Concernant les histatines, peu de conclusions peuvent être tirées de ces courbes. En effet, il faudrait continuer l'étude pour estimer l'évolution de la concentration d'histatine à partir de 3mois (**Figure 28**).

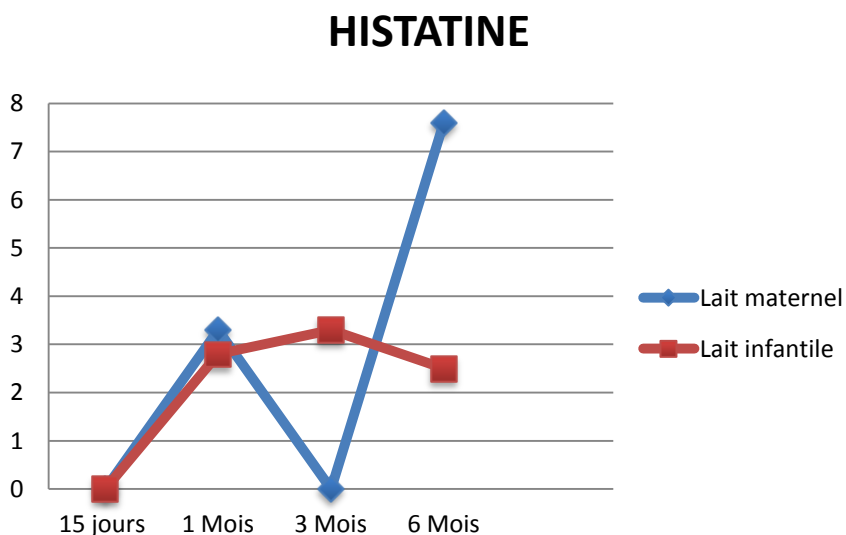


Figure 28 : Courbes comparatives du pourcentage d'histatine par rapport aux protéines totales en fonction de l'âge

Concernant la stathérine, la différence majeure entre les deux types d'allaitement réside dans le fait que ce pic apparaît à 3 mois pour les nourrissons allaités au lait infantile alors qu'il apparaît en une quantité importante qu'à l'âge de 6 mois pour les nourrissons allaités au lait maternel (**Figure 29**). Ceci peut trouver une explication dans le fait que les laits infantiles procurent une plus grande quantité de calcium (4fois plus) que le lait maternel. Or la stathérine est connue pour son rôle d'inhibition de la précipitation spontanée des phosphates de calcium.

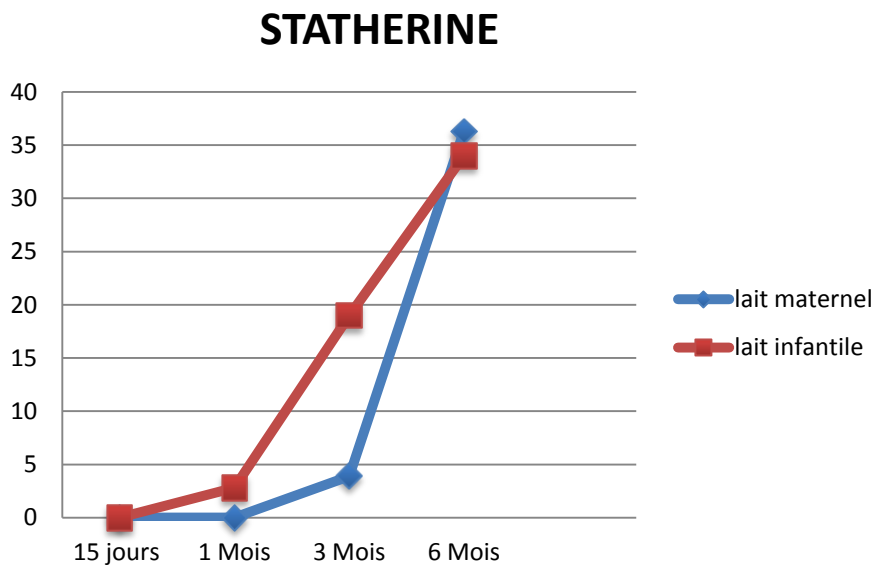


Figure 29 : Courbes comparatives du pourcentage de stathérine par rapport aux protéines totales en fonction de l'âge

On observe une nette différence au départ avec 27% de cystatine retrouvés dans la salive à 15 jours pour les nourrissons allaités au lait maternel alors qu'on ne les retrouve pas pour le lait infantile. Une nette diminution a ensuite lieu et c'est le lait infantile qui affiche alors des valeurs plus élevées que le lait maternel (**Figure 30**).

CYSTATINE

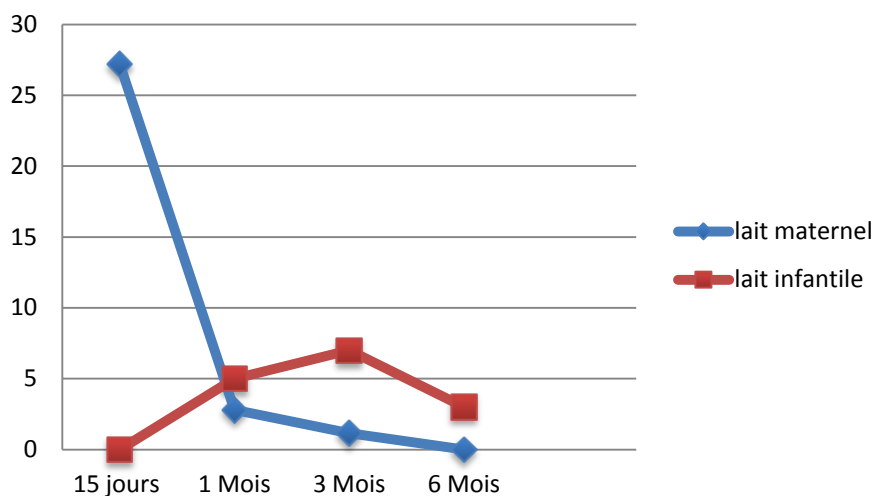


Figure 30 : Courbes comparatives du pourcentage de cystatine par rapport aux protéines totales en fonction de l'âge

Pour le pic 42, l'allure des courbes reste la même avec cependant la courbe du lait maternel plus élevé que celle du lait infantile (**Figure 31**).

PIC 42

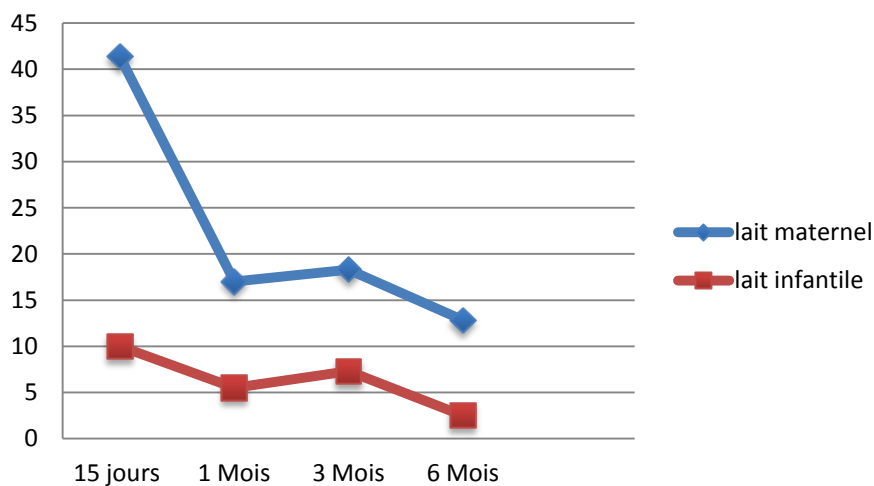


Figure 31 : Courbes comparatives du pourcentage du pic 42 par rapport aux protéines totales en fonction de l'âge

Pour le pic 44, on observe une nette différence à 15 jours avec une valeur bien plus élevée pour le lait infantile mais les courbes se retrouvent à 6 mois avec une valeur faible (**Figure 32**).

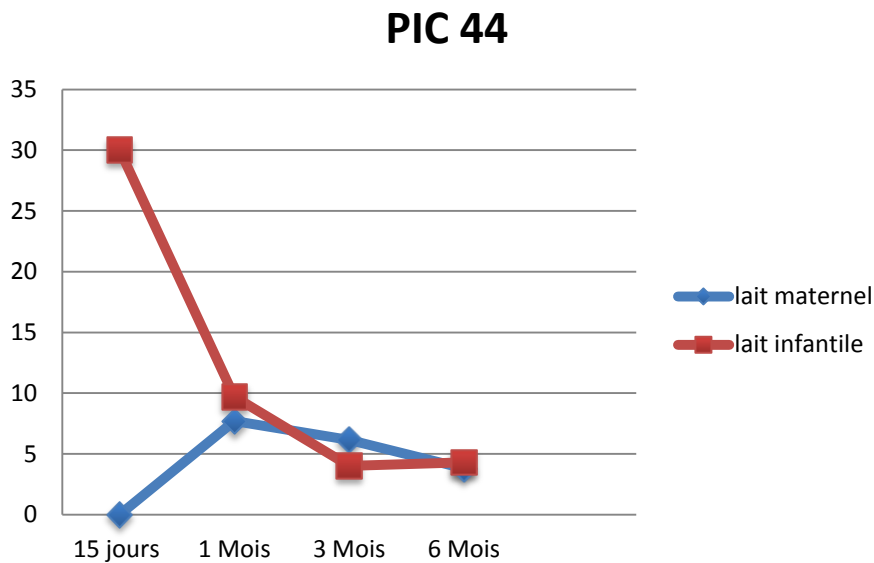


Figure 32 : Courbes comparatives du pourcentage du pic 44 par rapport aux protéines totales en fonction de l'âge

Et pour finir, les courbes représentant le pic 46 montre une allure similaire avec toutefois des valeurs nettement plus élevées pour le lait maternel (**Figure 33**).

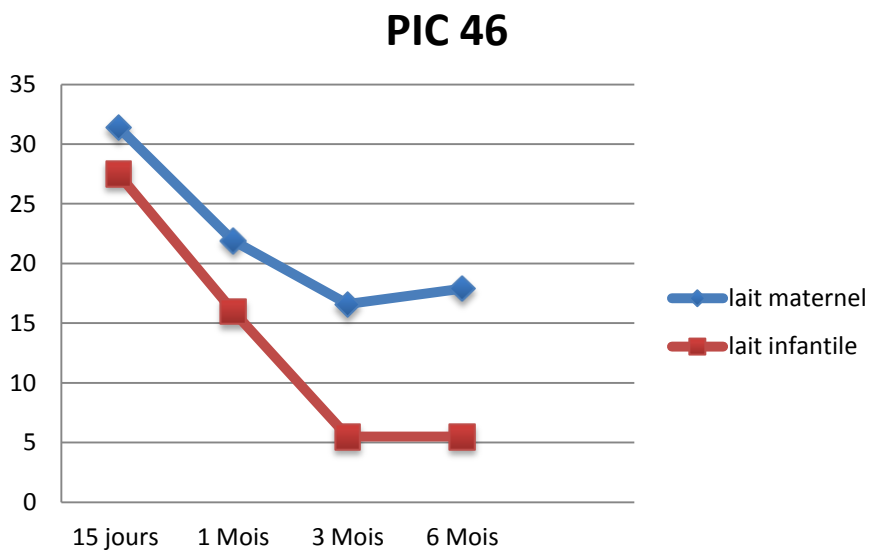


Figure 33 : Courbes comparatives du pourcentage du pic 46 par rapport aux protéines totales en fonction de l'âge

V.5.3 Comparaison des fragments dérivés des CGA et CGB

Intéressons-nous maintenant aux différences ou similitudes d'expression des protéines d'intérêt (CGA et CGB) du groupe du Dr Marie Hélène Metz-Boutigue.

Pour la CGA, on remarque que le lait maternel présente un enrichissement en fragments dérivés par rapport au lait infantile. En effet, on peut noter la présence du fragment vasostatine I qu'on ne retrouve pas pour le lait infantile.

En ce qui concerne la CGB, même observation que précédemment. En effet, la salive des nourrissons allaités par du lait maternel semble plus riche en fragments dérivée de la CGB. Le peptide CCB n'est en effet pas retrouvé du côté du lait infantile alors qu'on le retrouve à 15 jours pour l'allaitement maternel.

En conclusion, on peut noter que la salive des nourrissons nourris par du lait maternel présente une plus grande expression des CGS et de leurs dérivés par rapport aux enfants nourris par des laits infantiles. Ce résultat suggère alors pour les laits maternels une meilleure mise en place du système enzymatique qui assure la dégradation protéolytique des CGs pour produire les PAMs.

Conclusions générales et perspectives

La société actuelle place le lait maternel comme l'alimentation idéale aux besoins nutritionnels du nourrisson pour ses propriétés immunitaires reléguant les laits infantiles au second plan. Cependant la place actuelle de la femme dans la société ne permet pas toujours d'assurer un allaitement maternel exclusif. Dans ce contexte, elles se tournent vers les formules infantiles qui leur sont proposées.

Mon travail démontre que la composition salivaire des nourrissons allaités par des laits infantiles possède autant de protéines antimicrobiennes que celle des nourrissons nourris par du lait maternel. De plus, au vu des résultats présentés et discutés dans la partie précédente, le lait infantile semble anticiper la protection salivaire des nourrissons avec des taux de PRPC, cystatine, mucine et stathérine plus élevés que pour le lait maternel sur la période 15j- 6mois. Par contre la salive des nourrissons allaités par du lait maternel présente quant à elle plus de fragments dérivés des CGs (CGA et CGB). Ce résultat suggère 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. Les CGs ont également une activité antimicrobienne, des propriétés anti-stress et cardio-protectrices.

La réponse à la question « Des deux types d'allaitement testés quel est celui qui apporterait le plus de défenses immunitaires ? » reste cependant difficile à donner.

Différentes pistes sont envisagées pour poursuivre le sujet et affiner cette étude. En effet, il faudrait terminer l'identification des PAMs hydrophobes dont les extrémités N-terminale étaient bloquées. De plus, il serait intéressant d'étendre l'étude antimicrobienne sur d'autres souches bactériennes et fongiques cariogènes de la cavité buccale.

Il faudrait également continuer le suivi des nourrissons jusqu'à l'âge de 9mois ou 1an pour avoir une idée de l'évolution des peptides antimicrobiens au moment de l'apparition des premières dents et de l'abandon progressif de l'alimentation par des laits.

On pourrait également envisager d'élargir la cohorte pour chaque lait testé et éventuellement d'établir un comparatif entre les différentes formules infantiles qu'on retrouve sur le marché.

SIGNATURE DES CONCLUSIONS

Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Chirurgie Dentaire

Nom - prénom de l'impétrant : NEUROHR Sarah

Titre de la thèse : Incidence de l'allaitement par du lait infantile sur la caractérisation des peptides antimicrobiens dans la salive du nourrisson.

Directeur de thèse : Docteur Frédéric OBRY



VU

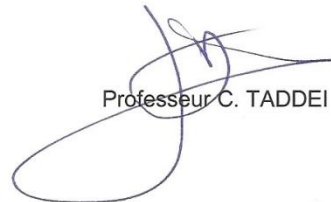
Strasbourg, le : 20.02.2015
Le Président du Jury,



Professeur M-C. MANIERE

VU

Strasbourg, le : 12 MARS 2015
Le Doyen de la Faculté
de Chirurgie Dentaire de Strasbourg,



Professeur C. TADDEI

Bibliographies

- Aquire A, Levine MJ, Cohen RE, Tabak LA. Immunochemical quantitation of alpha-amylase and secretory IgA in parotid saliva from people of various ages. *Arch Oral Biol.* 1987; 32: 297-301.
- Amerongen AV, Veerman EC. Saliva: the defender of the oral cavity. *Oral Dis.* 2002; 8:12-22.
- Andres E, Dimarcq JL. Cationic antimicrobial peptides: from innate immunity study to drug development. *Med Mal Infect.* 2006; 37: 194-9.
- Baker EN. Lactoferrin. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62: 2529-30.
- Banks P, Helle K. The release of protein from stimulated adrenal medulla. *Biochem J.* 1965; 97: 40C-41C.
- Brändén CI, Tooze J. Introduction à la structure des protéines. De Boeck Université. 1996; 75-150.
- Beeley J. Basic proline rich proteins: multifunctional defence molecules?. *Oral Dis.* 2001; 7: 69-70.
- Bennick A. Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13: 184-96.
- Briolat J, Wu SD, Mahata S.K, Gonthier B, Bognard D, Chassenet-Golaz S, Helle KB, Aunis D and Metz-Boutigue M.H. New antimicrobial activity for the catecholamine release inhibitory peptide activity from chromogranin A. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62: 377-385
- Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005; 3: 238-50.
- Brogden KA, Ackermann M et al. Antimicrobial peptides in animals and their role in Host defences. *Int J Antimicrob Agents.* 2003 ; 22 : 465-78.
- Bulet P, Stocklin R et al. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *ImmunolRev.* 2004 ; 198 : 169-84.
- Dawes C. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *J Am Dent Assoc.* 2008; 139: 18-24.
- De Smet K, Contreras R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and Histatins. *Biotechnol Lett.* 2005; 27:1337-47.
- Diamond G, Beckloff N et al. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr Pharm Des.* 2009; 15: 2377-92.

Dimarcq JL, Bulet P et al. Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Bio polymers*. 1998; 47: 465-77.

Gasnier C, Lugardon K, Ruth O, Strub JM, Aunis D, Metz-Boutigue MH. Characterization and location of post-translational modifications on chromogranin B from bovine adrenal medullary chromaffin granules. *Protéomics*. 2004; 4: 1789-801.

Goebel C, Mackay L, Vickers E, Mather L. Determination of defensin HNP-1, HNP-2 and HNP-3 in human saliva by using LC/MS. *Peptides*. 2000; 21:757-65.

Goobes G, Goobes R, Schueler-Furman O, Baker D, Stayton PS, Drobny GP. Folding of the C-terminal bacterial binding domain in statherin upon adsorption onto hydroxyapatite crystals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 16083-8.

Gottler LM, Ramamoorthy A. Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan--a highly potent antimicrobial peptide designed from magainin. *Biochim Biophys Acta*. 2009 ; 1788 : 1680-6.

Gray H. *Anatomy of the human body*. 1918

Guani-Guerra E, Santos-Mendoza T et al. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol*. 2010; 135: 1-11.

Hancock RE, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol*. 2006; 24: 1551-7.

Helle KB. Regulatory Peptides from Chromogranin A and Secretogranin II. *Cell Mol Neurobiol*. 2010; 30: 1145-1146.

Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 14637-42

Henskens YM, Veerman EC, Mantel MS, Van Der Velden U, Nieuw Amerongen AV. Cystatins S and C in human whole saliva and in glandular salivas in periodontal health and disease. *J Dent Res*. 1994; 73: 1606-14.

Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*. 2001; 85: 162-9.

Jenssen H, Hamill P et al. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19: 491-511.

Johnson DA, Yeh CK, Dodds MW. Effect of donor age on the concentrations of histatins in human parotid and submandibular / sublingual saliva. *Arch Oral Biol*. 2000; 45: 731-40

Koletzko B, Baker S, Cleghorn G, Fagundes U, Gopalan S, Hernell O, Hock QS, Jirapinyo P, Lonnerdal B, Pencharz P, Pzyrembel H, Ramirez-Mayans J, Sihamir R, Turck D, Yamashiro Y, Zhong-Yi D. Global Standard for the Composition of Infant Formula : Recommendations

of an ESPGHAN Coordinated International Expert Group. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2006; 41 : 584-599.

Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol*. 2009; 30: 131-41.

Lehrer RI, Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol*. 1999; 11: 23-7.

Lugardon K, Raffner L, 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; 275: 10745-53

Lugardon K, Chasserot-Golaz SA, Kieffer E, Maget-Dana R, Nullas G, Kieffer B, Aunis D and Metz-Boutigue M.H. Structural and biological characterization of chromofungin, the antifungal chromogranin A-(47-66) derived peptide. *J Biol Chem*. 2001; 276: 35875-82

MacKay BJ, Denepitiya L, Iacono VJ, Krost SB, Pollock J. *Infect. Immun*. 1984; 44: 695-701

Mahata SK, Mahata M, Fung MM, O'Connor DT. Catestatin, a multifunctional peptide from chromogranin A. *Regul Pept*. 1999; 162: 33-43

Mandel ID. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *J Am Dent Assoc*. 1989; 119: 298-304.

Mathews M, Peng Jia H, Guthmiller J, Losh G, Graham S, Johnson G, Tack B, McCray P. Production of β -Defensin Antimicrobial Peptides by the Oral Mucosa and Salivary Glands. *Infection and immunity*. 2002; 2740-2745

Mese H, Matsuo R. Salivary secretion, taste and hyposalivation. *J Oral Rehabil*. 2007; 34: 711-23.

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; 217 : 245-257

Metz-Boutigue MH, Goumon Y, Lugardon K, Strub JM, Aunis D. Antibacterial peptides are present in chromaffin cell secretory granules. *Cell Mol Neurobiol*. 1998; 18: 249-266

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; 192: 309-324

Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Bio technol*. 2011; 29: 464-472

Obayashi K. Salivary mental stress proteins. *Clin Chim Acta*. 2013; 425: 196-201

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*. *Biol. Chem. J*. 1988; 263: 7472-7477.

- Pauling L, Corey RB et al. The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1951; 37: 205-11.
- Romeo D, Skerlavaj B et al. Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. *J Biol Chem*. 1988; 263: 9573-5.
- Salle B. L'alimentation du nouveau-né et du nourrisson. *Bull Acad Natle Med*. 2009 ; 193 : 431-446
- Sanderson JM. Peptid-lipid interactions : insights and perspectives. *Org Biomol Chem*. 2005; 3: 201-212.
- Scannapieco FA. Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1994; 5: 203-48.
- Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol*. 2005; 6: 551-7.
- Stevens E, Patrick T, Pickler R. A History of infant feeding, *The Journal of Perinatal Education*. 2009; 18: 32–39
- 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 let*. 1996; 379: 273-8.
- Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*. 2002; 417
- Tsai H, Bobek LA. Human Salivary Histatins : Promising Anti-Fungal Therapeutic Agents. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998; 9: 480-497
- Van Abel RJ, Tang YQ et al. Synthesis and characterization of indolicidin, a tryptophan-rich antimicrobial peptide from bovine neutrophils. *Int J Pept Protein Res*. 1995 ; 45 : 401-9.
- White SH, Wimley WC, Selsted ME. Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr Opin Struct Biol*. 1995; 5: 521-7
- Yang L, Harroun TA et al. Barrel-stave model or toroidal model A case study on melittin pores. *Biophys J*. 2001; 81: 1475-85.
- Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev*. 2003; 55: 27-55.
- Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J Leukoc Biol*. 2004; 75: 39-48.
- Zaslloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84: 5449-53.
- Zhang D, Shooshtarizadeh P, Laventie BJ, Colin DA, Chirch JF, Vidic J, De Barry J, Chasserot-Golaz S, Delalande F, Van Dorsselaer A, Schneider F, Helle K, Aunis D, Prevost G,

Metz-Boutigue MH. Two chromogranin a-derived peptides induce calcium entry in human neutrophils by calmodulin-regulated calcium independent phospholipase. A2, PLoS One. 2009; 4: e4501

006/141/CE DE LA COMMISSION du 22 décembre 2006 concernant les préparations pour nourrissons et les préparations de suite et modifiant la directive 1999/21/CE

Thèse de Ménonvé Mègnissé Atindehou. 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*. 2012

AFPA, Association Française de Pédiatrie Ambulatoire. Législation des aliments diététiques pour nourrissons, <http://www.laits.fr/Legislation.php>, consulté le 12 Décembre 2014

Bocquet A, Les Jta, Laits infantiles : Rationalité du choix diététique pour un nouveau-né à terme ou un nourrisson, http://www.lesjta.com/article.php?ar_id=1155, consulté le 15 Décembre 2014

Légifrance, le service public de la diffusion du droit. Arrêté du 11 avril 2008 relatif aux préparations pour nourrissons et aux préparations de suite et modifiant l'arrêté du 20 septembre 2000 relatif aux aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciale): <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000018685743>, consulté le 5 Janvier 2015

www.uniprot.org/uniprot/P10645, consulté le 26 Octobre 2014

www.ifr88.cnrs-mrs.fr/proteomique/IMG/jpg/Couplage.jpg, consulté le 10 Novembre 2014

www.ifr88.cnrs-mrs.fr/proteomique/IMG/jpg/Clivage.jpg, consulté le 10 Novembre 2014

<http://www.imm.cnrs.fr/proteomique/IMG/jpg/Conversion.jpg>, consulté le 10 Novembre 2014

<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>, consulté le 12 Décembre 2014

NEUROHR (Sarah) – Incidence de l’allaitement par du lait infantile sur la caractérisation des peptides antimicrobiens dans la salive du nourrisson / par Sarah NEUROHR – 2015- 86f : ill.

(Thèse : 3^{ème} cycle Sci. odontol. : Strasbourg : 2015 ; 14) N°43

Rubrique de classement : Odontologie Pédiatrique

Mots clés : Lait infantile

Salive

Peptide antimicrobien

NEUROHR (Sarah) – Incidence de l’allaitement par du lait infantile sur la caractérisation des peptides antimicrobiens dans la salive du nourrisson. (Thèse : 3^{ème} cycle Sci. odontol. : Strasbourg : 2015 ; N°14) N°43.22.15.14

De nos jours, l’allaitement est encouragé et promu. Le lait maternel est considéré comme le meilleur lait pour la croissance et le développement de l’enfant. Il protégerait mieux les enfants grâce à ses propriétés nutritionnelles et immunologiques. Dans les cas d’impossibilité pour la mère de nourrir son enfant, il serait intéressant de voir ce qu’il en est des laits infantiles. L’Organisation Mondiale de la Santé, recommande l’allaitement exclusif jusqu’à l’âge de 6 mois, période du sevrage. Dans cette étude, nous nous intéresserons aux peptides antimicrobiens présents dans le lait infantile et dans la salive des nourrissons ainsi que leurs rôles dans le développement des défenses immunitaires du nourrisson.

Ces peptides antimicrobiens naturels sont actifs contre un large spectre de micro-organismes (bactéries, levures, champignons) et sont capables de stimuler la production d’anticorps. Nos prélèvements salivaires seront réalisés à l’aide de micropipettes sur un échantillon d’une dizaine d’enfants nourris avec du lait infantile, et ce à des âges échelonnés entre la naissance et 6 mois. L’étude de l’évolution des peptides antimicrobiens en fonction de la durée de l’allaitement pourrait nous renseigner sur l’acquisition du bagage immunitaire du jeune enfant.

Les enfants suivis seront recrutés préférentiellement auprès de pédiatres ou de centres obstétricaux. Ces résultats seront mis en comparaison avec ceux issus de l’étude sur le lait maternel et nous permettront de voir l’origine du lait le plus bénéfique pour la production des agents antimicrobiens.

Me SH : Infant formula

Saliva

Antimicrobial peptid

JURY :

Président : Madame le Professeur MANIERE Marie-Cécile

Assesseurs : Monsieur le Docteur OBRY Frédéric

Monsieur le Docteur Huck Olivier

Madame le Docteur METZ-BOUTIGUE Marie-Hélène

ADRESSE DE L’AUTEUR :

S.NEUROHR, 9 rue des dentelles, 67000 STRASBOURG

