



**Université de Montréal**

Activité antimicrobienne de peptides provenant d'hydrolysats de  
protéines de babeurre, de lactoferrine et de pois

Par CATHERINE JEAN

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire en vue de

l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

en sciences vétérinaires option hygiène vétérinaire et innocuité des aliments

Août 2015

© Catherine Jean, 2015

## RÉSUMÉ

Les antibiotiques sont fréquemment utilisés dans l'alimentation de la volaille afin de prévenir certaines maladies, dont l'entérite nécrotique, ce qui occasionne l'émergence de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques. Une alternative prometteuse est l'utilisation de peptides antimicrobiens (AMPs) comme suppléments alimentaires, tels les AMPs provenant des produits laitiers. L'objectif du projet était de développer une méthode de production d'extraits peptidiques à partir de coproduits de la transformation alimentaire (babeurre, lactoferrine, isolat de protéines de pois), afin de tester si ces extraits peptidiques possédaient une activité antimicrobienne sur les pathogènes spécifiques aviaires suivants : *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Les protéines ont été mises en suspension dans l'eau (5% p/p) et hydrolysées par la pepsine, 6 heures, pH de 2.5. Les peptides furent récupérés par ultrafiltration (< 10 kDa), puis fractionnés selon leur charge nette : totaux, cationiques, anioniques et non liés. L'effet antimicrobien a été évalué sur microplaques, par la survie bactérienne en présence de concentrations croissantes d'extraits peptidiques. Les extraits cationiques de babeurre ont démontré une efficacité à une concentration inférieure ou égale à 5 mg/mL; perte de 3 log pour *Escherichia coli* O78 :H80. En comparaison, la lactoferrine cationique a été efficace à une concentration inférieure ou égale à 0.6 mg/mL; perte de 6 log pour *E. coli* O78 :H80. Les extraits peptidiques du pois ont démontré une efficacité faible. Cette méthode s'avère prometteuse pour le développement d'une alternative ou d'un complément pour la réduction de l'utilisation des antibiotiques dans l'alimentation de la volaille.

**Mots clés :** Peptide antimicrobien, babeurre, lactoferrine, pois, pathogènes aviaires, chromatographie par adsorption sur membrane, charge ionique.

## ABSTRACT

Antibiotics are frequently used in poultry feed in order to prevent certain diseases, including necrotic enteritis, which causes the emergence of bacterial strains resistant to antibiotics. A promising alternative is the use of antimicrobial peptides (AMPs) as dietary supplements, such as AMPs from dairy products. The objective of this project was to develop a production method for the extraction peptides, from co-produced food processing (buttermilk, lactoferrin, pea protein isolates). These peptides were tested for the detection of antimicrobial activity on the following specific poultry pathogens; *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Proteins were suspended in water (5% w/w) and pepsin hydrolyzed by pepsin for 6 hours at pH 2.5. Peptides were recovered by ultrafiltration (< 10 kDa) and fractionated based on the basis of their ionic charges: total, cationic, anionic and unbound peptides, to specifically target the fractions with antimicrobial activities. Bacterial survival was measured in contact with different peptides concentrations. Cationic buttermilk extracts were effective at a concentration less or equal to 5 mg / mL; loss of 3 log for *Escherichia coli* O78: H80, compared with lactoferrin which was effective at a concentration less than or equal to 0.6 mg / mL; loss of 6 log for *E. coli* O78: H80. The peptide extracts from pea showed low efficiency. The use of antimicrobial peptides, from buttermilk, lactoferrin and peas, is promising for the development of an alternative or a complement to reduce antimicrobial use.

**Key words:** Antimicrobial peptide, buttermilk, lactoferrin, pea, avian pathogens, absorptive membrane chromatography, ionic charge.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	ii
ABSTRACT.....	iii
TABLE DES MATIÈRES .....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES .....	x
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	xi
REMERCIEMENTS.....	xiv
INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE 1 : RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	3
1 Phénomène de l'Antibiorésistance .....	3
1.1 Phénomène de l'antibiorésistance: Acquisition de l'antibiorésistance .....	3
1.2 Classification des antibiotiques.....	4
1.3 Utilisation des Antibiotiques pour l'élevage de poulets de chair au Canada .....	5
1.4 Loi sur l'utilisation des antibiotiques au Canada et au Québec .....	7
1.5 Impact de l'utilisation des antibiotiques en agriculture sur le phénomène de l'antibiorésistance.....	8
1.5.1 Pratiques d'élevage.....	9
1.6 Impacts de l'arrêt de l'administration d'antibiotiques en préventif en Europe..	10
2 Alternatives à l'utilisation des antibiotiques comme préventif .....	11
2.1 Les probiotiques .....	11
2.2 Les huiles essentielles .....	14
2.2.1 L'utilisation des huiles essentielles dans l'alimentation de la volaille .....	14
2.3 Vaccination.....	15
2.4 Bactériophages .....	16
2.4.1 Cycle de vie des bactériophages .....	17
3 Peptides Antimicrobiens.....	18
3.1 Sources .....	18
3.2 Mécanismes d'action au niveau de la membrane plasmique et de la paroi cellulaire.....	20
3.3 Mode de défense des bactéries et acquisition d'une résistance aux peptides antimicrobiens.....	23
4 Peptides antimicrobiens alimentaires- Différentes sources .....	25
4.1 Produits laitiers.....	25

4.2	Lactoferrine .....	30
4.2.1	Caractérisation et provenance .....	30
4.2.2	Activités connexes - Appui au système immunitaire.....	30
4.2.3	Lactoferricine .....	31
4.3	Babeurre .....	34
4.3.1	Propriétés biologiques des MFGM .....	36
4.4	Origine végétale .....	37
4.4.1	Pois.....	37
4.4.2	Défensine .....	38
4.5	Production des peptides antimicrobiens.....	39
4.6	Derniers développements dans l'utilisation des peptides antimicrobiens .....	39
4.7	Limites de l'utilisation des peptides antimicrobiens .....	40
5	Applications industrielles des peptides antimicrobiens en alimentation humaine et animale.....	41
5.1	Lactoferrine .....	41
5.2	Nisine .....	41
	OBJECTIFS .....	42
	CHAPITRE 2: ARTICLE.....	43
	INTERPRETIVE SUMMARY.....	43
	ABSTRACT.....	44
	KEY WORDS.....	45
	INTRODUCTION .....	45
	MATERIALS AND METHODS.....	47
	<i>Peptide extracts production</i> .....	47
	<i>Peptides fractionation</i> .....	48
	<i>RP-HPLC</i> .....	49
	<i>SEC-HPLC</i> .....	49
	<i>Bacterial strains</i> .....	49
	<i>Microbiological Assay</i> .....	50
	<i>Statistical analyses</i> .....	50
	RESULTS .....	51
	<i>Peptides production</i> .....	51
	<i>Buttermilk peptide extracts</i> .....	51
	<i>Lactoferrin peptide extracts</i> .....	52
	DISCUSSION .....	54

CONCLUSION.....	57
ACKNOWLEDGEMENTS.....	58
REFERENCES.....	58
CHAPITRE 3: DISCUSSION GÉNÉRALE.....	68
1 Peptides antimicrobiens.....	68
1.1 Production et extraction des extraits peptidiques totaux.....	68
1.2 Fractionnement et préparation des extraits peptidiques.....	68
1.3 Rendement du fractionnement des peptides.....	69
1.4 Cinétique d'hydrolyse.....	70
1.4.1 Babeurre.....	70
1.4.2 Lactoferrine.....	71
1.4.3 Pois.....	71
1.5 Analyses des profils HPLC.....	72
1.5.1 Babeurre.....	72
1.5.2 Lactoferrine.....	73
1.5.3 Pois.....	74
1.6 Chromatographie d'exclusion stérique (SEC-HPLC).....	74
2 Effet antimicrobien.....	75
2.1 Babeurre.....	75
2.2 Pois.....	75
2.3 Lactoferricine.....	76
SUITE DU PROJET.....	78
CONCLUSION.....	79
RÉFÉRENCES.....	xv
1- Livres.....	xv
2- Sites internet.....	xv
3- Articles scientifiques.....	xv
ANNEXE 1 : Production des peptides.....	xxvi
ANNEXE 2 : Résultats de la mesure de la cinétique d'hydrolyse par la pepsine pour les peptides de lactoferrine, babeurre et pois.....	xxvii
ANNEXE 3 : Profils RP-HPLC des peptides de babeurre, lactoferrine et pois.....	xxix
ANNEXE 4 : Chromatographie d'exclusion stérique (SEC-HPLC).....	xxxii
ANNEXE 5 : Effet des peptides antimicrobiens provenant du babeurre.....	xxxii
ANNEXE 6 : Effet des peptides antimicrobiens provenant de la lactoferricine.....	xxxvi
ANNEXE 7 : Effet antimicrobien des peptides provenant du pois.....	xxxvii

ANNEXE 8 : Effet antimicrobien des peptides provenant de la lactoferrine .....	xxxviii
ANNEXE 9 : Analyses statistiques.....	xl

## LISTE DES TABLEAUX

### Chapitre 1 : Recension de la littérature :

<b>Tableau I :</b> Classification des principaux antibiotiques utilisés en aviculture (Gaucher et Brodeur, AQINAC, 2013).....	5
<b>Tableau II :</b> Résumé des différents groupes de peptides en fonction de leur composition en acides aminés et de leur structure tridimensionnelle.....	20
<b>Tableau III:</b> Peptides antimicrobiens dérivés de la caséine, relargués en fonction de différentes protéases digestives ainsi que leurs propriétés (Benkerroum 2010).....	28
<b>Table 1:</b> Estimated bacterial survival (log CFU/mL) of five strains, in contact with increasing concentrations of cationic buttermilk peptide extracts.....	63
<b>Table 2:</b> Estimated bacterial survival (log CFU/mL) of five strains, in contact with increasing concentrations of total buttermilk peptide extracts. ....	64
<b>Table 3:</b> Estimated bacterial survival (log CFU/mL) of five strains, in contact with increasing concentrations of cationic lactoferrin peptide extracts.....	65
<b>Table 4:</b> Estimated bacterial survival (log CFU/mL) of five strains, in contact with increasing concentrations of total lactoferrinpeptide extracts. ....	66
<b>Tableau IV :</b> Pourcentage de rendement des différents types de peptides lors du fractionnement par colonnes échangeuses d'ions par rapport aux extraits peptidiques totaux.....	xxvi
<b>Tableau V :</b> Cinétique d'hydrolyse (%) du babeurre par la pepsine, pour 6 productions différentes de peptides. ....	xxvii
<b>Tableau VI:</b> Cinétique d'hydrolyse (%) pour la lactoferrine par la pepsine, sur 3 productions différentes.....	xxvii
<b>Tableau VII :</b> Cinétique d'hydrolyse (%) du pois par la pepsine, pour 2 productions différentes. ....	xxviii
<b>Tableau VIII :</b> Survie et perte bactériennes causées par les peptides totaux de babeurre, sur 5 souches de bactéries pathogènes aviaires.....	xxxii
<b>Tableau IX :</b> Survie et perte bactériennes causées par les peptides cationiques de babeurre, sur 5 souches de bactéries pathogènes aviaires.....	xxxiii

<b>Tableau X:</b> Survie bactérienne causée par les peptides anioniques de babeurre, sur 5 souches de bactéries pathogènes aviaires. ....	xxxiv
<b>Tableau XI:</b> Survie bactérienne causée par les peptides non liés de babeurre, sur 5 souches de bactéries pathogènes aviaires. ....	xxxv
<b>Tableau XII :</b> Survie et perte bactériennes causées par la lactoferrine commerciale, sur 5 souches de bactéries pathogènes aviaires. ....	xxxvi
<b>Tableau XIII:</b> Effet des peptides de pois, production 34, sur <i>E. coli</i> O78 :H80 (n=2) .....	xxxvii
<b>Tableau XIV :</b> Effet des peptides de pois, production 34, sur <i>Salmonella</i> Enteritidis (n=1).....	xxxvii
<b>Tableau XV :</b> Survie et perte bactériennes causées par les peptides totaux de lactoferrine, sur 5 souches de bactéries pathogènes aviaires.....	xxxviii
<b>Tableau XVI :</b> Survie et perte bactériennes causées par les peptides cationiques de lactoferrine, sur 5 souches de bactéries pathogènes aviaires. ....	xxxix
<b>Tableau XVII :</b> Valeurs de P provenant des ANOVA ajustées avec la méthode de Benjamini-Hochberg pour les extraits peptidiques de la lactoferrine.....	xl
<b>Tableau XVIII :</b> Valeurs de P provenant des ANOVA ajustées avec la méthode de Benjamini-Hochberg pour les extraits peptidiques de la lactoferrine.....	xli
<b>Tableau XIX :</b> Valeurs de P provenant des ANOVA ajustées avec la méthode de Benjamini-Hochberg pour les extraits peptidiques du babeurre.....	xlii
<b>Tableau XIX :</b> Valeurs de P provenant des ANOVA ajustées avec la méthode de Benjamini-Hochberg pour les extraits peptidiques du babeurre (suite).....	xliii

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Étapes de la stimulation du système immunitaire de l'hôte par les probiotiques (Kaur, Kuhad et al. 2009). .....	13
<b>Figure 2</b> : Différents modèles des mécanismes d'actions des peptides antimicrobiens sur la membrane lipidique d'une cellule bactérienne. A. Modèle de la douve du tonneau. B. Modèle de formation de micelles. C. Modèle des pores toroïdaux. En bleu on retrouve les régions hydrophobes et en rouge les régions hydrophiles. Figure tirée de Brogden (2005). .....	22
<b>Figure 3</b> : Structure tridimensionnelle de la lactoferrine B. Les sections bleues représentent des feuillets bêta, les sections rouges et oranges représentent des hélices alpha et la section verte montre la lactoferricine B. Figure tirée de Gifford, Hunter et al. (2005).....	31
<b>Figure 4</b> : Structure d'un globule de gras et l'arrangement des principales protéines des MFGM (Dewettinck, Rombaut et al. 2008).....	36
<b>Figure 1</b> : RP-HPLC profile (C <sub>18</sub> ) from buttermilk peptide extracts. ....	67
<b>Figure 2</b> : RP-HPLC profile (C <sub>18</sub> ) from lactoferrin peptide extracts. ....	67
<b>Figure 5</b> : Profils chromatographiques au RP-HPLC (colonne C <sub>18</sub> ) des échantillons de babeurre A) Total B) Cationique C) Anionique D) Peptides non liés. ....	xxix
<b>Figure 6</b> : Profils chromatographiques au RP-HPLC (colonne C <sub>18</sub> ) des échantillons de lactoferrine production 34. A) Total B) Cationique.....	xxix
<b>Figure 7</b> : Profils chromatographiques au RP-HPLC (colonne C <sub>18</sub> ) des échantillons de Pois. A) Total B) Cationique C) Anionique D) Peptides non liés. ....	xxx
<b>Figure 8</b> : SEC-HPLC des échantillons de babeurre, pois et lactoferrine. ....	xxxi

## LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

ADPH : Adipophiline

AFC : Facteur de croissance

BTN : Butyrophiline

CA : Conversion alimentaire

DO: Densité optique

EC : Exclusion compétitive

*E. coli* : *Escherichia coli*

FDA: US Food and Drug Administration

GAG : Glycosaminoglycane

GMQ : Gain moyen quotidien

HACCP : *Hazard Analysis and Critical Control Point*, Analyse des risques et maîtrise des points critiques

HE : Huile essentielle

HS : Héparine sulfate

IC : Indice de consommation

IgA : Immunoglobuline A

IgE : Immunoglobuline E

IgG : Immunoglobuline G

IgM : Immunoglobuline M

IL-2 : Interleukine-2

IL-12 : Interleukine-12

INF-  $\gamma$  : Interféron-gamma

kDa : Kilodalton

Lf : Lactoferrine

LPS : Lipopolysaccharide

MFGM : Membrane de globule de gras du lait

MprF : *Membrane protein multiple peptide resistance factor*

MUC1 : Mucine 1

NK : *Natural killer*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PASIII : Acide périodique Shift III

PAS 6/7 : Lactadhérine

pI : Point isoélectrique

PMN : Leukocytes polymorphonucléaires

PP3 : Peptone protéose 3

Rpm: Rotation par minute

*S. aureus* : *Staphylococcus aureus*

*S. Enteritidis* : *Salmonella* Enteritidis

*S. Typhimurium* : *Salmonella* Typhimurium

Th-2 : Lymphocyte T auxiliaire 2

TNF : Facteur de nécrose tumoral

UFC : Unités formant des colonies

WTAs : *Wall teichoic acids*

XDH/XO : Protéine oxydase xanthine

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier ma directrice de maîtrise Martine Boulianne pour ses bons conseils et son soutien durant les deux dernières années. Merci pour ta patience et toutes les connaissances sur la volaille que tu m'as apprises, ainsi que pour la chance d'avoir présenté une affiche au congrès de l'AVMA, à Boston.

Merci également au Centre de recherche et de développement sur les Aliments (CRDA) de m'avoir permis de travailler dans les laboratoires et d'utiliser tous les appareils et le matériel nécessaire à l'accomplissement de ma maîtrise. Merci à tout le personnel, qui ont travaillé de loin ou de près sur la réussite de ce projet, Gilles Robitaille, Claude Champagne, Yves Raymond et Marie-Josée Lemay.

J'aimerais remercier tout spécialement Sonia Lafleur, assistante de recherche au CRDA, qui m'a épaulé durant ces deux années de maîtrise. Merci pour tes conseils, ton soutien, ta patience, ta compréhension. Merci pour tout.

Merci à ma famille, Michel, Claire et Anne-Marie pour vos encouragements. Merci à Mélanie pour ses conseils pour les analyses statistiques.

Merci à Brian et Scott pour leur écoute à tous les soirs et leurs encouragements à persévérer. Merci de m'avoir changé les idées et d'être toujours présent pour moi!

## **INTRODUCTION**

Les antibiotiques sont utilisés autant chez les humains que chez les animaux dans le but de prévenir, traiter et guérir des maladies causées par les bactéries. Des mesures de biosécurité et de prévention ainsi que des bonnes pratiques dans les fermes d'élevage permettent souvent de prévenir ces maladies. Dans certains cas, l'utilisation des antibiotiques est nécessaire contre l'infection bactérienne (MAPAQ, 2014). Par contre, certaines bactéries peuvent devenir résistantes suite à une exposition prolongée à un antibiotique donné. Plus une bactérie est multi résistante, plus le traitement curatif est complexe, car les antibiotiques efficaces pouvant être utilisés sont de plus en plus limités. Plusieurs conséquences sont visibles : un plus grand risque de propagation de la bactérie, des maladies d'une plus grande durée, une augmentation de la douleur ainsi qu'un risque de mortalité plus élevé. Le coût des traitements est aussi plus élevé (MAPAQ, 2014). L'ajout systématique d'antibiotiques dans la nourriture des animaux d'élevage est une pratique courante, qui comporte plusieurs points bénéfiques dont l'augmentation de la vitesse de croissance (Corpet, 2000).

Certains pays ont complètement banni l'utilisation des antibiotiques comme promoteurs de croissance afin de limiter les problèmes d'antibiorésistance et les problèmes de santé qui en découlent. C'est le cas des pays européens, où il est maintenant interdit d'administrer des antibiotiques comme promoteurs de croissance aux animaux d'élevage. (Corpet, 2000). De plus, il est prévisible que les normes concernant l'utilisation des antibiotiques chez les animaux de consommation changent au Canada à cause de la pression mise par les consommateurs, qui désirent des aliments produits sans antibiotiques pour une raison de santé. Les normes seront plus restrictives et il faudra assurément trouver une solution alternative afin de réduire les coûts y étant associés. Il est donc important de connaître et de développer des solutions alternatives.

Plusieurs alternatives sont proposées comme l'utilisation de probiotiques (Kaur, Kuhad et al. 2009, Gaggia, Mattarelli et al. 2010, Waewdee, Sukon et al. 2012), les huiles essentielles (Brenes and Roura 2010, Tiisonen, Kettunen et al. 2010, Alleman, Gabriel et al. 2013), la vaccination (Dahiya, Wilkie et al. 2006), la thérapie par les phages

(Atterbury 2007, Wong, Sieo et al. 2014) et finalement l'utilisation de peptides antimicrobiens (Joerger 2003).

Les peptides antimicrobiens sont retrouvés dans la majorité des organismes vivants incluant les bactéries (bactériocines), les levures et moisissures, les plantes (thionines), les insectes, les oiseaux, les arthropodes et les mammifères (Hancock and Chapple 1999). Un exemple de peptides antimicrobiens retrouvés chez la volaille est la gallinacine, présente dans les leucocytes (Harwig, Swiderek et al. 1994). Les AMPs sont retrouvés naturellement encryptés à l'intérieur de certaines protéines et sont activés par la protéolyse. Ils peuvent également être produits suite à la digestion gastro-intestinale ou la fermentation. Les produits laitiers ainsi que les protéines végétales sont également une source intéressante et prometteuse de peptides antimicrobiens.

Ce projet vise le développement d'une approche alternative à l'utilisation d'antibiotiques en élevage aviaire par le développement d'une méthode de production de peptides utilisant la chromatographie d'adsorption sur membrane. Les peptides produits furent fractionnés en fonction de leurs charges ioniques. L'utilisation de co-produits de la transformation alimentaire, tels le babeurre, la lactoferrine et les isolats de protéines de pois, a été favorisée. Les peptides de différentes charges ont été testés sur différentes souches de bactéries pathogènes : *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

# CHAPITRE 1 : RECENSION DE LA LITTÉRATURE

## 1 Phénomène de l'Antibiorésistance

### 1.1 Phénomène de l'antibiorésistance: Acquisition de l'antibiorésistance

Depuis plusieurs décennies, la résistance aux antimicrobiens est un problème qui ne cesse de croître (OMS, 2014). Cette complication est majeure dans le domaine de la santé et est présente partout à travers le monde. Celui-ci est considéré par des organisations mondiales comme étant un des plus grands défis en santé durant le 21<sup>ème</sup> siècle (Marshall and Levy 2011). Lors de la découverte de la pénicilline, Alexander Fleming avait évoqué la possibilité du développement d'une résistance par les bactéries à long terme (OMS, 2014). L'apparition de cette résistance est un phénomène normal dans l'évolution d'une bactérie. Elle est par contre accélérée par la pression sélective causée par l'utilisation très répandue des antimicrobiens (OMS, 2014). En effet, l'utilisation abusive et inappropriée des antibiotiques en médecine humaine est possiblement une des principales causes de l'apparition de l'antibiorésistance (Marshall and Levy 2011). Le traitement d'infections provoquées par des virus, bactéries, parasites et champignons est plus complexe à cause d'une diminution de l'efficacité des antiviraux, antibactériens, antiparasitaires et antifongiques. Ce phénomène rend le traitement des patients plus difficile, ou même impossible et occasionne des coûts de traitement plus élevés (OMS, 2014). Les impacts économiques ne sont pas connus précisément pour le moment, seules des estimations sont disponibles. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a prévu une baisse du produit intérieur brut de 0,4% à 1,6%, ce qui se traduirait par des milliards de dollars à l'échelle planétaire, causée par les coûts occasionnés des traitements et des séjours plus longs dans les hôpitaux (OMS, 2014).

Les bactéries utilisent plusieurs moyens pour acquérir une résistance aux différents antibiotiques. Le premier mécanisme décrit dans la littérature consiste en l'accumulation de mutations dans les protéines ou les enzymes ciblés par les antibiotiques. Ce type de résistance est facilement transférable à d'autres cellules par le transfert de plasmides (Nikaido 2009). Le second mécanisme consiste à l'inhibition des antibiotiques par une inactivation enzymatique. De nombreux mécanismes peuvent être utilisés par les

bactéries, dont la phosphorylation, l'acétylation et l'adénylation, et l'hydrolyse de l'antibiotique (Nikaido 2009). L'acquisition de la résistance se fait par l'accumulation de gènes de résistance à des antibiotiques. Ces gènes se retrouvent principalement dans les plasmides (Nikaido 2009). Il existe plusieurs sources naturelles de provenance des gènes de résistance. Par exemple, certains gènes causant la résistance aux aminoglycosides et à la vancomycines seraient dérivés de *Streptomyces*, qui produisent ces antibiotiques naturellement (Nikaido 2009). *Streptomyces* est une bactérie Gram-positif filamenteuse, qui vit dans des environnements variés comme le sol (de Lima Procópio, da Silva et al. 2012). En effet, 60 à 100 % des *Streptomyces* vivants dans le sol seraient résistants à plusieurs antibiotiques, ce qui permettrait de supposer qu'il y a présence de plusieurs antibiotiques, à de très faibles concentrations, dans leur environnement. Concernant, les bactéries Gram-négatives, elles utilisent des pompes à efflux qui permettent de pomper certains médicaments couramment utilisés à l'extérieur des cellules. Ce mécanisme est possible grâce à des gènes présents dans les chromosomes, qui sont facilement exprimables. *Staphylococcus aureus* possède des plasmides qui codent pour ce type de pompe (Nikaido 2009).

## 1.2 Classification des antibiotiques

Les antibiotiques sont généralement classés en fonction de leur importance en médecine humaine. Cette classification s'applique également aux antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire (Tableau 1). La catégorie I est composée des antibiotiques qui sont d'une très grande importance en médecine humaine. Ceux-ci sont utilisés pour le traitement d'infections graves. Il y a très peu ou aucune substance de remplacement en cas d'apparition d'une résistance. Les antibiotiques de la catégorie II, de grande importance, sont utilisés pour traiter des infections graves pour lesquelles il existe des traitements alternatifs. En cas de résistance aux antibiotiques de classe II, ceux de la classe I peuvent être utilisés. La catégorie III, d'importance moyenne, contient des antibiotiques servant à traiter des infections courantes, qui ne sont pas mortelles. Les bactéries résistantes qui ne peuvent être traitées par ces antibiotiques le sont avec ceux de catégorie I et II. Finalement, ceux dans la catégorie IV, d'importance faible, ne sont généralement pas utilisés en médecine humaine (Santé Canada, 2005).

**Tableau I :** Classification des principaux antibiotiques utilisés en aviculture (Gaucher et Brodeur, AQINAC, 2013).

<b>Catégorie I</b> (Très grande importance)	<b>Catégorie II</b> (Grande importance)	<b>Catégorie III</b> (Importance moyenne)	<b>Catégorie IV</b> (Importance faible)
- Ceftiofur - Enrofloxacin	- Virginiamycine - Apramycine - Lincomycine - Tylosine - Triméthoprim - Sulfadiazine - Pénicillines	- Bacitracine - Sulphonamides - Tétracyclines	- Ionophores (Coban <sup>TM</sup> , Monteban <sup>TM</sup> , Maxiban <sup>TM</sup> , Sacox <sup>TM</sup> ) - Avilamycine (Surmax <sup>TM</sup> )

### 1.3 Utilisation des Antibiotiques pour l'élevage de poulets de chair au Canada

La résistance aux antimicrobiens est un problème présent également chez les animaux d'élevage. Celle-ci est favorisée par de mauvaises pratiques, principalement par l'utilisation des petites doses d'antibiotiques administrées sur une longue période de temps dans la nourriture des animaux et ce, pour des raisons qui ne sont pas toujours médicales (Marshall and Levy 2011). L'usage des substances antimicrobiennes dans les élevages se classifie de trois façons : un usage thérapeutique, prophylactique ou à titre de facteur de croissance. L'usage thérapeutique a pour but de traiter une infection en cours à l'échelle d'un troupeau, même ceux ne présentant pas de signes cliniques. Le traitement prophylactique sert quant à lui à prévenir des infections avant que les premiers signes cliniques n'apparaissent.. Finalement, l'usage de substances antimicrobiennes comme facteur de croissance, afin de favoriser le gain de masse des animaux, est une autre forme d'utilisation des antibiotiques en production animale. Ainsi des antibiotiques sont administrés chez tous les animaux d'un lot ou d'un troupeau, à des doses sous-thérapeutiques à un âge précis pour de longues périodes (Chevalier, 2012). Cette pratique crée une pression de sélection idéale à la sélection de souches résistantes (Marshall and Levy 2011).

Des concentrations très faibles d'environ 20 ppm (5 à 100 g/t) sont employées, ce qui n'empêche pas leurs impacts positifs sur les animaux et négatifs entraînant le développement d'antibiorésistance (Corpet 2000). Les éleveurs les utilisent dans le but d'influencer le microbiote intestinal, par la présence d'une concentration stable d'antibiotique dans l'intestin des animaux. Lors de cette pratique, les antibiotiques ne sont pas utilisés pour des raisons médicales c'est-à-dire pour éliminer une bactérie ou un groupe de microorganismes spécifiques, mais plutôt pour augmenter les performances zootechniques des animaux (ex : meilleur ratio gain de poids en comparaison avec la quantité d'aliments ingérés) (Chevalier, 2012). En effet, ceux-ci sont utilisés en élevage dans le but d'augmenter la vitesse de croissance et la conversion alimentaire tout en diminuant la mortalité et la morbidité (Butaye, Devriese et al. 2003). Selon l'Institut national de la santé publique du Québec (Chevalier, 2012), la quantité d'antibiotiques utilisés comme facteur de croissance serait d'environ 24% en comparaison avec ceux destinés aux usages prophylactiques et curatifs. Ceci représenterait 5% du volume total des agents antimicrobiens administrés aux animaux d'élevage.

Les mécanismes d'action des promoteurs de croissance ne sont pas entièrement connus pour le moment (Lin, Hunkapiller et al. 2013). Quatre hypothèses furent émises par Butaye, Devriese et al. (2003). Premièrement, les promoteurs de croissance permettraient la protection des nutriments contre la destruction par les bactéries pathogènes. Ce mécanisme améliorerait la conversion alimentaire par l'augmentation de la disponibilité des nutriments et de l'énergie (Corpet, 2000). De plus, certains antibiotiques augmenteraient l'activité des enzymes digestifs, favorisant l'hydrolyse des glucides et des protéines chez les bovins (Corpet, 2000). Deuxièmement, l'adsorption des nutriments pourrait être favorisée, car les antibiotiques provoqueraient un amincissement de la barrière intestinale du petit intestin (Butaye, Devriese et al. 2003). Ainsi, les antibiotiques auraient comme effet l'augmentation de la surface d'adsorption intestinale, la diminution de l'épaisseur de la muqueuse et le ralentissement de la vitesse du transit intestinal (Corpet, 2000). Les modifications de l'épaisseur et de la surface de la muqueuse seraient causées par la diminution de la prolifération de la muqueuse. Le ralentissement du transit intestinal est provoqué par une diminution de la concentration de l'acide lactique dans le contenu intestinal (Corpet, 2000). Troisièmement, les antibiotiques utilisés comme

promoteurs de croissance pourraient causer la diminution de la production de toxine par les bactéries intestinales (Butaye, Devriese et al. 2003), comme l'ammoniaque et les amines (Corpet, 2000). La diminution de l'ammoniac dans l'intestin mènerait à une diminution de sa concentration dans le sang, causant une moindre dépense d'énergie puisque le foie détoxifie moins d'ammoniac en urée. Cela ralentirait le renouvellement de l'épithélium intestinal économisant ainsi les nutriments utilisés normalement pour la synthèse des protéines, des acides nucléiques et des lipides membranaires (Corpet, 2000). Finalement, il y aurait une diminution des infections intestinales cliniques (Butaye, Devriese et al. 2003) par le contrôle des bactéries pathogènes ciblées, dont *Clostridium perfringens*, responsable de l'entérite nécrotique chez le poulet de chair.

En résumé, les facteurs de croissance (AFC) utilisés chez les animaux d'élevage permettraient d'améliorer la vitesse de croissance par une amélioration du gain de poids moyen quotidien (GMQ) d'en moyenne 3 à 7 %. De plus, les antibiotiques amélioreraient l'efficacité alimentaire par une diminution de l'indice de consommation (IC) de 2 à 9 %. Par conséquent, moins d'aliments seraient nécessaires pour la production d'une quantité équivalente de viande (Corpet, 2000), ce qui est recherché par les éleveurs.

#### 1.4 Loi sur l'utilisation des antibiotiques au Canada et au Québec

Au Canada, l'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire est régie par la législation fédérale. Pour les prescriptions, la vente et la commercialisation, ce sont des lois provinciales qui les régissent (Chevalier, 2012). Au Québec, les pratiques divergent des autres provinces canadiennes. Contrairement au reste du pays, tous les antibiotiques utilisés au Québec doivent être prescrits par un médecin vétérinaire, incluant ceux utilisés comme promoteurs de croissance. À l'opposé, les producteurs des autres provinces peuvent se procurer plusieurs de ces antibiotiques sans ordonnance. Par contre, certains requièrent une prescription, comme par exemple l'enrofloxacin et le ceftiofur. Les entreprises fabriquant des aliments médicamenteux doivent inclure les additifs alimentaires en respectant les lois fédérales suivantes : la Loi sur les aliments et les drogues et la Loi relative aux aliments du bétail (Chevalier, 2012) en utilisant les dosages des produits listés dans le Recueil des notices sur les substances médicamenteuses.

### 1.5 Impact de l'utilisation des antibiotiques en agriculture sur le phénomène de l'antibiorésistance

L'utilisation des antibiotiques dans l'alimentation des animaux d'élevage est un sujet toujours controversé lorsque l'on parle de l'apparition de l'antibiorésistance. Cette apparition n'est pas toujours causée par de mauvais choix dans la médication, mais plutôt par la quantité d'animaux traités (Marshall and Levy 2011).

Le transfert de la résistance, des animaux aux humains s'effectue par deux voies : par voie directe, c'est-à-dire par le contact avec un animal infecté; ou encore par voie indirecte c'est-à-dire que la transmission peut avoir lieu via la nourriture, l'eau et l'épandage de déchets de nature animale dans les champs agricoles (Marshall and Levy 2011). L'acquisition de cette résistance est accélérée par le transfert horizontal, c'est-à-dire par le transfert des gènes chez les bactéries. La majorité de ces gènes de résistance sont retrouvés sur des éléments génétiques mobiles comme les plasmides, les transposons et les intégrons. Il existe, par exemple, un grand réservoir d'*Escherichia coli* (*E. coli*) d'origine animale, possédant dans leur génome, des gènes résistants à plusieurs antibiotiques. Ces gènes sont transférables à d'autres souches de bactérie qui peuvent infecter les humains (Diarra and Malouin 2014). Les gens travaillant sur des fermes ou dans des abattoirs sont plus à risque d'être contaminés par des bactéries résistantes. Ceux-ci deviennent alors des vecteurs de transmission de bactéries résistantes dans la communauté et dans l'environnement (Marshall and Levy 2011).

Selon Marshall et *al.* (2011), les consommateurs peuvent être exposés à des bactéries résistantes via la consommation de viande. Effectivement, on retrouve des bactéries résistantes à la surface de la nourriture, tout au long du processus de transformation. Des gènes de résistance aux antibiotiques identifiés dans des bactéries présentes sur la nourriture ont aussi été identifiés chez l'humain, indiquant une possible contamination par les aliments. Le gène de résistance *bla<sub>CMY</sub>* a été identifié à travers la chaîne de production dans des isolats de *Salmonella enteritica* du sérotype Newport présents autant chez les poulets que l'humain. Le plasmide code pour la résistance à plus de 9 antibiotiques et peut être transféré à *E.coli* par conjugaison. Puisque l'on retrouve une plus grande concentration du gène CMY-2 chez les animaux que chez les humains, il est

possible de supposer que ce gène serait d'origine animale (Zhao, Qaiyumi et al. 2003). Il est donc primordial de faire un suivi de la progression de la résistance en agriculture, afin de mettre en place de nouvelles réglementations dans le but de contrôler la progression.

#### 1.5.1 Pratiques d'élevage

En élevage avicole, différents antibiotiques sont utilisés dans le but de prévenir et de contrôler l'omphalite chez les poussins, les infections respiratoires ainsi que l'entérite nécrotique (Diarra and Malouin 2014). Cette dernière maladie est une des plus importantes chez la volaille élevée sans antibiotique. Causée par la bactérie *Clostridium perfringens*, elle est précipitée par d'autres facteurs de risque, telle la coccidiose, un parasite qui cause des dommages à la muqueuse et entraîne la mortalité (Miah et al., 2011).

L'utilisation judicieuse d'antibiotiques permet de mitiger les risques reliés au développement d'antibiorésistance. Au Québec, lorsqu'un animal est malade, il est obligatoire d'obtenir une ordonnance d'un médecin vétérinaire pour l'obtention et l'administration d'antibiotiques. Quatre règles doivent être suivies par les propriétaires d'animaux d'élevage. Ils doivent respecter le dosage proposé par le vétérinaire, la méthode d'administration du médicament, la durée et la fréquence du traitement ainsi que la période de retrait de l'animal (MAPAQ, 2013). D'autres mesures préventives sont suggérées par le MAPAQ (2013) pour diminuer l'utilisation des antibiotiques:

- De bonnes pratiques d'élevage et d'hygiène dont les logements, l'alimentation et la gestion.
- Utiliser les ressources présentes, les médecins vétérinaires, agronomes, ingénieurs et techniciens.
- Établir des mesures de biosécurité, c'est-à-dire de faire un contrôle rigoureux des visiteurs et des achats d'animaux. Cela aide à la diminution du risque d'infection.
- Accroître la résistance aux maladies par la vaccination ou la sélection génétique des animaux.

- Suivre les directives des associations de producteurs et des programmes d'assurance qualité comme les principes HACCP (analyse des risques et maîtrise des points critiques).

#### 1.6 Impacts de l'arrêt de l'administration d'antibiotiques en préventif en Europe

Certains pays ont banni complètement l'utilisation des antibiotiques comme promoteurs de croissance. C'est le cas de la Suède, depuis 1986 et du Danemark, depuis 1998 (Corpet 2000). C'est en 2006 que l'Union Européenne a complètement interdit l'utilisation d'antibiotiques comme promoteurs de croissance (Marshall and Levy 2011). Ce faisant, l'Union Européenne a choisi d'appliquer le principe de précaution. Ce principe stipule qu'aussitôt qu'il y a des évidences raisonnables qu'une activité pourrait causer des conséquences significatives et irréversibles au niveau de la santé publique ou de l'environnement, l'option d'éviter les dommages par l'arrêt de la pratique doit être examinée et priorisée, même si les effets ne sont pas encore totalement compris ou qu'ils n'y a pas de preuves significatives (Marshall and Levy 2011).

La réglementation sur l'utilisation des antibiotiques comme promoteurs de croissance a eu plusieurs conséquences positives et négatives. L'arrêt de l'utilisation de l'avoparcine comme additif alimentaire dans plusieurs pays européens a mené à la diminution de la fréquence d'apparition de la résistance aux antibiotiques dans plusieurs de ces pays. Par exemple, au Danemark, la fréquence du gène VRE, responsable de la résistance à la vancomycine, qui partage une résistance croisée avec l'avoparcine, était d'environ 73 à 80 % auparavant et a diminué pour atteindre approximativement 5 à 6 % chez la volaille (Aarestrup, Seyfarth et al. 2001). En Italie, la prévalence de ce même gène a chuté de 14,6 % à 8 % en seulement 18 mois (Pantosti, Grosso et al. 1999). Par contre, une des plus grandes craintes suite au bannissement des antibiotiques était l'augmentation des maladies animales, obligeant une hausse de l'utilisation des antibiotiques thérapeutiques. Effectivement, il y a eu une augmentation, dans certains pays, de la fréquence de l'entérite nécrotique chez la volaille et de colite chez le porc. En Norvège, il y a eu une grande augmentation de l'entérite nécrotique, suivie d'une augmentation de l'usage des antibiotiques à usage thérapeutique. À part l'augmentation de l'utilisation des antibiotiques pour le traitement des maladies (et non en prévention), aucune autre

conséquence négative n'a été démontrée. En effet, le taux de mortalité, le gain de poids moyen quotidien ainsi que la production animale sont demeurés similaires par rapport à la période précédant l'arrêt de l'utilisation des antibiotiques. Selon Marshall and Levy (2011), malgré l'accroissement de l'utilisation d'antibiotiques pour le traitement des maladies chez les animaux, la pression de sélection est moindre, puisque moins d'animaux sont en contact avec des antibiotiques. Par conséquent moins d'individus ont besoin de traitement utilisant des antibiotiques.

## **2 Alternatives à l'utilisation des antibiotiques comme préventif**

Les alternatives aux antibiotiques utilisés comme promoteurs de croissance doivent avoir des effets similaires, c'est-à-dire qu'ils doivent avoir un effet sur le microbiote intestinal en réduisant les infections cliniques, la réponse de l'hôte au microbiote intestinal et la compétition pour les nutriments (Diarra and Malouin 2014). Les probiotiques, certaines huiles essentielles, la vaccination, l'utilisation de bactériophages et de peptides antimicrobiens sont donc des alternatives qui respectent ces critères préétablis.

### **2.1 Les probiotiques**

Les probiotiques sont définis comme étant des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte au-delà de l'effet nutritionnel premier (Bernardeau and Vernoux 2013). En effet, les probiotiques ont un impact positif sur la flore intestinale normale des hôtes (Kaur, Kuhad et al. 2009). Les probiotiques les plus fréquemment utilisés chez l'humain proviennent de deux genres, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (Kaur, Kuhad et al. 2009), tandis que ceux les plus utilisés dans les élevages sont *Bacillus*, *Enterococcus* et *Saccharomyces* (Bernardeau and Vernoux 2013). La capacité de *Lactobacillus* et de *Bifidobacterium* à pallier les problèmes gastro-intestinaux et les infections bactériennes et virales est très bien documentée (Kaur, Kuhad et al. 2009). Le genre *Lactobacillus* comprend 100 espèces différentes appartenant au groupe des bactéries productrices d'acide lactique. Plusieurs de ces espèces constituent la flore normale des humains et animaux. Ils sont incorporés dans l'alimentation des humains et des animaux (Gaggia, Mattarelli et al. 2010). Le genre *Bifidobacterium* est aussi présent dans le tractus intestinal des humains et

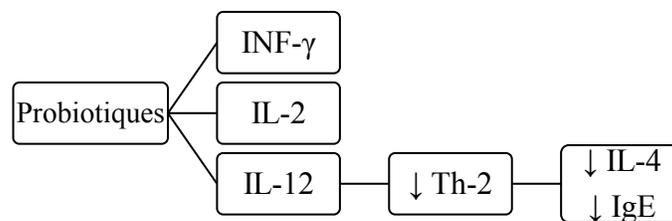
animaux. Sa présence en grande quantité informe de la bonne santé des hôtes. *Bacillus* est un genre de bactérie Gram positive formant des spores utilisés comme probiotiques dans des suppléments alimentaires animaux (Gaggia, Mattarelli et al. 2010). Le genre *Enterococcus* est un constituant normal de la flore des animaux et des humains et il est retrouvé naturellement dans certains produits alimentaires. Finalement, le genre *Saccharomyces* est formé par des levures. *S. cerevisiae* est utilisé dans des boissons et de la nourriture tandis que *S. boulardii* est un probiotique utilisé dans l'alimentation des ruminants et des porcs (Gaggia, Mattarelli et al. 2010).

L'utilisation de probiotiques dans l'alimentation animale doit stimuler une réponse rapide, augmenter les performances zootechniques et ne pas être toxique (Bernardeau and Vernoux 2013). Ces bactéries bénéfiques seraient en mesure de jouer plusieurs rôles au niveau thérapeutique, via des mécanismes d'actions différents. Ceux-ci mettent en évidence sept fonctions précises des probiotiques permettant un contrôle des pathogènes :

- 1) La présence de probiotiques provoque une compétition au niveau des récepteurs intestinaux. La présence de ces bactéries cause de la compétition aux bactéries pathogènes, pour la liaison aux récepteurs à la surface de l'épithélium intestinal puisque le nombre de récepteurs est limité, c'est le phénomène d'exclusion compétitive (EC);
- 2) Les probiotiques peuvent produire des composés antimicrobiens, par exemple, des acides organiques, des acides gras libres, du peroxyde d'hydrogène ainsi que des bactériocines. Ces produits peuvent avoir un effet antagoniste sur les organismes pathogènes;
- 3) Les probiotiques induisent la sécrétion de la mucine par les cellules intestinales, ce qui permet aux bactéries probiotiques de se lier plus facilement à la muqueuse intestinale, au détriment des bactéries pathogènes;
- 4) Les probiotiques augmentent la compétition pour les nutriments dans le tractus gastro-intestinal;
- 5) Les probiotiques sont capables de modifier les récepteurs des toxines des pathogènes et d'empêcher les pathologies causées par ces toxines. Ils peuvent aussi promouvoir la stimulation non spécifique du système immunitaire, c'est-

à-dire la prolifération des cellules immunitaires, augmente l'activité de phagocytose par les macrophages et la sécrétion des Immunoglobulines (Ig) A et M;

- 6) Les probiotiques stimulent le système immunitaire de l'hôte. Ces bactéries provoquent la production d'interféron- $\gamma$  (INF-  $\gamma$ ), d'interleukine-2 (IL-2) et d'interleukine-12 (IL-12). La production d'IL-12 entraîne la diminution de la réponse du Th-2, ce qui diminue la production d'IL-4 et d'IgE. Cette chaîne de réaction prévient les allergies (Figure 1);
- 7) Créer une barrière contre la colonisation par les pathogènes, permettant d'éliminer les antigènes étrangers présents dans la muqueuse et de contrôler la réponse immune.



**Figure 1** : Étapes de la stimulation du système immunitaire de l'hôte par les probiotiques (Kaur, Kuhad et al. 2009).

L'utilisation de ces bactéries représente une stratégie pour le contrôle des pathogènes, tout en maintenant une flore intestinale en santé. Ceux-ci sont une stratégie alternative aux antibiotiques. Leur utilisation chez la volaille se base principalement sur le concept d'exclusion compétitive (EC) (Gaggia, Mattarelli et al. 2010). Selon des études effectuées, les cultures de probiotiques testées seraient efficaces contre la colonisation du tractus gastro-intestinal de *Salmonella*, *C. jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *E.coli*, *Yersinia enterocolitica* et *C. perfringens*. Lorsqu'administrés par voie orale après 1 jour de vie, les lactobacilles diminueraient la mortalité causée par l'entérite nécrotique de 60% à 30% (Hofacre et al. 2003). De plus, ils seraient responsables de l'augmentation du taux de

croissance, l'augmentation de la conversion alimentaire et de la qualité de la viande (Gaggia, Mattarelli et al. 2010).

## 2.2 Les huiles essentielles

Dans les huiles essentielles, on retrouve des composants volatiles et aromatiques synthétisés par les plantes (Tiihonen, Kettunen et al. 2010). Selon la pharmacopée Européenne, une huile essentielle (HE) est un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenue à partir d'une matière première botanique définie, soit par entraînement par la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition (Alleman, Gabriel et al. 2013). Il en existe, jusqu'à plus de 3000 types, dont 300 sont commercialisées à plusieurs fins. Elles peuvent être utilisées comme agents antimicrobiens, antifongiques et antiviraux. La sécrétion des huiles essentielles chez les plantes représente un moyen de répulsion des insectes et des animaux herbivores. L'activité antimicrobienne provient majoritairement de l'action des phénols, des aldéhydes et des terpènes qui composent ces huiles. Ces composés sont capables de détruire l'intégrité et les fonctions de la membrane des cellules bactériennes (Tiihonen, Kettunen et al. 2010). Les huiles essentielles possèdent également des propriétés antioxydantes, antivirales, anti-mycotiques, antiparasitaires, hypolipémiantes, inhibitrices d'odeurs, insecticides et stimulent le tractus digestif (Alleman, Gabriel et al. 2013). Leur utilisation est avantageuse, car elles ne laissent pas de résidus dans le corps des animaux (Brenes and Roura 2010).

### 2.2.1 L'utilisation des huiles essentielles dans l'alimentation de la volaille

Les huiles essentielles sont déjà utilisées en production animale, principalement lors de l'élevage de la volaille (Alleman, Gabriel et al. 2013). En effet, elles améliorent les performances zootechniques. Plus spécifiquement, elles semblent avoir un effet sur la vitesse de croissance, sur l'indice de consommation (IC), sur la quantité d'aliments ingérés, sur la digestibilité ainsi que sur le statut sanitaire des animaux (Alleman, Gabriel et al. 2013). Le thym, l'origan et le romarin sont les principales huiles essentielles qui présentent des effets zootechniques et qui sont les plus fréquemment rapportées. Les

huiles essentielles utilisées dans l'alimentation de la volaille sont séparées en trois catégories selon leur mode d'action : sensorielle, antioxydante et antimicrobienne (Brenes and Roura 2010). L'action de stimulation de la digestion, par les huiles classées sensorielles, est un des effets les plus bénéfiques physiologiquement. Les huiles essentielles sont également antioxydantes, c'est-à-dire qu'elles préviennent la dégradation oxydative de la nourriture par des radicaux libres. Finalement, elles ont la propriété d'être antimicrobiennes (Brenes and Roura 2010). Une étude effectuée par Smith-Palmer et al. (1998) montre l'effet inhibiteur de la cannelle, du clou de girofle et du thym sur des pathogènes alimentaires, tels que *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis*, *Clostridium jejuni*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* (Brenes and Roura 2010). Selon Tiihonen, Kettunen et al. (2010), les huiles essentielles seraient une alternative prometteuse à l'utilisation des antibiotiques. Ses résultats démontrent que les poulets de chair ayant reçu des huiles essentielles dans leur alimentation auraient un gain de poids supérieur aux oiseaux du groupe contrôle ( $p < 0,05$ ).

### 2.3 Vaccination

La vaccination est un procédé fréquemment utilisé pour prévenir différentes maladies et infections. Depuis plusieurs années, de nombreuses recherches portant sur le développement de vaccins ont été effectuées. C'est le cas pour l'infection causée par *Clostridium perfringens* de souche A, qui produit la toxine NetB, causant l'entérite nécrotique décrite précédemment (Mot, Timbermont et al. 2014). De nombreuses études ont démontré l'efficacité d'un vaccin à induire des anticorps contre les toxines produites par cette bactérie chez les veaux, les agneaux, les chèvres, les porcs et les souris (Dahiya, Wilkie et al. 2006). En ce qui concerne les poulets, un seul vaccin est présentement disponible sur le marché : Netvax<sup>®</sup>. Ce vaccin est formé par des toxines alpha-toxoïdes préparées à partir de *C. perfringens* de souche A isolé de vaches (ATCC 13124) (Keyburn, Portela et al. 2013). Une étude récente effectuée par Keyburn et al. (2013), montre, pour la première fois, qu'un vaccin à base de toxine NetB, administré aux poules protège la progéniture à l'âge où la maladie est susceptible d'apparaître. Il serait aussi possible d'utiliser un vaccin contre la coccidiose qui est un précurseur de l'entérite nécrotique. Plusieurs études rapportent que l'administration d'un vaccin anti-coccidiose, composé de sept espèces d'*Eimeria* et administré au couvoir, serait efficace pour la

protection contre la coccidiose. Étant donné le lien entre la coccidiose et l'entérite nécrotique (Dahiya, Wilkie et al. 2006), toute prévention efficace de la coccidiose diminue les risques d'entérite nécrotique.

#### 2.4 Bactériophages

L'utilisation des bactériophages est une technologie récemment utilisée comme méthode alternative aux antibiotiques. Ce sont des virus qui infectent spécifiquement les cellules bactériennes. Ils sont retrouvés naturellement dans l'environnement (Drulis-Kawa, Majkowska-Skrobek et al. 2012). On en retrouve dans les systèmes aquatiques, à une concentration de  $10^4$  à  $10^8$  virions par mL, dans le sol et dans les sédiments à une concentration de  $10^9$  virions par gramme. Plus de 6000 bactériophages différents ont été découverts et décrits morphologiquement (Wittebole, De Roock et al. 2014). Ceux-ci peuvent infecter un ou plusieurs genres ou espèces de bactéries (Haq, Chaudhry et al. 2012). Les bactériophages ont un matériel génétique formé d'ADN ou d'ARN encapsulé dans un manteau protéinique, formant la capsid (Haq, Chaudhry et al. 2012). Cette capsid est soutenue par une queue fibreuse qui permet l'attachement à la surface des cellules bactériennes. La majorité des phages ont une capsid de forme polyédrique à l'exception des phages filamenteux (Haq, Chaudhry et al. 2012). L'avantage principal de l'utilisation des bactériophages est leur grande spécificité. Le degré de spécificité d'un phage dépend de son attachement ou de son adsorption aux récepteurs présents à la surface de la cellule bactérienne durant le stade initial du cycle d'infection (Wong, Sieo et al. 2014). Par exemple, un bactériophage est spécifique à une espèce bactérienne ou, dans certains cas, à une seule souche (Wittebole, De Roock et al. 2014). En effet, contrairement aux antibiotiques, les bactériophages se répliquent exclusivement en présence de sa cible bactérienne. Ainsi, au moment où la bactérie cible n'est plus présente, ceux-ci cessent de se répliquer, ce qui fait qu'ils ont un spectre d'action limité contrairement à la majorité des antibiotiques utilisés (Atterbury 2007).

Il existe différents modes d'administration des bactériophages : oralement, par administration intramusculaire, par aérosol ou dans l'eau (Wong, Sieo et al. 2014). Une étude effectuée par Atterbury et al., (2007) a démontré l'efficacité de l'utilisation de certains phages spécifiques à *Salmonella*, par l'administration orale chez des poulets de chairs commerciaux. En effet, l'administration de bactériophages diminuerait

significativement la colonisation caecale par *Salmonella enteritica* sérotype Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium (Atterbury 2007). L'équipe de recherche de Wong et al. (2014) a plutôt testé une inoculation intra-cloacale, le but étant d'éliminer rapidement les *Salmonella* afin de réduire le plus efficacement la propagation de ces bactéries, considérant que la voie principale de propagation se fait via la contamination fécale-orale. Des tests *in vivo* ont démontré que le bactériophage  $\phi$ st1, administré de façon intra cloacale, pourrait servir pour le bio contrôle de Salmonella dans le contenu caecal des poulets (Wong, Sieo et al. 2014).

#### 2.4.1 Cycle de vie des bactériophages

Les bactériophages se différencient en fonction de leur cycle phagique qui se sépare en 2 catégories : bactériophages virulents et bactériophages tempérés. En premier lieu, les bactériophages virulents sont caractérisés par leur capacité à causer la lyse des cellules hôtes immédiatement après l'infection. Ils se lient à la surface de la cellule bactérienne hôte et injectent leur matériel génétique à l'intérieur de la cellule bactérienne (Drulis-Kawa, Majkowska-Skrobek et al. 2012). Par la suite, le matériel génétique des bactériophages se réplique à l'intérieur de la cellule bactérienne lorsqu'ils se retrouvent dans des conditions favorables (exemple : pH, présence de nutriments). Les nouveaux bactériophages synthétisés s'assemblent et il y a lyse de la cellule hôte. Cette lyse mène à la libération de nombreux bactériophages dans l'environnement qui deviennent disponibles pour l'infection des autres pathogènes présents chez l'hôte (Drulis-Kawa, Majkowska-Skrobek et al. 2012). Ce sont les bactériophages virulents qui sont utilisés pour les thérapies par les phages, car ils mènent à la lyse de la bactérie hôte (Wong, Sieo et al. 2014). En second lieu, on retrouve les bactériophages tempérés, peu efficaces pour la lutte contre les pathogènes (Drulis-Kawa, Majkowska-Skrobek et al. 2012). Contrairement aux bactériophages virulents, ils peuvent rester dans la cellule hôte sans la tuer, en attendant des conditions favorables à la multiplication. Leur cycle est essentiellement le même que pour les virulents, à l'exception que leur matériel génétique s'intègre à celui de la bactérie hôte jusqu'à ce que les conditions deviennent favorables et que le matériel génétique puisse se répliquer et former de nouveaux bactériophages, qui vont également mener à la lyse de la cellule bactérienne (Drulis-Kawa, Majkowska-Skrobek et al. 2012).

### 3 Peptides Antimicrobiens

La recherche sur les peptides antimicrobiens a débuté en 1939 alors que Dubos a extrait un agent antimicrobien à partir d'une souche de *Bacillus* provenant du sol (Dubos 1939). Cette équipe a démontré que cet extrait protégeait les souris contre les infections pneumocoques. Durant les années qui ont suivi cette découverte, Hotchkiss et Dubos ont fractionné ce même extrait, ce qui leur a permis d'identifier un peptide antimicrobien, qu'ils ont nommé gramicidine. Celui-ci a été utilisé pour le traitement de plaies et d'ulcères (Bahar and Ren 2013). En 1941, un autre peptide antimicrobien a été découvert, la tyrocidine, qui est efficace contre les bactéries Gram positives et Gram négatives. Par contre, elle présente une toxicité pour les cellules de sang humain. Au courant de la même année, un peptide a été isolé à partir d'un plant de *Triticum aestivum*, la purothionine. Il est efficace contre certains champignons et certaines bactéries pathogènes. Le premier peptide antimicrobien d'origine animale rapporté est la défensine, isolée à partir de leucocytes de lapins, en 1956. Dans les années qui ont suivi, la bonbinime, isolée de l'épithélium, et la lactoferrine, isolée du lait de vache, ont été découvertes. De plus, il a été prouvé que les leucocytes humains contenaient des peptides antimicrobiens dans leurs lysosomes.

#### 3.1 Sources

Les peptides antimicrobiens sont produits naturellement par une grande variété d'organismes vivants, autant par des unicellulaires que par des multicellulaires (Benkerroum 2010). En effet, ces peptides sont produits dans plusieurs tissus et plusieurs types de cellules chez les invertébrés, les plantes et les espèces animales (Brogden 2005). On en retrouve également chez les bactéries, les plantes, les champignons, les protistes, les animaux et les Archaea (The Antimicrobial Peptide Database, 2015). La production de ces peptides constitue la première ligne de défense contre les micro-organismes pathogènes (Benkerroum 2010). Généralement, ce sont des molécules de moins de 10 kDa, c'est-à-dire d'environ 3 à 50 acides aminés. Ceux-ci possèdent une activité antimicrobienne et serait une application prometteuse en médecine et pour la préservation des aliments (Benkerroum 2010). Les nombreuses recherches effectuées depuis quelques années ont permis de découvrir de nouveaux peptides antimicrobiens produits à partir de protéines alimentaires dont la lactoferrine et les caséines (Benkerroum 2010). En 2015, il

existe un répertoire de 2 114 peptides antimicrobiens et ce nombre ne cesse d'augmenter suite aux nombreuses recherches effectuées dans ce domaine (The Antimicrobial Peptide Database 2015; Wang 2015; Bahar et Ren 2013). L'hydrolyse des protéines pour générer les peptides antimicrobiens peut s'effectuer de façon naturelle durant la digestion gastrointestinale ou la fermentation microbienne de même qu'en laboratoire par des enzymes digestives (*in vitro*) ou microbiennes (Pownall, Udenigwe et al. 2010). Dus à leurs activités antimicrobiennes, les peptides bioactifs antimicrobiens seraient une alternative prometteuse au traitement des infections bactériennes multi-résistantes (Brogden 2005).

Il existe une grande diversité de peptides antimicrobiens (Tableau 2). Ils sont classifiés en plusieurs groupes, en fonction de leur composition en acides aminés et de leur structure tridimensionnelle. Le premier groupe est formé de peptides antimicrobiens anioniques que l'on retrouve principalement dans les fluides broncho alvéolaires des poumons des mammifères et dans les cellules épithéliales des voies aériennes. Ils nécessitent l'utilisation de zinc comme co-facteur pour pouvoir exercer leur activité antimicrobienne contre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Brogden 2005). Quelques exemples de peptides formant ce groupe sont : des petits peptides antimicrobiens riches en acides glutamiques et aspartiques provenant des moutons, des chèvres et des humains ainsi que la dermcidine retrouvée chez l'humain. Le second groupe est formé de courts peptides cationiques exempts de résidus cystéine. On y retrouve le peptide LL-37. Le troisième groupe est composé de peptides cationiques ayant une structure linéaire. Ceux-ci sont également riches en certains acides aminés, à l'exception des cystéines (Brogden 2005). On y retrouve, par exemple, PR-39 et des bacténecines. Le quatrième groupe est formé par des peptides cationiques et anioniques. Ils sont caractérisés par la présence de cystéine, la formation de ponts disulphides et par la présence de feuilletts bêta stables. Les différents sous-groupes de défensine se retrouvent dans ce groupe. Finalement, le dernier groupe est formé de peptides anioniques et cationiques qui proviennent de protéines de plus grandes tailles, dont la lactoferricine qui provient de l'hydrolyse de la lactoferrine. Ces fragments possèdent une activité antimicrobienne (Brogden 2005).

**Tableau II** : Résumé des différents groupes de peptides en fonction de leur composition en acides aminés et de leur structure tridimensionnelle.

1 <sup>er</sup> groupe	2 <sup>ème</sup> groupe	3 <sup>ème</sup> groupe	4 <sup>ème</sup> groupe	5 <sup>ème</sup> groupe
Peptides anioniques qui ont besoin de zinc	Peptides cationiques exempt de cystéines	Peptides cationiques riches en acides aminés, à l'exception des cystéines	Peptides anioniques et cationiques (cystéines, ponts disulfures, feuillet bêta) Ex : défensine	Peptides anioniques et cationiques (activité antimicrobienne)  Ex : lactoferricine

Les peptides antimicrobiens les plus étudiés sont ceux de nature cationique (Giroux, Constantineau et al. 2013). Ceux-ci ciblent les parois bactériennes et causent la destruction de la bicouche lipidique. De plus, la majorité des peptides antimicrobiens sont amphipatiques, c'est-à-dire qu'ils possèdent des domaines hydrophiles et des domaines hydrophobes. La région hydrophobe permet la liaison avec des composants lipidiques et inversement, la région hydrophile permet la liaison à des groupes de phospholipides (Bahar and Ren 2013). Leur structure rend possible l'interaction avec des membranes chargées négativement, ce qui leur permet de cibler les membranes cellulaires des microorganismes pathogènes. En effet, malgré le fait qu'il y ait des peptides de nature anionique, la majorité des peptides antimicrobiens sont cationiques, avec une charge nette positive moyenne de +3,2. La membrane bactérienne étant chargée négativement, les peptides de nature cationique ciblent ces membranes (Wang, 2015).

### 3.2 Mécanismes d'action au niveau de la membrane plasmique et de la paroi cellulaire

L'efficacité des peptides à provoquer la mort des cellules bactériennes varie en fonction du type de peptides : certains agissent en 15 à 90 minutes alors que d'autres agissent tellement rapidement qu'il est difficile d'identifier les différentes étapes du processus

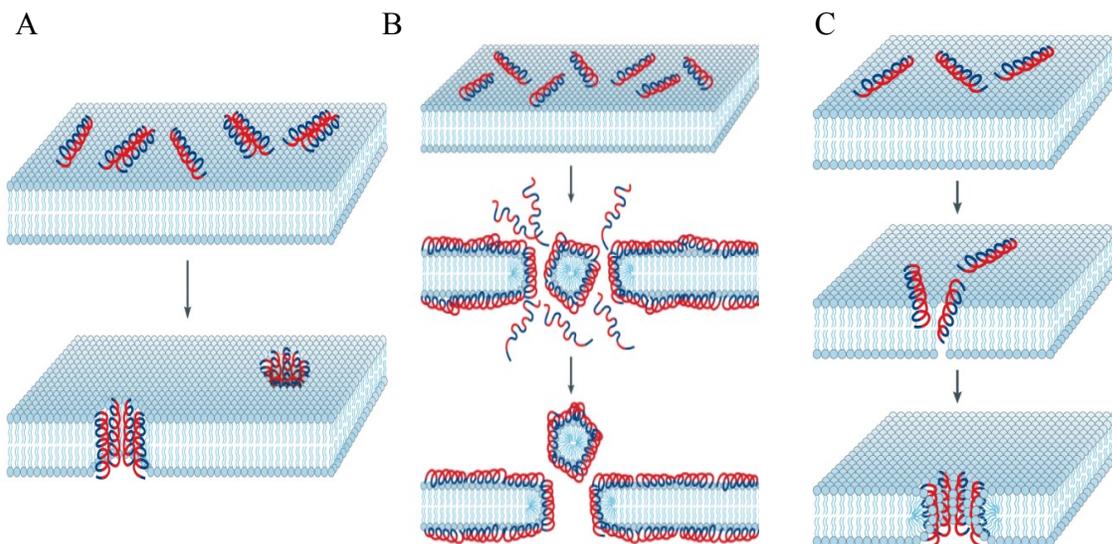
(Brogden 2005). Les peptides antimicrobiens sont rapidement sollicités après une infection bactérienne et agissent rapidement pour neutraliser les bactéries pathogènes. Cette rapidité est très importante étant donné le temps nécessaire à l'activation de la réponse immunitaire spécifique et la vitesse de prolifération des souches bactériennes (Shai 2002).

La première étape consiste en l'attraction du peptide à une bactérie. Cette attraction est possible grâce à des liaisons électrostatiques entre les charges des peptides et les structures de la surface bactérienne. Les peptides cationiques sont attirés par la charge négative de l'enveloppe externe, c'est-à-dire les groupements phosphates présents sur les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à Gram négatif. En ce qui concerne les bactéries à Gram positif, ce sont les acides téichoïques à la surface de bactéries, qui permettent l'attraction des peptides cationiques (Brogden 2005). En effet, la couche de peptidoglycane des bactéries Gram positives est formée de glycopolymères anioniques, les WTAs (*Wall teichoic acids*) (Brown, Santa Maria Jr et al. 2013).

La seconde étape est l'attachement de peptides à la membrane externe des bactéries, dans le but de la traverser. En ce qui concerne les Grams négatifs, il y a interaction avec les LPS. Pour les Grams positifs, le peptide doit traverser la paroi de peptidoglycane, les acides téichoïques et les acides lipotéichoïques, avant d'avoir accès à la membrane cytoplasmique et ainsi d'interagir avec la bicouche lipidique.

La dernière étape consiste en l'insertion du peptide et la perméabilisation de la membrane. L'insertion des peptides est fonction du ratio peptides/lipides. En effet, lorsque le ratio est faible, les peptides se lient parallèlement à la bicouche lipidique. Plus le ratio augmente et plus les peptides se lient perpendiculairement à la membrane. Lorsque le ratio peptides/lipides devient élevé, les peptides se lient perpendiculairement à la membrane et s'insèrent dans la bicouche, formant des pores transmembranaires. Cette étape varie en fonction de la composition du peptide et du lipide (Brogden 2005). Il existe différents mécanismes d'actions utilisés par les peptides antimicrobiens. Le modèle de la douve du tonneau permet la formation de pores dans la bicouche de la membrane lipidique (Figure 2A). Initialement, les peptides se retrouvent liés aux têtes des phospholipides, à la surface de la membrane. Par la suite, les peptides s'agrègent et

s'insèrent dans la bicouche membranaire de façon à ce que les régions hydrophobes soient dirigées vers la région lipidique. Les régions hydrophiles forment l'intérieur des pores (Brogden 2005, Bahar and Ren 2013). Un deuxième modèle permet la formation de micelles (Figure 2B). Dans celui-ci, les peptides s'accumulent à la surface de la bicouche lipidique et couvrent une petite région de la membrane. Ce sont les portions hydrophiles qui se lient à la surface des membranes. Les peptides pénètrent ainsi la bicouche lipidique formant un pore ayant des parois hydrophobes. L'excédent de membrane, ne pouvant plus se lier aux peptides forme une micelle (Bahar and Ren 2013). Le troisième modèle étudié est celui des pores toroïdaux (Figure 2C). Dans celui-ci, les peptides restent fixés aux têtes lipidiques de la membrane en tout temps, contrairement au modèle de la douve du tonneau (Bahar and Ren 2013). Il y a formation d'un pore par retournement de la membrane. En d'autres mots, la membrane lipidique devient continue, même à l'intérieur du pore (Brogden 2005).



**Figure 2 :** Différents modèles des mécanismes d'actions des peptides antimicrobiens sur la membrane lipidique d'une cellule bactérienne. A. Modèle de la douve du tonneau. B. Modèle de formation de micelles. C. Modèle des pores toroïdaux. En bleu on retrouve les régions hydrophobes et en rouge les régions hydrophiles. Figure tirée de Brogden (2005).

Certains peptides antimicrobiens possèdent un mode d'action différent. Ils ont une activité intracellulaire sur les bactéries. En effet, il existe des sites de liaison à l'intérieur des cellules bactériennes (Bahar and Ren 2013). Certains peptides sont en mesure d'inhiber la synthèse de l'ADN et des protéines. Un exemple de peptide ayant ce mode d'action est PR-39. Celui-ci provient des intestins de porc et tue les bactéries par une voie non-lytique, en agissant comme un agent protéolytique en arrêtant la synthèse des protéines et de l'ADN (Bahar and Ren 2013). Un autre mode d'action intracellulaire est l'inhibition de la protéase des microorganismes. Par exemple, eNAP-2 possède une activité anti-protéase contre des protéases microbiennes (Bahar et Ren 2013). De plus, certains peptides inhibent la synthèse de la paroi cellulaire (mersacidine), altère la membrane cytoplasmique en inhibant la formation du septum (PR-39, PR-26, indolicidine et microcine 25), inhibe l'activité enzymatique (histatines, pyrrolicoricine, drosocine et apidaecine) et active l'auto lysine (N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase) (Brogden 2005). Finalement, certains peptides ayant une activité intracellulaire peuvent uniquement tuer des cellules à un stade de croissance précis. Effectivement, la diptericine est efficace essentiellement contre des cellules bactériennes en croissance, suggérant que ce peptide avec des voies métaboliques spécifiques à la croissance bactérienne (Bahar and Ren 2013).

### 3.3 Mode de défense des bactéries et acquisition d'une résistance aux peptides antimicrobiens

Les microorganismes ont développé différents mécanismes pour contrer l'activité des peptides antimicrobiens. Cette résistance a été démontrée par Perron et al. (2006) sur *Escherichia coli* et *Pseudomonas fluorescens*. Il existe deux types de mécanisme de résistance envers les peptides antimicrobiens : une résistance constitutive et une résistance inductible (Bahar and Ren 2013). La résistance inductible inclut les mécanismes suivants : (1) substitution, modification et l'acylation des molécules membranaires, (2) l'activation d'enzymes protéolytiques et de pompes à efflux, et finalement, (3) la modification de sites de liaison intracellulaires. Concernant la résistance constitutive, elle inclut les mécanismes de résistance suivants : (1) la protection électrostatique, (2) des changements dans le potentiel membranaire durant différents stades de croissance des cellules bactériennes, (3) et la formation de biofilm (Bahar and

Ren 2013). Ces mécanismes ciblent les différentes étapes du mécanisme d'action des peptides antimicrobiens, c'est-à-dire l'attachement, l'insertion des peptides et la perméabilité de la membrane.

Les méthodes utilisées par les bactéries résistantes varient selon les espèces bactériennes (Brogden 2005). Par exemple, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), une bactérie à Gram positif, a développé deux stratégies de réduction de la charge négative à sa surface pour empêcher la liaison entre sa membrane et les peptides antimicrobiens. En premier lieu, cette espèce de bactérie possède un opéron nommé *dlt*, contenant les gènes *dltA*, *dltB*, *dltC*, *dltD*. Cet opéron permet le transport de la D-alanine du cytoplasme jusqu'à la surface, aux acides téichoïques (Ernst, Staubitz et al. 2009). La D-alanine mène à l'estérification, une réaction de formation d'un ester, à partir d'un acide et d'un alcool avec élimination d'eau. Ce processus permet une diminution de la charge négative nette de la surface de cette bactérie (Brogden 2005). L'inactivation de l'opéron *dlt* augmente la sensibilité de la bactérie aux attaques par des peptides antimicrobiens. En second lieu, *S. aureus* peut modifier les phospholipides membranaires par des lysines-L par la protéine de résistance à la défensine (Ernst, Staubitz et al. 2009), MprF (Membrane protein multiple peptide resistance factor) (Brogden 2005). Cette protéine catalyse la formation de la lysylphosphatidylglycérole (LPG) et permet de neutraliser la surface membranaire (Ernst, Staubitz et al. 2009). Les LPG sont des phospholipides produits par le transfert de la lysine-L, provenant d'un lysyl-tARN à un phosphatidylglycérole. Ce transfert permet d'augmenter la charge positive, ce qui augmente la répulsion des peptides antimicrobiens (Brogden 2005).

Les bactéries à Gram négatif ont également développé des moyens de défense face à ces peptides. Celles-ci réduisent leur susceptibilité à l'attachement des peptides à leur membrane. De plus, elles réduisent la charge négative de leur surface en modifiant la portion de lipide A des LPS (Palmitoylation des lipides A) ou en réduisant la fluidité de la membrane en augmentant le nombre d'interactions hydrophobes. Il peut aussi y avoir des modifications dans la membrane externe des bactéries, ce qui augmente la résistance aux peptides (Brogden 2005). En effet, les bactéries peuvent exprimer des protéines chargées positivement et les intégrer à leur membrane, ce qui permet de repousser et ainsi

de résister aux peptides. Inversement, les bactéries peuvent également produire des protéines chargées négativement et les sécréter dans leur environnement extracellulaire, ce qui permet la liaison et l'inactivation des peptides (Bahar and Ren 2013). Le transport actif des peptides, par des pompes, à l'intérieur de la cellule, puis son exportation à l'extérieur de la cellule est un autre moyen de résistance des bactéries. Par contre, il demande de l'énergie aux cellules bactériennes puisqu'il s'agit d'un transport actif. En dernier lieu, les bactéries peuvent utiliser des enzymes protéolytiques pour la dégradation des peptides directement. Il existe de nombreux mécanismes de défense chez les bactéries et des moyens d'acquérir une résistance aux peptides antimicrobiens. Il sera important de tenir compte de tous ses facteurs dans l'étude des peptides.

#### **4 Peptides antimicrobiens alimentaires- Différentes sources**

L'objectif du programme de recherche est de contrôler la flore bactérienne indésirable chez la volaille, par le biais d'un supplément alimentaire constitué d'antimicrobiens d'origine peptidique, provenant de l'alimentation. La découverte de protéines ayant des propriétés antimicrobiennes et de peptides de sources naturelles sont des alternatives prometteuses (Clare, Zheng et al. 2008). L'utilisation de produits naturels permettrait d'augmenter la salubrité alimentaire sans nuire aux propriétés nutritionnelles et organoleptiques. Tel que mentionné précédemment, on retrouve des peptides antimicrobiens chez les procaryotes et les eucaryotes, plus précisément chez les protozoaires, champignons, plantes, insectes et animaux (Bahar and Ren 2013).

##### 4.1 Produits laitiers

Le lait est une source importante de protéines et de peptides antimicrobiens. Ces peptides possèdent des propriétés antimicrobiennes (Benkerroum 2010). En plus d'être une source nutritionnelle pour les nouveaux nés, le lait les protège et protège également les glandes mammaires contre des infections à cause de sa teneur en antimicrobiens (Smolenski, Haines et al. 2007).

Les principaux constituants du lait sont des protéines, telles des caséines ou des globulines, des triglycérides et des sucres simples tels que le lactose. Le lait bovin contient 6 principales protéines :  $\alpha_{s1}$ -caséine,  $\alpha_{s2}$ -caséine,  $\beta$ -caséine,  $k$ -caséine,  $\beta$ -

lactoglobuline et  $\alpha$ -lactalbumine. Le lait sécrété immédiatement après la naissance, communément appelé colostrum, possède une composition distincte avec des immunoglobulines G (IgG), des immunoglobulines A (IgA) et des immunoglobulines M (IgM), ce qui confère une immunité passive aux nouveaux nés (Smolenski, Haines et al. 2007). En plus des constituants majeurs du lait, il est possible d'y retrouver aussi de faibles concentrations de protéines sériques, comme l'albumine, des enzymes tels que la plasmine, des immunoglobulines, des protéines complémentaires, des facteurs de croissance et la lactoferrine. Cette dernière est une protéine liant le fer et possédant des propriétés antimicrobiennes. Certaines protéines ayant des propriétés anti-inflammatoires ont aussi été détectées dans le lait (Smolenski, Haines et al. 2007). En résumé, le lait possède un système de défense naturel grâce à sa composition immunologique complexe d'immunoglobulines, de lysozymes, de lactoferrine, le système de lactoperoxydase, des macrophages et des lymphocytes (Clare, Zheng et al. 2008).

Les peptides d'origine laitière, produits à partir des protéines, possèdent plusieurs fonctions biologiques telles qu'opioïdes, anti-thrombotiques, immuno-modulatrices, anti-hypertensives ainsi qu'une activité de transport des minéraux. Ils possèdent l'avantage d'être peu onéreux. Ils peuvent être utilisés en médecine ou dans l'industrie alimentaire. En effet, ils peuvent être employés comme bio-préservatifs de la qualité alimentaire et comme suppléments alimentaires (Benkerroum 2010).

Il existe plusieurs peptides antimicrobiens provenant de l'hydrolyse des protéines du lait (Théolier, Fliss et al. 2014). Les caséidines, obtenues par la digestion de l' $\alpha_{s1}$ -caséine par des enzymes spécifiques ou par fermentation (Benkerroum 2010). Ces peptides sont dans la famille des glycopeptides, avec un poids moléculaire entre 4 et 6 kDa. Ils ont une activité antibactérienne contre certaines bactéries Gram positives, telles les staphylocoques, *Sarcina* spp., *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes*. Malgré leur potentiel antibactérien les caséidines tout comme les autres peptides laitiers à activité antimicrobienne ne sont pas exploités, car ils ne peuvent compétitionner avec les antibiotiques qui sont plus efficaces à des concentrations beaucoup moins élevées. En effet, lors des tests *in vitro*, les caséidines ont besoin d'une concentration significativement plus élevée pour être efficace contre les bactéries

(Benkerroum 2010). L'isracidine est un autre peptide antimicrobien produit à partir de l' $\alpha_{s1}$ -caséine bovine par l'enzyme chymosine. Celui-ci serait actif, *in vitro*, contre certaines bactéries Gram-positives et Gram-négatives à des concentrations élevées : entre 0,1 et 1 mg/mL (Benkerroum 2010). Il existe de nombreux peptides provenant de la digestion des caséines. Ceux-ci seront présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 3). Finalement, les caséines et protéines de lactosérum présentes dans le babeurre peuvent jouer un rôle dans l'activité antimicrobienne des peptides provenant de celui-ci. Les caséicines  $\alpha$  et  $\beta$  sont de petits peptides antimicrobiens cationiques, identifiés après la fermentation des caséinates de sodium par *Lactobacillus acidophilus* (McDonnell, Rivas et al. 2012). Ces deux peptides ont prouvé une activité antimicrobienne spécifique à certaines souches de bactéries Gram positives et Gram négatives, dont *E. coli* O157 :H7. Par contre, très peu d'études ont étudié l'application de ces peptides antimicrobiens dans la chaîne alimentaire ainsi que leurs activités antimicrobiennes (McDonnell, Rivas et al. 2012).

**Tableau III:** Peptides antimicrobiens dérivés de la caséine, relargués en fonction de différentes protéases digestives ainsi que leurs propriétés (Benkerroum 2010).

<b>Peptides antimicrobiens</b>	<b>Source</b>	<b>Protéase</b>	<b>Activité</b>	<b>Propriété chimique principale</b>
Casécidines	$\alpha_{S1}$ -caséine bovine	Chymosine	Bactérie Gram positive	Glycopeptide cationique
Isracidine	$\alpha_{S1}$ -caséine bovine	Chymosine	Bactérie Gram positive et négative	Peptide cationique et hydrophobe
Casocidine-I f(150-188)	$\alpha_{S2}$ -caséine bovine	Trypsine	Bactérie Gram positive et négative, levure	Peptide cationique
f <sup>l</sup> (181-207) f(180-207) f(175-207) f(172-207) f(164-207)	$\alpha_{S2}$ -caséine bovine	Chymosine	Bactérie Gram positive et négative	Peptide cationique
f(165-170) f(184-208) f(203-208)	$\alpha_{S2}$ -caséine ovine	Pepsine	Principalement les bactéries Gram-positives	Peptide cationique
f(165-181)	$\alpha_{S2}$ -caséine ovine	Pepsine	Bactérie Gram positive et négative	Peptide cationique
Kappacine A <sup>d</sup> f(106-169)	<i>k</i> -caséine bovine	Chymosine	Bactérie Gram positive et négative	Phospho-peptide anionique
f(42-49)	<i>k</i> -caséine bovine	Pepsine	Bactérie Gram positive et négative	Cationique

<sup>l</sup>f : Position des acides aminés dans la chaîne protéique

<b>Peptides antimicrobiens</b>	<b>Source</b>	<b>Protéase</b>	<b>Activité</b>	<b>Propriété chimique principale</b>
f(64-75)				
f(28-30)	<i>k</i> -caséine bovine	Pepsine	Bactérie Gram négative principalement	Neutre
f(162-169) f(30-32)	<i>k</i> -caséine bovine	Pepsine	Bactérie Gram positive principalement	Neutre
f(141-146)	<i>k</i> -caséine bovine	Pepsine	Faiblement inhibiteur	Neutre
f(18-24)	<i>k</i> -caséine bovine	Pepsine	Peptide cationique	Cationique
f(118-121)	<i>k</i> -caséine bovine	Pepsine	Bactérie Gram négative principalement	Anionique
f(139-146)	<i>k</i> -caséine bovine	Pepsine	Bactérie Gram positive et négative	Anionique

## 4.2 Lactoferrine

### 4.2.1 Caractérisation et provenance

La lactoferrine est une glycoprotéine d'une taille d'environ 80 kDa de la famille des transferrines (Gifford, Hunter et al. 2005). Cette protéine est constituée d'une seule chaîne polypeptidique constituée de 689 acides aminés. Elle possède dans sa structure des sites de liaison aux ions de fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ), mais peut également se lier à d'autres molécules ioniques :  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ . Le fer est essentiel pour la croissance des bactéries. La liaison du fer par la lactoferrine inhibe la croissance bactérienne, puisqu'il est moins disponible dans le milieu (Hoek, Milne et al. 1997). Elle est retrouvée dans la majorité des fluides biologiques des mammifères; par exemple le lait, les larmes et le mucus (Bellamy, Takase et al. 1992). En plus de son activité antibactérienne, la lactoferrine joue un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire ainsi que dans certaines fonctions cellulaires (Tomita, Wakabayashi et al. 2002). Le lait d'un bovin mature possède une concentration de lactoferrine variant entre 0,1 et 0,3 mg/ml (Dionysius and Milne 1997).

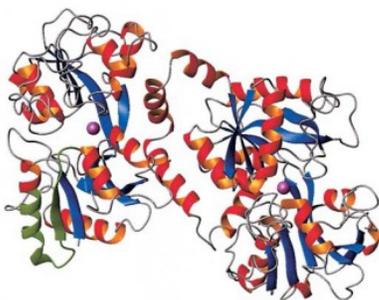
### 4.2.2 Activités connexes - Appui au système immunitaire

Selon Tomita, Wakabayashi et al. (2002), l'administration par voie orale de la lactoferrine provoque plusieurs effets sur le système immunitaire des modèles animaux et humains. Il y aurait une augmentation de la concentration d'IgA et d'IgG dans les fluides intestinaux des souris après l'administration. Il y aurait aussi une prolifération des plaques de Peyer et des splénocytes. De plus, une augmentation du nombre de cellules NK (*Natural Killer cells*), de cellules lymphocytaires T  $\text{CD4}^+$  et de cellules lymphocytaires T  $\text{CD8}^+$  dans le sang périphérique et dans le petit intestin des souris ayant des cellules tumorales serait possible (Tomita, Wakabayashi et al. 2002). La concentration de ces cellules augmente aussi dans le sang, le petit intestin et le foie des souris exempt de cellules tumorales. De plus, l'administration orale de lactoferrine induit la sécrétion d'IL-18 (interleukine-18) par les cellules épithéliales du petit intestin. La présence d'IL-18 augmente l'activité des cellules Th1, augmente l'activité des cellules NK et l'activité cytotoxique des lymphocytes. D'autres études montrent que la production d'interféron- $\gamma$  et d'IL-10 (interleukine 10) par les cellules du foie augmenterait (Tomita,

Wakabayashi et al. 2002). En résumé, l'administration par voie orale de la lactoferrine ou d'un de ses dérivés pourrait stimuler l'immunité au niveau des muqueuses intestinales, en plus de mener à l'inhibition d'une infection comme le développement d'une tumeur (Tomita, Wakabayashi et al. 2002)

#### 4.2.3 Lactoferricine

La digestion de la lactoferrine par la pepsine permet l'obtention d'un peptide actif cationique, nommé lactoferricine (Bellamy, Takase et al. 1992). Celle-ci est formée des résidus d'acides aminés 17 à 41 de la protéine de lactoferrine bovine. La lactoferricine possède une structure en boucle grâce à des liaisons disulfures intramoléculaires (Figure 3) (Gifford, Hunter et al. 2005). L'habilité à former des structures amphipatiques avec une face hydrophobe et chargée positivement est une caractéristique que possède la lactoferricine et que l'on retrouve également chez d'autres peptides ayant des propriétés antimicrobiennes. Ce peptide conserve certaines caractéristiques propres à la lactoferrine, mais possède de nombreuses autres particularités. La lactoferricine serait le domaine ayant une grande activité antibactérienne de la lactoferrine (Tomita, Wakabayashi et al. 2002). Inversement à la lactoferrine, la lactoferricine ne peut se lier aux molécules de fer. Ce serait plutôt sa charge cationique qui lui permettrait d'avoir des fonctions antimicrobiennes (Lacasse, Lauzon et al. 2008). La présence des LPS (lipopolysaccharides) présents à la surface de la membrane externe des bactéries Gram négatives et la couche d'acides téichoïques autour de la membrane cytoplasmique des bactéries Gram positives, toutes deux chargées négativement, permettent une attraction électrostatique et la liaison du peptide cationique à la surface des cellules bactériennes (Gifford, Hunter et al. 2005). Selon une étude, l'acétylation des charges positives diminuerait son efficacité (Lacasse, Lauzon et al. 2008).



**Figure 3 :** Structure tridimensionnelle de la lactoferrine B. Les sections bleues représentent des feuillets bêta, les sections rouges et oranges représentent des hélices alpha et la section verte montre la lactoferricine B. Figure tirée de Gifford, Hunter et al. (2005)

#### 4.2.3.1 Activités biologiques

En ce qui concerne la lactoferricine, Gilford et al (2005) mettent en évidence la présence de 5 activités biologiques: (i) antibactériennes, antifongiques et antiparasitaires, (iii) antivirales, (iv) antitumorales et (v) immunomodulation (Gifford, Hunter et al. 2005, Tiihonen, Kettunen et al. 2010).

##### i. Activités antibactériennes

La lactoferricine possède des caractéristiques lui permettant d'être antibactérienne. En effet, chez les bactéries Gram négatives, la lactoferricine, chargée positivement dans l'intestin à pH neutre, agirait en s'associant à la membrane externe, qui possède une charge négative, ce qui neutraliserait la membrane externe, créant des trous dans celle-ci et lui permettant de pénétrer à l'intérieur de la cellule. Les peptides de lactoferricine peuvent aussi lier les cations divalents présents sur les sites de liaisons des LPS et rompre la membrane (Hancock and Chapple 1999, Gifford, Hunter et al. 2005). Les bactéries Gram positives, quant à elles, sont également susceptibles à la lactoferricine, malgré l'absence de membrane lipidique externe, via la couche d'acides téichoïques. Contrairement aux peptides antimicrobiens qui forment des pores ou endommagent la membrane cytoplasmique, la lactoferricine semblerait ne pas l'affecter de façon importante (Gifford, Hunter et al. 2005). En effet, elle affecterait légèrement la perméabilité de la membrane, permettant le passage de petits ions, ce qui provoque la perte de l'équilibre électrochimique transmembranaire et du gradient de pH. La lactoferricine traverse la membrane par la formation de micelles, créant des cavités hydrophiles, ce qui permettrait aux peptides de pénétrer la cellule. Le cytoplasme contient plusieurs sites d'interactions pour la lactoferricine. Chez les bactéries Gram positives autant que les Gram négatives, la lactoferricine est en mesure d'inhiber la synthèse de macromolécules et d'affecter la synthèse de l'ADN et de l'ARN, menant à la mort des cellules (Gifford, Hunter et al. 2005).

Bellamy, Takase et al. (1992) ont démontré que la lactoferricine bovine serait efficace contre *E. coli* 0111 à une concentration minimale inhibitrice faible de 100

$\mu\text{g} / \text{mL}$ . Près d'une trentaine d'espèces bactériennes ont été testées, démontrant un effet positif in vitro. Dans la majorité des cas, la concentration minimale inhibitrice varie entre 0.3 et 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en fonction de la souche et du milieu de culture utilisé (Bellamy, Takase et al. 1992).

ii. Activités antifongiques et antiparasitaires

La lactoferricine serait efficace contre des levures (*Candida albicans*), des moisissures et des champignons filamenteux. Il existe deux modes d'actions de ce peptide. Premièrement, la lactoferricine interagit avec la membrane plasmique, résultant en la dissipation du gradient de protons. De plus, ce peptide affecte le cytoplasme des champignons en provoquant l'agrégation du matériel cytoplasmique des cellules exposées. Deuxièmement, la lactoferricine provoquerait l'augmentation de la réponse immunitaire de l'hôte en augmentant l'activité des leucocytes polymorphonucléaires (PMN), ce qui mènerait à l'augmentation de la production de défensines.

iii. Propriétés antivirales

Les propriétés antivirales proviennent principalement de la protéine entière, c'est-à-dire de la lactoferrine. La lactoferricine possède une moins grande activité. L'efficacité de la lactoferrine provient de son affinité avec les héparines sulfates (Yen, Shen et al. 2011) et les glycosaminoglycanes (Gaggia, 2010), qui sont des sites de liaisons des virus sur la membrane cellulaire. La liaison à ces molécules permet la prévention de la liaison des molécules virales et empêche leur entrée dans la cellule. Puisque la lactoferricine est formée de la région de liaison de l'ADN de la lactoferrine, elle peut également augmenter la réponse cellulaire face à une attaque virale (Gifford, Hunter et al. 2005).

iv. Propriétés anti-tumorales

La lactoferrine autant que la lactoferricine ont un effet sur plusieurs types de cellules tumorales, dont les cellules leucémiques, les fibrosarcomes, les mélanomes ainsi que les colons-carcinomes à des concentrations qui n'affectent pas les fibroblastes et les érythrocytes normaux. La liaison de la lactoferricine est possible grâce aux modifications de la membrane cellulaire des cellules tumorales. Par exemple, l'exposition de la phosphatidylsérine, chargée

négativement grâce à la perte de l'asymétrie des phospholipides chez les cellules malades. Cette liaison mène à la rupture de la membrane et au déclenchement de l'endonucléase  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  et de la voie apoptotique oxydante dépendante.

v. Immunomodulation

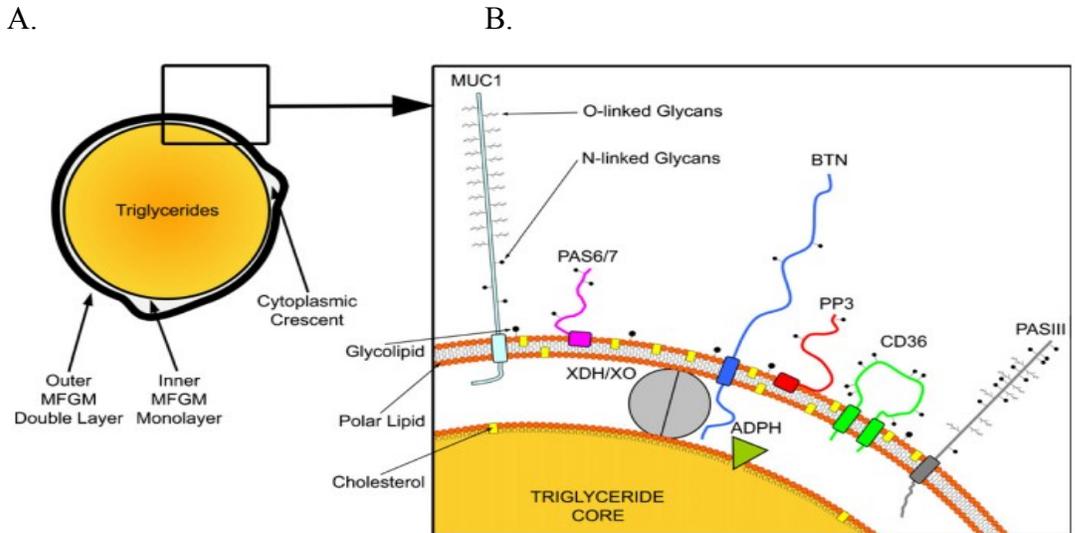
La lactoferricine joue un rôle au niveau de la réponse inflammatoire. En effet, plusieurs molécules sont libérées lors de la division ou la mort des cellules telles que des endotoxines (LPS) et des oligonucléotides CpG (Cytosine triphosphate déoxynucléotide (C), lien phosphodiester (p), guanine triphosphate déoxynucléotide (G)) non-méthylés, qui stimulent le système immunitaire, menant à une réponse inflammatoire (Gifford, Hunter et al. 2005). En liant et neutralisant les CpG, la lactoferricine prévient l'activation des cellules mononuclées, produisant la sécrétion de cytokines telles les interleukines et le TNF (facteur de nécrose tumoral). Ceci mène à une réponse inflammatoire, un choc septique et la mort des cellules. Un rôle supplémentaire de la lactoferricine comme agent immunologique provient de sa capacité à lier l'ADN (Gifford, Hunter et al. 2005). Une fois à l'intérieur du cytoplasme, les peptides peuvent pénétrer la membrane nucléaire et agir comme facteur de transcription en activant les gènes impliqués dans la défense des cellules.

4.3 Babeurre

Le babeurre est un coproduit de l'industrie beurrière, qui correspond à la phase liquide produite lors du barattage de la crème pour la fabrication de beurre. Ce produit a longtemps été négligé et est rarement utilisé comme produit en alimentation. La production mondiale de babeurre correspond approximativement à la production de beurre, qui était d'environ  $8.6 \times 10^6$  tonnes, en 2006 (Vanderghem, Bodson et al. 2010). Dans le but de valoriser ce produit, le babeurre est quelquefois utilisé dans l'alimentation animale ainsi qu'incorporé dans certains produits laitiers et certains produits de boulangerie, comme agent émulsifiant. Depuis quelques années, plusieurs études sur ce produit ont été menées et ont démontré des propriétés intéressantes (Vanderghem, Bodson et al. 2010).

Les principaux composants du babeurre sont similaires à ceux du lait écrémé c'est-à-dire : lactose, minéraux, caséines et protéines du lactosérum. Ces composants peuvent

être isolés, purifiés et utilisés dans certains aliments ou pour des applications autres qu'alimentaires. De plus, le babeurre possède un haut contenu en membranes de globule de gras du lait (MFGM). Les MFGM sont présents dans la phase aqueuse lors du barattage de la crème. Elles sont formées par une membrane biologique principalement composée de protéines, phospholipides, glycoprotéines, lipides neutres et d'enzymes (Vanderghem, Bodson et al. 2010). La majeure partie de la membrane des MFGM est dérivée de la membrane plasmique des cellules sécrétrices. Un noyau formé de triglycérides est entouré d'une monocouche de lipides polaires, à leur tour, entourée par une membrane à double couche, formée aussi de lipides polaires (Figure 4A). Les lipides polaires présents consistent plus précisément en des phospholipides et sphingolipides. Les protéines présentes dans les MFGM sont disposées de façon asymétrique. L'adipophiline (ADPH) possède une grande affinité pour les triglycérides et se retrouve dans la monocouche interne. La protéine oxydase xanthine (XDH/XO), présente à la surface de la monocouche, est liée à la Butyrophiline (BTN), une protéine transmembranaire présente sur la bicouche, qui est elle-même liée à ADPH. La liaison de ces trois protéines crée un complexe permettant de connecter et stabiliser la membrane interne avec la membrane externe des globules de gras (Figure 4B). La mucine 1 (MUC1), le cluster de différenciation (CD36) et l'acide périodique Shift III (PASIII) sont liés à la bicouche membranaire, tandis que la lactadhérine (PAS 6/7) et la peptone protéose 3 (PP3) sont seulement attachées à la membrane externe de la bicouche lipidique (Dewettinck, Rombaut et al. 2008).



**Figure 4 :** Structure d'un globule de gras et l'arrangement des principales protéines des MFGM (Dewettinck, Rombaut et al. 2008).

Au moment de la sécrétion et de la traite de la vache, la composition et la structure des MFGM sont sujettes à des modifications selon l'âge de la vache, la qualité bactériologique du lait, le stade de lactation et la saison. Ces effets sont minimes en comparaison avec les effets du traitement du lait sur la composition des MFGM (Dewettinck, Rombaut et al. 2008). Les MFGM sont composées de 1 à 4 % des protéines totales présentes dans le lait. Malgré leur contenu faible en protéines, elles jouent un rôle important dans plusieurs processus cellulaires et dans les mécanismes de défense des nouveau-nés. Dépendamment des études et de la source, les MFGM sont composées entre 25 et 60% de protéines (Vanderghem, Bodson et al. 2010). Environ 28 enzymes ou activités enzymatiques ont été détectées dans les préparations de MFGM.

#### 4.3.1 Propriétés biologiques des MFGM

Selon Dewettinck et *al.* (2008), les sphingolipides auraient un effet antibactérien. En effet, ils auraient la capacité de jouer un rôle protecteur contre les toxines bactériennes et contre les infections virales et bactériennes, en compétitionnant pour les sites de liaison et en devenant un site de liaison pour les bactéries. Cette compétition nuit aux pathogènes intestinaux, car la première étape d'une infection est l'adhésion aux muqueuses

intestinales (Dewettinck, Rombaut et al. 2008). De plus, les protéines oxydases xanthines (XDH/XO) auraient aussi un impact antibactérien à l'intérieur du tractus gastro-intestinal. Ce système catalyse la réduction du nitrite inorganique en oxyde nitrique et en présence d'oxygène, il convertirait en oxyde nitrique et en peroxy-nitrite. Ces deux substances ont des propriétés antibactériennes. Comme mentionné précédemment, les MFGM créent des sites de liaison en compétitionnant avec les sites présents sur la membrane épithéliale, ce qui rend en même temps les bactéries plus disponibles à l'action du XDH/XO. Un effet aurait été observé chez les souches suivantes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Salmonella enteritidis* (Dewettinck, Rombaut et al. 2008). Par exemple, la lactophoricine, un peptide amphipathique cationique provenant du lait de vache, a démontré un effet antimicrobien contre les bactéries Gram-positives et négatives. Ce peptide est produit *in vitro* à partir de composants 3 de lait présent dans la fraction MFGM (Campagna, Mathot et al., 2004). Les peptides antimicrobiens du MFGM sont ajoutés à des peptides de protéines du lait telles que les caséines et les protéines du petit-lait lors de la protéolyse. Ce mélange de protéines pourrait donc augmenter l'efficacité antimicrobienne du babeurre.

#### 4.4 Origine végétale

L'ajout de protéines végétales dans l'alimentation est une pratique beaucoup moins fréquente que l'ajout de protéines animales. La production de protéines par les végétaux demande l'utilisation de moins d'énergie que l'utilisation de protéines animales et serait donc plus économique (Taherian, Mondor et al. 2011). En effet, les protéines provenant de plantes sont fréquemment utilisées pour améliorer la texture ou les qualités nutritionnelles des aliments. Leur utilisation permet d'obtenir la texture d'un gel, tout en réduisant la concentration finale en lipide dans le produit (Taherian, Mondor et al. 2011). Le potentiel de production de peptides antimicrobiens à partir de protéines végétales demeure à ce jour très limité.

##### 4.4.1 Pois

La production mondiale totale de pois est de 10,3 millions de tonnes métriques (Taherian, Mondor et al. 2011). Les pois sont une des légumineuses les plus cultivées dans différentes parties du monde, car ils ont une grande importance nutritive (Ndiaye, Vuong et al. 2012). Il y a 25 millions d'hectares de pois cultivés annuellement dans le monde

(Rubio, Pérez et al. 2014). Le Canada est le plus grand producteur et exportateur de pois séchés, avec une production annuelle atteignant 30% de la production mondiale en 2007-2008 (Pownall, Udenigwe et al. 2010). Son utilisation est récente dans le domaine industriel. Les protéines de pois sont des sous-produits de l'extraction de l'amidon. Leur valorisation en tant que produit est importante. Celles-ci sont composées de plusieurs types d'acides aminés, avec une teneur particulièrement élevée en lysine (Taherian, Mondor et al. 2011). De plus, les pois seraient constitués d'approximativement 25% de protéines (Pownall, Udenigwe et al. 2010). Ces protéines sont principalement : l'abumine, les défensines, la convicine, la viciline, la provicine et la légumine (Rubio, Pérez et al. 2014). L'hydrolyse des protéines de pois permettrait d'obtenir des peptides ayant des propriétés antioxydantes et un potentiel d'immuno-modulation (Ndiaye, Vuong et al. 2012). L'activité anti-oxydante des peptides provenant de l'hydrolysate des protéines de pois varie en fonction de la quantité d'acides aminés aromatiques et de constituants hydrophobes (Pownall, Udenigwe et al. 2010). Selon Pownall, Udenigwe et al. (2010), les pois seraient composés de 17,69 % d'acides aminés chargés positivement (arginine, histidine, lysine) et de 28,35 % d'acides aminés chargés négativement (acide aspartique, acide glutamique, acide aminé aromatique). Lorsque les protéines sont hydrolysées par la thermolysine, il y aurait un total de 14,54 % de peptides anioniques et 27,71 % de peptides cationiques (Pownall, Udenigwe et al. 2010).

#### 4.4.2 Défensine

Les plantes possèdent des défensines, qui permettent la protection contre les pathogènes. Cette famille de protéines est composée de petits peptides ayant entre 45 à 54 acides aminés. Les défensines sont divisées en quatre groupes, en fonction de leur structure et de leur fonction (Almeida, Cabral et al. 2000). Le groupe 1 regroupe les défensines qui inhibent la croissance de *Fusarium culmorum* et qui causent des déformations aux hyphes des champignons. Le groupe 2 comprend les défensines qui empêchent la croissance fongique, sans causer de déformations. Le groupe 3 correspond aux défensines qui ne possèdent pas d'activités antifongiques. Finalement, le quatrième groupe inclut les défensines ayant des activités antifongiques et antibactériennes (Almeida, Cabral et al. 2000). Deux peptides ont été isolés des semences de pois, *Psd 1* et *Psd 2*. Ces 2 peptides ont démontré une activité antimicrobienne contre des pathogènes du pois et contre

plusieurs champignons. Ils sont retrouvés dans les tissus épidermiques et dans les vaisseaux vasculaires, ce qui permet de croire qu'ils jouent un rôle important dans les mécanismes de défense des pois (Almeida, Cabral et al. 2000).

#### 4.5 Production des peptides antimicrobiens

La méthode utilisée pour ce mémoire a été basée sur Bellamy, Takase et al. (1992), mais avec quelques modifications. Ceux-ci ont produit des peptides à partir de la lactoferrine humaine et bovine. Celle-ci est dissoute à une concentration de 5% dans l'eau distillée et le pH est ajusté à 3, par l'ajout de HCL 1M. L'hydrolyse est effectuée avec la pepsine (3% p/p) à 37°C pour une durée de 4 heures. L'hydrolyse est arrêtée en chauffant les échantillons à 80°C durant 15 minutes. Le pH est ajusté à 7 avec du NaOH 1M. Par la suite, les échantillons sont centrifugés à 15000G pour 30 minutes et le surnageant est conservé et lyophilisé. Dans cette étude, les peptides ne sont pas fractionnés en fonction de leur charge. Théolier, Hammami et al. (2013) ont purifié des peptides en utilisant un système HPLC en phase inverse, avec une colonne C18 (4.6 mm; Phenomenex, Torrance, USA). Un gradient linéaire de 2 % à 60 % de TFA 0.1 % dans de l'acétonitrile a été utilisé, pour une durée de 10 minutes, à un débit de 1 mL/min. L'élution des peptides a été contrôlée par la mesure de l'absorbance à 214 nm. La concentration de chacun des extraits peptidiques a été mesurée par la méthode de Pierce, utilisant de l'acide bicinchoniques (BCA, Biotechnology, Rockford, USA). Chan and Li-Chan (2007) ont plutôt utilisé une cartouche industrielle ayant une résine échangeuse de cations. L'élution a été effectuée avec un tampon phosphate et du NaCl à différentes concentrations (0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 2.0 M), en fonction de l'étape. L'élution a été suivie par des mesures d'absorbance à 280 nm. Les fractions ont été lyophilisées et congelées pour les analyses.

#### 4.6 Derniers développements dans l'utilisation des peptides antimicrobiens

Le marché mondial et l'intérêt pour les produits dérivés du lait ne cessent d'augmenter. Les peptides produits à partir des protéines du lait peuvent être utilisés comme suppléments alimentaires et comme médicaments (Sibel Akalin 2014). Ainsi, les peptides antimicrobiens peuvent être utilisés comme alternative aux médicaments composés de molécules de faible poids moléculaire. Ils offrent l'avantage d'avoir une bio activité

élevée, d'être spécifiques à une cible, d'avoir un large spectre d'action, d'avoir une toxicité faible, d'avoir une structure diversifiée et un taux d'accumulation faible dans les tissus. De plus, contrairement aux antibiotiques, les peptides n'auraient presque pas d'effets secondaires connus à ce jour. L'utilisation de peptides serait sécuritaire et demanderait moins de recherches toxicologiques durant la recherche, le développement et les essais cliniques, ce qui diminuerait les coûts de production (Sibel Akalin 2014).

#### 4.7 Limites de l'utilisation des peptides antimicrobiens

L'utilisation de peptides antibactériens est limitée, car leur action nécessite des concentrations plus importantes que celle des antibiotiques. *In vitro*, ils démontrent une efficacité beaucoup plus faible, de l'ordre des milligrammes par mL comparativement à quelques microgrammes pour les antibiotiques courants. De plus, les peptides cationiques sont moins efficaces pour le traitement des maladies systémiques. Il existe d'autres inconvénients à l'utilisation de peptides comme agent thérapeutique. Premièrement, leur faible solubilité rend difficile la distribution aux tissus ou cellules cibles, ainsi que le transport à travers les membranes (Sibel Akalin 2014).. Deuxièmement, les peptides sont fréquemment de nature cationique. Ils ont donc tendance à se fixer aux surfaces chargées négativement, ce qui diminue leur efficacité lors de leur administration (Benkerroum 2010). Il existe par contre des alternatives, comme l'encapsulation Troisièmement, les effets systémiques de l'administration à long terme ne sont pas connus. Finalement, les coûts de production des peptides sont élevés (Sibel Akalin 2014). Jusqu'à présent, il est difficile de rendre la production des peptides au niveau commercial. La production doit être à plus grande échelle et les méthodes et protocoles doivent être optimisés, sans quoi les coûts de production sont beaucoup trop élevés (Sibel Akalin 2014). C'est pour cela que la valorisation de sous-produit provenant de la production d'aliments, afin de produire des extraits peptidiques, est une avenue envisageable et prometteuse.

## 5 Applications industrielles des peptides antimicrobiens en alimentation humaine et animale

Un des buts futurs de ce projet de recherche est d'être en mesure d'appliquer la méthode de production des peptides développée à un niveau industriel. La lactoferrine et la nisine sont deux exemples de peptides antimicrobiens déjà connus et utilisés.

### 5.1 Lactoferrine

La lactoferrine est un exemple d'additif de nature protéique ayant été approuvé pour utilisation dans l'industrie alimentaire, et ce, dans de nombreux pays (Benkerroum 2010). La lactoferrine est isolée et purifiée à l'échelle industrielle à partir de lactosérum de fromage et de lait écrémé, produisant annuellement entre 20 et 30 tonnes dans le monde (Tomita, Wakabayashi et al. 2002). La concentration de lactoferrine dans le lactosérum de fromage est de 100 mg/L. La lactoferrine est ajoutée comme supplément dans des préparations pour enfants, des laits pour les diabétiques, du lait écrémé, du yogourt, de la gomme et des suppléments alimentaires. À l'extérieur du domaine alimentaire, elle est retrouvée dans des cosmétiques, dans des diètes thérapeutiques pour les chiens et chats, et dans la nourriture préparée pour l'aquaculture (Tomita, Wakabayashi et al. 2002).

### 5.2 Nisine

La nisine est un peptide antimicrobien de 34 acides aminés produit par des *Lactococcus lactis* en réponse à la présence de compétition dans leur milieu. Ils sont actifs contre la croissance de plusieurs bactéries Gram positives. Effectivement, ce peptide cationique est efficace contre plusieurs souches de bactéries pathogènes telles les *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* et *Listeria* (Mitra, Mukhopadhyay et al. 2011). De plus, la nisine est capable de tuer des bactéries résistantes à des antibiotiques. En effet, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) serait résistant à la vancomycine, mais sensible à la nisine (Bahar and Ren 2013).

Des productions industrielles à faible coût ont été développées afin de produire de la nisine (Jozala, de Lencastre Novaes et al.). La nisine a montré des résultats concluants lorsqu'utilisée comme préservatif antimicrobien pour la conservation du lait, de la viande, du fromage, du lait évaporé, des légumes, du poisson et des produits en conserve

(Mitra, Mukhopadhyay et al. 2011). Elle est utilisée dans plus de 50 pays à travers le monde. La nisine commerciale a été reconnue comme sécuritaire par l'*US Food and Drug Administration* (FDA) en 1988 (Mitra, Mukhopadhyay et al. 2011).

## **OBJECTIFS**

L'objectif de l'étude consiste premièrement à développer une stratégie afin de produire des peptides bioactifs provenant de sources animales, le babeurre et la lactoferrine et d'une source végétale, le pois, en utilisant une méthode de chromatographie sur membrane. Par la suite, le second objectif est de déterminer *in vitro* si des extraits peptidiques totaux, cationiques, anioniques et non liés, provenant de babeurre, de lactoferrine et de pois auraient une activité antimicrobienne permettant l'élimination ou la diminution de la population bactérienne de différentes souches de pathogènes entériques chez la volaille. Ces souches sont les suivantes : *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. L'évaluation de l'activité antimicrobienne des peptides est basée sur leur effet bactéricide, c'est-à-dire la baisse de population bactérienne suite au traitement par des extraits peptidiques. Suite à ces objectifs, les hypothèses émises sont les suivantes. Premièrement, il sera possible de produire des peptides bioactifs qui proviennent de babeurre, de lactoferrine et de pois, en utilisant une méthode de chromatographie sur membrane. Deuxièmement, les fractions totales et cationiques de ces peptides, provenant de trois sources différentes, auront une activité antimicrobienne contre les différentes souches de bactéries pathogènes entériques testées ainsi que sur *Staphylococcus aureus*.

1 **CHAPITRE 2: ARTICLE**

2

3 **Antimicrobial activity of buttermilk and lactoferrin peptides extracts on**  
4 **poultry pathogens**

5 Catherine Jean<sup>\*,†</sup>, Martine Boulianne<sup>\*</sup>, Gilles Robitaille<sup>†</sup>

6 <sup>\*</sup>Chair in Poultry Research, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal and

7 <sup>†</sup>Agriculture and Agri-Food Canada, Saint-Hyacinthe, Canada

8

9 **INTERPRETIVE SUMMARY**

10 Antibiotics are frequently used in poultry feed as growth promoters. The main side effect  
11 is the development of antibioresistance. One alternative to antibiotics is the use of  
12 antimicrobial peptides (AMPs) as feed supplements. Buttermilk and lactoferrin, are  
13 interesting sources of AMP. A fast and reliable method to produce cationic peptides,  
14 from pepsic hydrolysis of buttermilk and lactoferrin, with antimicrobial activities against  
15 *Escherichia coli* O78:H80 and TK3 O1:K1, *Salmonella* Typhimurium and Enteritidis and  
16 *Staphylococcus aureus*, is proposed. This has potential for the development of new  
17 alternatives with antimicrobial peptides of protein sources as functional ingredient in  
18 poultry feed.

19

## ABSTRACT

20 Antibiotics are frequently used in poultry feed to prevent various diseases. These practices  
21 caused the emergence of resistant strains of intestinal pathogenic bacteria. Antibioresistance is  
22 a big challenge and poultry producers will have to limit their use as growth promoters. One  
23 alternative to antibiotics is the use of antimicrobial peptides (AMPs). AMPs are encrypted  
24 within endogenous precursor proteins and are activated by proteolysis. They can also be  
25 generated from food proteins following gastrointestinal digestion or fermentation. Buttermilk  
26 and lactoferrin, are interesting sources of AMPs. The objective of this study was to develop  
27 peptide production methods based on adsorptive membrane chromatography from buttermilk  
28 and lactoferrin and to test those peptides for their antimicrobial properties against specific  
29 poultry pathogens (*Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*) and  
30 *Staphylococcus aureus*. Buttermilk and lactoferrin were digested with pepsin (6h, pH 2.5) and  
31 ultra-filtrated (< 10 kDa). The peptide extracts were split depending on their charges through  
32 cation and anion-exchange membranes using Mustang cartridges. Peptide production yields  
33 for buttermilk and lactoferrin were 6.5 and 15.4% for cationic and 7.0 and 16.2% for anionic  
34 extracts, respectively. The antimicrobial activity was assessed with a micro-dilution technique  
35 in microplate. Our results indicate that cationic peptide extracts was effective at  $\leq 5$  mg/mL  
36 against the selected strains, with a 3 log loss for *Escherichia coli* O78:H80. Cationic extract  
37 was more effective than total extract from buttermilk. Anionic and unbound peptides extracts  
38 had a weak activity on bacterial strains. In comparison, cationic extracts from prepared  
39 lactoferrin, showed an effect at  $\leq 0.6$  mg/mL. Total lactoferrin extracts had a LD<sub>99</sub> between 1.3  
40 and 2.5 mg/mL. The absorptive membrane chromatography was an effective method for the  
41 fractionation of cationic and anionic peptides extracts from buttermilk and lactoferrin  
42 hydrolysates. Also, antimicrobial activities were significantly improved when cationic peptide  
43 extracts were tested against pathogens compared to total peptides extracts from buttermilk and  
44 lactoferrin. These results are very promising for the development of alternative or a  
45 complement for reducing antibiotic use, with buttermilk antimicrobial peptides as functional  
46 ingredient in poultry feed.

47

48

## KEY WORDS

49 Antimicrobial peptides extract, buttermilk, lactoferrin, avian pathogen, absorptive membrane  
50 chromatography

51

## INTRODUCTION

52 Antibiotics are used in animal farming in order to prevent or treat bacterial diseases as well as  
53 growth promoters (Corpet 2000, Lin, Hunkapiller et al. 2013). There are side effects caused by  
54 these practices such as the emergence of resistant strains after long exposure to antibiotics.  
55 Those practices induce negative effects on human health and on illness treatment. Indeed,  
56 antibioresistance is considered the biggest challenge of the 21<sup>st</sup> century (Marshall and Levy  
57 2011). In the past few years, many countries, mostly in the European community, have begun  
58 to ban antibiotics used as growth promoters. It is becoming increasingly important to find  
59 alternatives for antibiotics use. Proposed potential alternatives included probiotics (Kaur,  
60 Kuhad et al. 2009, Gaggia, Mattarelli et al. 2010, Waewdee, Sukon et al. 2012, essential oils  
61 (Brenes and Roura 2010, Tiihonen, Kettunen et al. 2010, Alleman, Gabriel et al. 2013),  
62 vaccination (Dahiya, Wilkie et al. 2006), bacteriophage therapy (Atterbury 2007, Wong, Sieo  
63 et al. 2014), bacteriocins (Stern, Svetoch et al. 2005) and finally, the use of AMPs as  
64 suggested by Joerger and collaborators (Joerger 2003).

65 Antimicrobial peptides (AMPs) are naturally present in almost all living organisms including  
66 bacteria (bacteriocins), yeasts and moulds, plants (thionins), insects, birds, arthropods and  
67 mammals (defensins, cathelicidins) (Hancock and Chapple 1999). Some AMPs are found in  
68 chicken; gallinacins are antimicrobial peptides found in leukocytes (Harwig, Swiderek et al.  
69 1994) while cathelicidins are expressed throughout gastrointestinal, respiratory and urogenital  
70 tracts (Achanta, Sunkara et al. 2012). AMPs are encrypted within endogenous precursor  
71 proteins and are released by proteolysis. Interestingly, AMPs can also be generated from food  
72 proteins following gastrointestinal digestion through the action of digestive enzymes or during  
73 fermentation. Dairy products are an interesting source of AMPs (Benkerroum 2010). Some  
74 bioactive peptides from milk are known for their antimicrobial activities and can be potentially  
75 used in functional foods, nutraceuticals and pharmaceuticals, to prevent diseases (Benkerroum

76 2010, Sibel Akalın 2014). Some AMP have the potential to target key cellular processes, such  
77 as DNA and protein synthesis, protein folding, enzymatic activity and cell wall synthesis  
78 (Sibel Akalın 2014). Proteolysis of proteins from casein and whey including lactoglobulin,  
79 lactalbumin and lactoferrin generates several antimicrobial peptides (Théolier, Fliss et al.  
80 2014); Milk AMP Database, 2013). These antimicrobial peptides had demonstrated activities  
81 against some bacterial strains. For example, bovine  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -La) hydrolysed with  
82 pepsin and trypsin inhibited metabolic activities of *E.coli* JM103 at concentration of 25  
83 mg/mL in comparison with unhydrolysed  $\alpha$ -La, which did not inhibit growth at 100 mg/mL.  
84 Peptides released from lactoglobulin by pepsin or trypsin digestion, have also demonstrated  
85 inhibition of *E.coli* JM103 at 25 mg/mL (Pihlanto-Leppälä, Marnila et al. 1999, Sibel Akalın  
86 2014). Recently, Théolier, Hammami et al. (2013) showed significant activities of whey  
87 proteins isolated and hydrolysed by gastrointestinal enzyme, pepsin, with minimal inhibitory  
88 concentrations between 20 and 35  $\mu$ g/mL. Casecidins from casein hydrolysis are effective  
89 against staphylococci, *Sarcina* spp., *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumonia* and  
90 *Streptococcus pyogenes*. Isracidins is another peptide released by chymosin cleavage of  $\alpha_{s1}$ -  
91 casein which has antimicrobial effect on Gram-positive and Gram-negative bacteria (Lahov  
92 and Regelson 1996) .

93 Lactoferrin is a glyco-protein found in biological fluids, like human and bovine milk. This  
94 protein has shown antibacterial properties, as well as a role in immune system and cellular  
95 functions (Bellamy, Takase et al. 1992, Tomita, Wakabayashi et al. 2002). Enzymatic  
96 digestion of bovine lactoferrin by pepsin results in a cationic peptide: the bovine lactoferricin  
97 (lactoferrin f (17-41), Sequence: Phe-Lys-Cys-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-  
98 Gly-Ala-Pro-Ser-Ile-Thr-Cys-Val-Arg-Arg-Ala-Phe). Interestingly, lacto-ferricin has been  
99 reported to be more effective than lactoferrin to control bacterial growth (Bellamy, Takase et  
100 al. 1992).

101 Buttermilk is a by-product from butter fabrication. Its composition is similar to skim milk and  
102 also contains milkfat globule membrane fraction (**MFGM**) including specific membrane  
103 associated proteins which may generate antimicrobial activity following proteolysis  
104 (Dewettinck, Rombaut et al. 2008). MFGM are composed principally of polar lipids  
105 (phospholipids and sphingolipids) and proteins (glycoproteins). Twenty-five (25) to seventy

106 (70) % of MFGM is composed of proteins such as mucin 1, xanthine dehydrogenase/oxidase,  
107 adidophilin and butyrophilin. Bovine MFGM composition is comprised of proteins and  
108 enzymes. Indeed, it includes immunoglobulins, proteins derived from cytoplasm and epithelial  
109 cells, proteins from milk leucocytes and skim milk constituent. MFGM proteins such as  
110 xanthine dehydrogenase/oxidase cause antimicrobial inhibition on growth of *Staphylococcus*  
111 *aureus*, *Escherichia coli*, and *Salmonella Enteritidis* by production of hydrogen peroxide, or  
112 the stimulation of lactoperidase in milk (Dewettinck, Rombaut et al. 2008). MFGM peptide  
113 extracts are effective against pathogens such as *E.coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*,  
114 *Salmonella* Typhimurium and *Pseudomonas fluorescens* (Clare, Zheng et al. 2008). For  
115 example, lactophoricin, a cationic amphipathic peptide from bovine milk, showed  
116 antimicrobial effect against Gram-positive and Gram-negative bacteria. This peptide is  
117 produced *in vitro* from Bovine milk component-3, present on MFGM (Campagna, Mathot et  
118 al. 2004). MFGM antimicrobial peptides are added to peptides from milk proteins such as  
119 caseins and whey proteins during proteolysis. This protein mix could therefore increase  
120 antimicrobial effectiveness of buttermilk.

121 The objective of this study was to develop a rapid and efficient method based on ultrafiltration  
122 and absorptive membrane chromatography, to prepare and fractionate peptide extracts, from  
123 buttermilk and lactoferrin pepsic hydrolysate, with a high *in vitro* antimicrobial activity. A  
124 simple microdilution assay on microplate assay was used for enumerating specific enteric  
125 poultry bacterial strains such as *Salmonella* Enteritidis (***S. Enteritidis***), *Salmonella*  
126 Typhimurium (***S. Typhimurium***), *Escherichia coli* (***E. coli***) and against *Staphylococcus*  
127 *aureus* (***S. aureus***).

## 128 MATERIALS AND METHODS

### 129 ***Peptide extracts production***

130 Buttermilk (Agropur, Qc, Canada) and lactoferrin (Euro Proteins Inc., Vitalarmor LF 1401,  
131 OH, USA) powder were dissolved in water, 5% w/w. Peptides were dialysed against with  
132 water (MWCO 12-14 kDa) for 24 hours at 4°C (Spectrum Laboratories Inc., ON, Canada).  
133 Solutions were digested with pepsin from porcine gastric mucosa (Sigma-Aldrich, ON,  
134 Canada) at 25 mg/mL (E/S 1:20) for 6 hours at pH of 2.5, at 37°C (Bellamy et al. 1992). After

135 digestion, samples were centrifuged at 7000 rpm for 30 minutes and the supernatant was ultra-  
136 filtrated with a molecular weight cut-off (**MWCO**) of 10 kDa (Kvick Start, GE Healthcare,  
137 QC, Canada). Ultrafiltration permeate was collected at this stage and analyzed as total peptide  
138 extracts (**TE**).

### 139 *Peptides fractionation*

140 Peptide extracts were fractionated on the basis of their charges through cation-exchange  
141 (Mustang S, Pall Corporation, ON, Canada) and anion-exchange (Mustang Q, Pall  
142 Corporation) membranes (Teeters, Root et al. 2002). The pH was adjusted at 5.0 with a  
143 NH<sub>4</sub>OH 1M (EMD, ON, Canada) and conductivity adjusted < 2mΩ/cm, by dilution with water  
144 when necessary. Solutions were filtrated on 0.22 μm membranes. Samples were applied on  
145 cartridge Mustang S membrane. The unbounded samples were kept for Mustang Q  
146 fractionation. The cartridge was washed with 350-400 mL of NH<sub>4</sub>OAc 10mM (A&C  
147 American Chemicals Ltd, QC, Canada), at pH 5.0. Cationic extracts were eluted from the  
148 cartridge with 1M NaCl (Fisher Scientific, ON, Canada), 50mM NH<sub>4</sub>OAc, at pH 9.0). The  
149 eluate was collected and kept frozen until use. Unbounded eluates from Mustang S  
150 fractionation were adjusted at pH 9.0 with NH<sub>4</sub>OH 1M, diluted approximately 3 times to  
151 decrease the conductivity (< 2mΩ/cm) and applied on Mustang Q anionic exchanger cartridge.  
152 After washing with 350-400 mL NH<sub>4</sub>OAc 10mM (pH 9.0), anionic extracts were eluted with  
153 1M NaCl, 50mM NH<sub>4</sub>OAc pH 5.0). Samples that did not specifically bind to any cartridge  
154 were considered unbound peptides extracts. For analytical purposes, samples must be desalted  
155 before analysis as high salt content inhibits *in vitro* antimicrobial tests. Desalting was achieved  
156 by reverse phase RP-HPLC on C<sub>12</sub> column (Phenomenex Jupiter 10 μm proteo 90A, CA,  
157 USA), using ethanol 80% to elute peptides. After desalting, samples were evaporated under  
158 nitrogen to evaporate ethanol and freeze-dried. Peptide contents were quantified using  
159 Pierce<sup>TM</sup> BCA protein Assay kit (Thermo Scientific, IL, USA). Kinetics of hydrolysis were  
160 evaluated by o-phthalaldehyde. Spectrophotometric Assay as described by Church, Swaisgood  
161 et al. (1983) with leucine as reference.

162  
163  
164  
165

166 **RP-HPLC**

167

168 For analytical purpose, peptide extracts (from 0.15 to 0.5 mg/ml in 0.1 % TFA) were injected  
169 at a flow rate of 1 ml/min, at 25°C, on a C18 column RP- HPLC column (Aeris PEPTIDE 3.6µ  
170 XB-C18, 250 X 4.6 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA), eluted with a linear gradient of  
171 0-60 % acetonitrile-0.1 % TFA for 30 min and detected at 214 nm. To enable *in vitro*  
172 antimicrobial tests, peptide extracts were desalted by absorption on RP-HPLC C12 semi-  
173 preparative column (Jupiter 10 µm proteo 90A, Phenomenex). Peptides extracts (250 mg)  
174 were solubilized in 0.1 % TFA and injected at a flow rate of 3 ml/min. The column was  
175 washed with 0.1 % TFA and samples were eluted with ethanol 80 % in water, and freeze-  
176 dried.

177 **SEC-HPLC**

178

179 HPLC size exclusion chromatography was conducted to determine the molecular distribution  
180 of three different protein hydrolysates. An Agilent Bio SEC-3 column (7.8 × 300 mm)  
181 connected to an Agilent-1200 Series HPLC system (Agilent Technologies Canada Inc.,  
182 Mississauga, ON, Canada) was used. The protein solution (100 uL) was loaded on the column,  
183 and eluted with 10 mM phosphate buffer, with 150 Mm NaCl (pH 7.8) at a flow rate of 1  
184 mL/min. The elution was monitored at 280 nm. Mixed gel filtration standards comprising  
185 thyroglobulin (670 kDa), γ-globulin (158 kDa), ovalbumin (44 kDa), myoglobin (17 kDa) and  
186 vitamin B<sub>12</sub> (1.35 kDa) from Bio-Rad Laboratories (Mississauga, ON, Canada) were used to  
187 estimate the molecular masses of the samples.

188 ***Bacterial strains***

189 Four poultry clinical isolates, supplied by the Chair in Poultry Research, the EcL laboratory of  
190 the Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal were used to test peptide  
191 efficiencies: *Salmonella* Enteritidis (SHY-04-1540), *Salmonella* Typhimurium (DT 104  
192 #4393), and *Escherichia coli* O78:H80 and Tk3 O1:K1. A Gram positive strain,  
193 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), was also tested.

194

195

196 ***Microbiological Assay***

197 Bacterial cultures were maintained in 20% glycerol (Sigma-Aldrich, ON, Canada) at  $-80^{\circ}\text{C}$ .  
198 Prior the experiments, the cultures were thawed, transferred at 1% (vol/vol) into tryptic soy  
199 broth (Fisher Scientific, ON, Canada), and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 18 h. The bactericidal  
200 activity tests were carried out essentially as described by Bellamy, Takase et al. (1992).  
201 Briefly, cells suspension were centrifuged at  $4\,000 \times g$  for 10 min and suspended in PYG  
202 twice concentrated (20g/L bacto-peptone, 20 g/L glucose (Becton Dickinson, ON, Canada),  
203 1g/ L yeast (Fisher Scientific, ON, Canada)) at approximately  $5 \times 10^7$  CFU/ml.

204 In each well, 0.1 mL of serial dilution from peptide extracts (0, 0.3, 0.6, 1.3, 2.5 and 5 mg/ml  
205 final concentration) were in contact with bacterial strains (25  $\mu\text{L}$ , bacterial concentration from  
206 approximately  $10^5$  to  $10^6$  CFU/mL) in PYG for 2 hours, at  $37^{\circ}\text{C}$ . The method of Brewster  
207 (2003) was used to measure the bacteria's survival. Briefly, after the 2 hour killing period, 125  
208  $\mu\text{L}$  of Brain Heart Infusion broth (Fisher Scientific, ON, Canada) was added to the wells  
209 containing bacterial suspensions that initiated growth of the bacteria who survived to the  
210 bactericidal effects of the peptide extracts. The lag time needed to reach 0.1  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  (**Tlag**<sub>0.1</sub>)  
211 of growth was obtained and compared to the Tlag<sub>0.1</sub> from standard curve established with  
212 various initial bacterial counts.

213 ***Statistical analyses***

214 Analysis of variance (SAS software package; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was  
215 performed on the data (5 bacterial strains, 6 different concentrations of peptide extracts, 6  
216 different extracts from 2 different preparations of peptides). Antimicrobial analysis was done  
217 in duplicate and 3 to 4 replicates for each experimental condition were carried out. The alpha  
218 threshold was adjusted using Benjamini-Hochberg method; because of the high number of  
219 comparisons,  $P < 0.0005$  was considered significant. The initial bacterial population was used  
220 as a co-factor to standardize all analyses.

221

222

## RESULTS

223

### 224 *Peptides production*

225 Peptides hydrolysis was based on Bellamy, Takase et al. (1992). Hydrolysis was maximal after  
226 the 6 hours in contact with pepsin. SEC-HPLC was done on buttermilk and lactoferrin samples  
227 to confirm the efficiency of ultrafiltration. According to our results, the molecular weight of  
228 the majority of peptides was equal or smaller than 10 kDa (data not shown). The next step was  
229 peptide fractionations based on the net charge of the peptides with cationic absorptive  
230 membrane (Mustang S) and anionic membrane (Mustang Q). Yield was  $6.5 \pm 1.8 \%$  ( $n = 5$ ) of  
231 total peptides for buttermilk cationic peptides and  $7.0 \pm 3.5 \%$  ( $n = 4$ ) for buttermilk anionic  
232 peptides. Percentage yields of  $15.4 \pm 3.8 \%$  ( $n = 2$ ) and  $16.2 \%$  ( $n = 1$ ) were obtained  
233 respectively with Mustang S, and Mustang Q membranes, for lactoferrin. RP-HPLC peptides  
234 profile was done for the 2 peptides sources; buttermilk and lactoferrin. Cationic peptides  
235 profile showed a different profile than total peptide extract, with specific peaks for each  
236 fraction (Figure 1 and 2).

### 237 *Buttermilk peptide extracts*

238 Buttermilk peptides were the main interest of this study. They were produced following the  
239 previously described method. Two productions of buttermilk peptides extracts were tested for  
240 their reproducibility. No significant differences in terms of antimicrobial activity were  
241 obtained between them for total extract ( $p = 0.02$ ). For cationic extract, a significant difference  
242 in terms of effectiveness between the two productions was seen. Results were adjusted  
243 according to this difference. Essays were done in duplicates for all strains and for the two  
244 productions ( $n = 4$ ). Alpha threshold was adjusted with Benjamini-Hocheberg procedure for  
245 bacterial lost also (data not show).

246 *Buttermilk cationic extract.* A two-hour exposition to the concentrated cationic extract  
247 treatment (0.3 mg/mL) followed by incubation in a high-nutrient medium at half the peptide  
248 concentration resulted in a significant apparent reduction in *E.coli* O78:H80 viability of about  
249 1.13 log CFU/mL (Table 1) ( $p < 0.0001$ ) compared to control. Bacterial loss of 1.69, 2.56,  
250 2.30 and losses up to 2.97 log CFU/mL were reached for concentrations of 0.6, 1.3, 2.5 and 5

251 mg/mL, respectively. The susceptibility toward the extract varied with the strains and *E. coli*  
252 O78:H80 was the most sensitive strain in this study.

253 According to our results, *E. coli* Tk3 O1:K1 appeared to be less sensitive to peptide extracts.  
254 There was a significant difference between control and treated cultures with the addition of  
255 cationic peptide extract at 1.3 mg/mL ( $p < 0.0001$ ). Bacterial loss reached 2 log CFU/ml at 5  
256 mg/ml. *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* bacterial counts gradually and significantly  
257 decreased with increasing amount of cationic peptides; bacterial loss of 1.70 and 1.90 log  
258 CFU/ml, respectively, were reached at 5 mg/ml. Finally, *S. aureus* bacterial population was  
259 significantly affected by a concentration of 0.6 mg/mL, 1.3, 2.5 mg/mL and 5 mg/mL of  
260 cationic peptides ( $p < 0.0001$ ); the bacterial loss reached 1.61 log CFU/ml. *S. aureus* seems  
261 the less sensitive bacterial strain with a maximal loss of 1.61 log CFU/mL at the highest  
262 concentration, 5 mg/mL. This result is statistically lower than 2 log loss ( $p > 0.08$ ). The  
263 objective of 2 log loss was reached for all strains except for *S. aureus*.

264 ***Buttermilk total extract.*** The viability of *E. coli* O78: H80 was significantly different  
265 compared to control at 0.6 mg/mL ( $p < 0.0001$ ), but the bacterial loss of 0.71 log CFU/ml was  
266 less than the value of 1.6 log CFU/ml obtained with cationic peptide extracts. At 5 mg/mL, the  
267 bacterial count was 3.76 log CFU/ml (Table 2), compared to 2.68 log CFU/ml (Table 1)  
268 reached with cationic peptides. Survival was only significantly different at 2.5 mg/ml (*S.*  
269 *Enteritidis*) or 5 mg/ml for *E. coli* Tk3 O1: K1 and *S. Typhimurium*. Finally, there was no  
270 significant difference for bacterial population average of *S. aureus* ( $p > 0.007$ ).

271 ***Buttermilk anionic extracts and unbound peptides extracts.*** The antimicrobial activity of  
272 anionic and unbound peptides extracts from buttermilk hydrolysate was weak at tested  
273 concentrations (0, 0.3, 0.6, 1.3, 2.5, 5 mg/mL, data not shown).

#### 274 ***Lactoferrin peptide extracts***

275 Lactoferrin hydrolysate was used as a control treatment. Effectiveness of lactoferrin pepsic  
276 hydrolysate as antimicrobial has been proved in Bellamy, Takase et al. (1992) study. Total and  
277 cationic peptide extracts, were produced with the same protocol as buttermilk. They were used  
278 to validate peptide production method and to measure its efficiency according to this  
279 production method.

280 **Lactoferrin cationic peptide extract.** Cationic extract was the most effective treatment with a  
281 concentration of 0.6 mg/mL sufficient to reduce bacterial count by more than 2 log CFU/mL  
282 (Table 3), for all bacterial strains. According to our results, *E. coli* O78: H80 was the most  
283 sensitive strain to the treatment with cationic extracts from lactoferrin hydrolysate. Indeed, a  
284 significant antimicrobial effect has been seen against *E. coli* O78: H80 from 0.3 mg/mL of  
285 cationic peptide extract (Table 3) ( $p < 0.0001$ ). There was an absence of bacterial growth from  
286 0.6 mg/mL and up (table 3).

287 For *E. coli* Tk3 O1:K1 and *S. Enteritidis*, presence of cationic peptides at 0.6 mg/mL caused  
288 significant viability effect in comparison with control bacteria ( $p < 0.0001$ ;  $p = 0.0004$ ). The  
289 most important bacterial loss was seen at 5 mg/mL, for *E.coli* Tk3 O1:K1, with 6 log  
290 CFU/mL, for the two strains. *S. Typhimurium* viability, was significantly reduced from the  
291 concentration 2.5 mg/mL compared to control with bacterial survival of 3.14 log CFU/mL ( $p =$   
292 0.0003); bacterial decrease of 2.93 log was also observed. Finally, *S. aureus*, showed a  
293 significant difference between bacterial survival from 0.6 mg/ml and up ( $p < 0.0001$ ), with a  
294 viability decrease of 4.18 log.

295 **Lactoferrin total extract.** Antimicrobial activities of total lactoferrin extracts varied according  
296 to bacterial strains. Total extract of lactoferrin showed a  $\geq 2$  log CFU/mL bacterial for the five  
297 bacterial strains starting at 0.6 mg/mL of lactoferrin total extract. *E. coli* O78:H80 was the  
298 most sensitive strain with a loss of 3.74 log CFU/mL at 0.6 mg/mL of total extract (Table 4).  
299 In fact, survival population was significantly lower than control at 0.6 mg/mL of total extract  
300 ( $p < 0.0001$ ), with a 2.42 log CFU/mL. At the same concentrations, cationic peptide extracts  
301 were more efficient, with no bacterial growth (Table 3). *S. Typhimurium* seems the less  
302 sensitive strain with 2.55 log CFU/mL loss at 5 mg/mL of total lactoferrin. At 5 mg/mL of  
303 total peptide extracts, *E.coli* Tk3 O1:K1 viability was reduced by 3.83 log CFU/mL, *S.*  
304 *Enteritidis* by 5.86 log CFU/mL and *S. aureus* by 5.25 log CFU/mL. In comparison, at the  
305 same concentration, cationic peptides extract bacterial losses were respectively 6.49, 6.03 and  
306 5.28 log CFU/mL.

307 The bacterial survival population was significantly lower at 1.3 and 2.5 mg/mL, for the two *E.*  
308 *coli* strains; O78: H80 compared to Tk3 O1:K1 ( $p = 0.0004$ ). At 5 mg/mL, bacterial survival  
309 was significantly higher for *S. Typhimurium* than *S. Enteritidis* ( $p = 0.0002$ ).

310 According to our results, both lactoferrin and buttermilk had an antimicrobial effect on  
311 pathogenic poultry bacteria (Table 1-4). Comparison of total extracts showed a higher  
312 efficiency of lactoferrin on bacterial population than buttermilk at 0.6 ( $p = 0.0002$ ), 1.3 ( $p <$   
313  $0.0001$ ), 2.5 ( $p < 0.0001$ ) and 5 mg/mL ( $p < 0.0001$ ). The efficiency was not different at 0.3 ( $p$   
314  $= 0.37$ ) and for each individual strains. The difference of effectiveness was seen for *E. coli*  
315 O78:H80 ( $p < 0.0001$ ), *E. coli* Tk3 O1:K1 ( $p < 0.0001$ ), *S. Typhimurium* ( $p = 0.0001$ ), *S.*  
316 *Enteritidis* ( $p < 0.0001$ ) and *S. aureus* ( $p < 0.0001$ ). Cationic extracts from lactoferrin were  
317 also more effective than the ones from buttermilk, and this, at all tested concentrations.

318 Cationic lactoferrin was more effective than total extracts on *E. coli* O78:H80 ( $p = 0.0001$ ), *E.*  
319 *coli* Tk3 O1:K1 ( $p < 0.0001$ ) and *S. aureus* ( $p = 0.0004$ ). At 0.3 mg/mL of cationic extract,  
320 bacterial loss was respectively 4.63, 2.32 and 1.99 log CFU/mL. No significant differences  
321 were observed for *S. Typhimurium* ( $p = 0.04$ ) and *S. Enteritidis* ( $p = 0.002$ ) after adjustment  
322 between total and cationic extracts. Indeed, the amount of total peptides have to be  
323 approximately double compared to cationic peptides to achieve a 2 log decrease. *S.*  
324 *Typhimurium* seems again the less sensitive, with bacterial loss of 3.19 log CFU/mL at 5  
325 mg/mL of cationic extracts.

326

## DISCUSSION

327 The main objective of this study was to produce peptide extracts and to determine, *in vitro*, the  
328 efficiency of peptides isolated, based on their ionic charges, from buttermilk (total, cationic,  
329 anionic and unbound peptides) and lactoferrin (total and cationic peptides) to decreased  
330 bacterial survival of selected poultry pathogenic bacteria. Four Gram-negative bacteria (*E. coli*  
331 O78:H80 and Tk3 O1:K1, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*), and one Gram-positive bacteria (*S.*  
332 *aureus*) were selected.

333 As previously mentioned, hydrolysis of casein and whey proteins produce antimicrobial  
334 peptides (Benkerroum 2010). The buttermilk is a product that could be interesting to valorize.

335 Clare, Zheng et al. (2008) showed that MFGM hydrolysate exhibit antimicrobial activity  
336 against several pathogens, such as *E. coli* and *S. Typhimurium*. In this project, buttermilk has  
337 been chosen because it corresponds to skimmed milk containing MFGM, which increases the  
338 possibility to react as antimicrobial peptide.

339 Peptide extracts from buttermilk and lactoferrin have been produced according to the protocol  
340 described. The ultrafiltration allows to preferentially select low molecular weight pepsic  
341 fragments that are then fractionated on the basis of their charge using absorptive membrane  
342 chromatography, in order to increase the antimicrobial activity of specific extracts. These two  
343 methods were chosen because they are fast and easily scaled-up at the industrial level. Pepsin  
344 digestion was chosen to produce active peptides. The benefit of pepsin is that it cleaved only  
345 peptide bond and preferentially hydrophobic residue like aromatics amino acids  
346 (Phenylalanine, Tyrosine and Tryptophan) and Leucine (Keil 1992). The pepsin is more likely  
347 to generate more cationic peptides, unlike trypsin which cleaves between lysine and arginine  
348 producing rather anionic peptides. Some anionic peptides are antimicrobials (Harris, R.  
349 Dennison et al. 2011, Demers-Mathieu, Gauthier et al. 2013) but the vast majority of  
350 antimicrobials peptides are cationic (Brogden 2005). In a study done by McCann, Shiell et al.  
351 (2005), they concluded that hydrolysis of sodium caseinate with trypsin and chymotrypsin  
352 generates very few peptides with antimicrobial activity. Lactoferrin pepsin digestion is known  
353 to produce a peptide with stronger antimicrobial activity, called lactoferricin (Bellamy, Takase  
354 et al. 1992, Murata, Wakabayashi et al. 2013). Pepsin is also naturally present in the gastro-  
355 intestinal tract (Musikasang, Tani et al. 2009). Before antimicrobial analyses, step of desalting  
356 was carried out. Desalting was used in this study for laboratory analysis purposes only since *in*  
357 *vitro* tests of AMP activity are sensitive to salts (Bellamy, 1993). This step would likely not be  
358 necessary if extracts will were to be used as feed supplement in poultry diets.

359 Another objective of this research was to test the efficiency of specific buttermilk and  
360 lactoferrin pepsic extracts to reduce *in vitro* bacterial populations of poultry enteric bacterial  
361 strains: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *E. coli* and of *S. aureus*. Effective antimicrobial  
362 activity was based on bactericidal effect i.e., bacterial population declines.

363 Buttermilk cationic peptides were significantly effective from a concentration of 0.3 mg/mL  
364 and up, affecting *E. coli* O78:H80 and *S. Enteritidis* viability from 0.6 mg/mL, and up for *S.*  
365 *Typhimurium* and *S. aureus*, starting at 1.3 mg/mL for *E. coli* Tk3 O1:K1. At 5 mg/ml of  
366 peptides, the bacterial loss reached values between 1.5 and 3 log CFU/ml and was close or  
367 higher than the target of 2 log CFU/ml. Considering that cationic extracts contain a mixture of  
368 peptides, their antimicrobial effectiveness can be considered as relatively high. In comparison  
369 with purified peptides from milk proteins, buttermilk cationic peptides had a visible effect as  
370 isracidin. Isracidin is an antimicrobial peptide released by chymosin cleavage of bovine  $\alpha_{S1}$ -  
371 casein. It has been reported to have antimicrobial properties on Gram-positive and Gram-  
372 negative bacteria at concentrations ranging from 0.1 to 1 mg/mL (Benkerroum 2010).  
373 Moreover, the antimicrobial activity of cationic extracts was much higher than those of total  
374 peptide extract, indicating that the membrane chromatography step is a very important step in  
375 the production process. This step gets rid of unbound peptides and anionic buttermilk peptide  
376 extracts, which both shows slight or no antimicrobial activity. These fractions could be  
377 valorized by testing other potential activities related to pathogen control such as natural  
378 growth promoter for probiotics., probiotics could be an alternative to control pathogen  
379 shedding in poultry. A combination of peptides and probiotics would potentially be better than  
380 a single probiotic, except that insensible probiotic peptides should be selected.

381 Many studies have been done on cationic extracts from lactoferrin and all showed that  
382 lactoferricin is the main peptide which has an antimicrobial effect (Bellamy, Takase et al.  
383 1992). According to their research results, Yamauchi, Tomita et al. (1993) suggested that  
384 bovine lactoferrin and lactoferricin can damage the Gram-negative and Gram-positive bacteria  
385 outer membranes. The cationic charge of lactoferricin seems to be correlated with its  
386 antimicrobial efficacy. This cationic peptide has been known to kill microorganism by  
387 increasing membrane permeability, leading to disruption of energy metabolism and/or other  
388 essential functions (Bellamy, Takase et al. 1992). There is a major size difference between the  
389 entire protein of lactoferrin (about 83,000 Da) and lactoferricin peptides (3,126 Da)  
390 (Yamauchi, Tomita et al. 1993). They suggested that lactoferricin, can penetrate trough the  
391 outer membrane to reach and damage inner membrane hence leading to cell death. In our  
392 project, cationic lactoferrin extracts were significantly effective from 0.3 mg/mL of peptide for

393 *E. coli* O78:H80, 0.6 mg/mL for *E. coli* Tk3 O1:K1, *S. Enteritidis* and *S. aureus* and 2.5  
394 mg/mL for *S. Typhimurium*, in comparison with initial bacterial populations. According to  
395 Bellamy, Takase et al. (1992), bovine lactoferrin, digested with pepsin which produces  
396 lactoferricin, had a minimal inhibitory concentration at 0.006 mg/mL for *E. coli* 0111.  
397 Bellamy, Takase et al. (1992) used the minimal inhibitory concentration (McCann, Shiell et  
398 al.) in their study. MIC is defined as the lowest concentration that caused complete inhibition  
399 of bacterial growth. In this research, MIC was not measured, because our objective was to  
400 measure the reduction of bacterial populations not only the limitation of bacterial growth. Our  
401 objective was to kill bacteria in order to verify if we could use our products as a potential  
402 pathogen control tool. This explained why high concentrations of buttermilk and lactoferrin  
403 peptides were used. Research done by Bellamy, Takase et al. (1992) is interesting and  
404 complements nicely our study. The difference of effectiveness could be caused by the use of  
405 purified lactoferricin for Bellamy and al. (1992), in comparison with a mix of cationic  
406 peptides. Cationic peptides with antimicrobial activities could be diluted by other peptides  
407 with no bactericidal activity. Results showed that cationic extract have more antimicrobial  
408 activities than total lactoferrin hydrolysates, suggesting that fractionating the extract increases  
409 the amount of active peptides

410

## CONCLUSION

411 In conclusion, absorptive membrane chromatography, using Mustang cartridge is an effective  
412 method for the fractionation of cationic and anionic peptide extracts, from buttermilk and  
413 lactoferrin hydrolysates. For buttermilk cationic peptides, yield was 6.5% and for buttermilk  
414 anionic peptides, yield was 7.0 %. For lactoferrin, a percentage yield of 15.4 % was obtained  
415 after the used of Mustang S and 16 % after Mustang Q. The antimicrobial activity was also  
416 measured and results show that the antimicrobial activity of cationic extracts against  
417 pathogens is significantly improved compared to total peptide extracts. Buttermilk cationic  
418 extract was effective at a LD<sub>99</sub> at around 5 mg/mL and lactoferrin cationic extract was  
419 effective at LD<sub>99</sub> ≤ 0.6 mg/mL for *E. coli* O78:H80 and Tk3 O1:K1, *S. Typhimurium* and *S.*  
420 *Enteritidis* and *S. aureus*. Those peptide extracts are easy to prepare, efficient as antimicrobials  
421 and should be tested with *in vivo* model as a next investigative step. Those results are

422 promising for the development of an alternative or a complement to reducing antibiotic usage,  
423 with buttermilks and/or lactoferrin peptides, as functional ingredients in poultry feed. This is a  
424 new biological product that has the potential to bring a beneficial impact on poultry health. It  
425 could also be interesting to measure its nutritive properties on chicken health.

426

#### ACKNOWLEDGEMENTS

427 The authors want to thank Mrs Sonia Lafleur and Marie-Josée Lemay from Agriculture and  
428 Agri-Food Canada, Saint-Hyacinthe, Canada for their technical assistance. This project was  
429 made possible with financial support from Government of Canada, Sciences and technology,  
430 Research Affiliate Program.

431

#### REFERENCES

432 Achanta, M., L. T. Sunkara, G. Dai, Y. R. Bommineni, W. Jiang and G. Zhang (2012). "Tissue  
433 expression and developmental regulation of chicken cathelicidin antimicrobial peptides."  
434 Journal of Animal Science and Biotechnology **3**(1): 15-15.

435

436 Alleman, F., I. Gabriel, V. Dufourcq, F. Perrin and J. F. Gabarrou (2013). "Essential oils in  
437 poultry feeding. 1. Growth performances and regulation aspects." Productions Animales **26**(1):  
438 3-12.

439

440 Atterbury, R. J. (2007). "Bacteriophage Therapy To Reduce Salmonella Colonization of  
441 Broiler Chickens." Applied and Environmental Microbiology ( Formerly : Applied  
442 Microbiology ) **73**(14): 4543.

443

444 Bellamy, W., M. Takase, H. Wakabayashi, K. Kawase and M. Tomita (1992). "Antibacterial  
445 spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region  
446 of bovine lactoferrin." Journal of Applied Bacteriology **73**(6): 472-479.

447

448 Bellamy, W., M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, K. Kawase and M. Tomita (1992).  
449 "Identification of the bactericidal domain of lactoferrin." Biochimica et Biophysica Acta  
450 (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology **1121**(1-2): 130-136.  
451  
452 Benkerroum, N. (2010). "Antimicrobial peptides generated from milk proteins: A survey and  
453 prospects for application in the food industry. A review." International Journal of Dairy  
454 Technology **63**(3): 320-338.  
455  
456 Brenes, A. and E. Roura (2010). "Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of  
457 action." Animal Feed Science and Technology **158**(1-2): 1-14.  
458  
459 Brewster, J. D. (2003). "A simple micro-growth assay for enumerating bacteria." Journal of  
460 Microbiological Methods **53**(1): 77-86.  
461  
462 Brogden, K. A. (2005). "Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in  
463 bacteria?" Nature Reviews Microbiology **3**(3): 238-250.  
464  
465 Campagna, S., A. G. Mathot, Y. Fleury, J. M. Girardet and J. L. Gaillard (2004).  
466 "Antibacterial Activity of Lactophoricin, a Synthetic 23-Residues Peptide Derived from the  
467 Sequence of Bovine Milk Component-3 of Proteose Peptone." Journal of Dairy Science **87**(6):  
468 1621-1626.  
469  
470 Church, F. C., H. E. Swaisgood, D. H. Porter and G. L. Catignani (1983). "Spectrophotometric  
471 Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk  
472 Proteins." Journal of Dairy Science. **66**(6): 1219-1227.  
473  
474 Clare, D. A., Z. Zheng, H. M. Hassan, H. E. Swaisgood and G. L. Catignani (2008).  
475 "Antimicrobial properties of milkfat globule membrane fractions." Journal of Food Protection  
476 **71**(1): 126-133.  
477

478 Dahiya, J. P., D. C. Wilkie, A. G. Van Kessel and M. D. Drew (2006). "Potential strategies for  
479 controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era." Animal Feed Science  
480 and Technology **129**(1-2): 60-88.

481

482 Dewettinck, K., R. Rombaut, N. Thienpont, T. T. Le, K. Messens and J. Van Camp (2008).  
483 "Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material." International  
484 Dairy Journal **18**(5): 436-457.

485

486 Gaggia, F., P. Mattarelli and B. Biavati (2010). "Probiotics and prebiotics in animal feeding  
487 for safe food production." International Journal of Food Microbiology **141**, **Supplement(0)**:  
488 S15-S28.

489

490 Hancock, R. E. W. and D. S. Chapple (1999). "Peptide Antibiotics." Antimicrobial Agents and  
491 Chemotherapy **43**(6): 1317-1323.

492

493 Harris, F., S. R. Dennison and D. A. Phoenix (2011). "Anionic Antimicrobial Peptides from  
494 Eukaryotic Organisms and their Mechanisms of Action." Current Chemical Biology **5**(2): 142-  
495 153.

496

497 Harwig, S. S. L., K. M. Swiderek, V. N. Kokryakov, L. Tan, T. D. Lee, E. A. Panyutich, G. M.  
498 Aleshina, O. V. Shamova and R. I. Lehrer (1994). "Gallinacins: cysteine-rich antimicrobial  
499 peptides of chicken leukocytes." FEBS Letters **342**(3): 281-285.

500

501 Joerger, R. D. (2003). "Alternatives to antibiotics: Bacteriocins, antimicrobial peptides and  
502 bacteriophages." Poultry Science **82**(4): 640-647.

503

504 Kaur, I. P., A. Kuhad, A. Garg and K. Chopra (2009). "Probiotics: Delineation of prophylactic  
505 and therapeutic benefits." Journal of Medicinal Food **12**(2): 219-235.

506

507 Lin, J., A. A. Hunkapiller, A. C. Layton, Y.-J. Chang and K. R. Robbins (2013). "Response of  
508 Intestinal Microbiota to Antibiotic Growth Promoters in Chickens." Foodborne Pathogens and  
509 Disease **10**(4): 331-337.

510

511 Marshall, B. M. and S. B. Levy (2011). "Food animals and antimicrobials: Impacts on human  
512 health." Clinical Microbiology Reviews **24**(4): 718-733.

513

514 McCann, K. B., B. J. Shiell, W. P. Michalski, A. Lee, J. Wan, H. Roginski and M. J. Coventry  
515 (2005). "Isolation and characterisation of antibacterial peptides derived from the f(164–207)  
516 region of bovine  $\alpha$ S2-casein." International Dairy Journal **15**(2): 133-143.

517

518 Murata, M., H. Wakabayashi, K. Yamauchi and F. Abe (2013). "Identification of milk proteins  
519 enhancing the antimicrobial activity of lactoferrin and lactoferricin." Journal of Dairy Science  
520 **96**(8): 4891-4898.

521

522 Musikasang, H., A. Tani, A. H-kittikun and S. Maneerat (2009). "Probiotic potential of lactic  
523 acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract." World Journal of  
524 Microbiology and Biotechnology **25**(8): 1337-1345.

525

526 Sibel Akalin, A. (2014). "Dairy-derived antimicrobial peptides: Action mechanisms,  
527 pharmaceutical uses and production proposals." Trends in Food Science & Technology **36**(2):  
528 79-95.

529

530 Teeters, M. A., T. W. Root and E. N. Lightfoot (2002). "Performance and scale-up of  
531 adsorptive membrane chromatography." Journal of Chromatography A **944**(1–2): 129-139.

532

533 Théolier, J., I. Fliss, J. Jean and R. Hammami (2014). "Antimicrobial Peptides of Dairy  
534 Proteins: From Fundamental to Applications." Food Reviews International **30**(2): 134-154.

535

536 Thomke, S. and K. Elwinger (1998). "Growth promotants in feeding pigs and poultry. III.  
537 Alternatives to antibiotic growth promotants." Ann. Zootech. **47**(4): 245-271.

538 Tiihonen, K., H. Kettunen, M. H. L. Bento, M. Saarinen, S. Lahtinen, A. C. Ouwehand, H.  
539 Schulze and N. Rautonen (2010). "The effect of feeding essential oils on broiler performance  
540 and gut microbiota." British Poultry Science **51**(3): 381-392.  
541

542 Tomita, M., H. Wakabayashi, K. Yamauchi, S. Teraguchi and H. Hayasawa (2002). "Bovine  
543 lactoferrin and lactoferricin derived from milk: Production and applications." Biochemistry  
544 and Cell Biology **80**(1): 109-112.  
545

546 Waewdee, P., P. Sukon, P. Chaveerach, P. Surachon and C. Soikum (2012). "Effect of a single  
547 dose of *Lactobacillus salivarius* on prevention of *Salmonella enteritidis* infection in young  
548 broilers." Journal of Animal and Veterinary Advances **11**(7): 955-961.  
549

550 Wong, C. L., C. C. Sieo, W. S. Tan, N. Abdullah, M. Hair-Bejo, J. Abu and Y. W. Ho (2014).  
551 "Evaluation of a lytic bacteriophage,  $\Phi$  st1, for biocontrol of *Salmonella enterica* serovar  
552 Typhimurium in chickens." International Journal of Food Microbiology **172**: 92-101.  
553

554 Yamauchi, K., M. Tomita, T. J. Giehl and R. T. Ellison (1993). "Antibacterial activity of  
555 lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment." Infection and Immunity **61**(2):  
556 719-728.  
557

558 **Table 1:** Estimated bacterial survival (log CFU/mL) of five strains, in contact with increasing concentrations of cationic buttermilk  
 559 peptide extracts.

Bacterial strains	Peptide concentrations (mg/mL)					
	0	0.3	0.6	1.3	2.5	5
<i>Escherichia coli</i> O78:H80	5.60 ±0.18 <sup>A1</sup>	4.52 ±0.18 <sup>B</sup>	3.96 ±0.18 <sup>BC</sup>	3.09 ±0.18 <sup>CD</sup>	3.35 ±0.18 <sup>CD</sup>	2.68 ±0.18 <sup>D</sup>
<i>Escherichia coli</i> Tk3 O1 :K1	5.64 ± 0.23 <sup>A</sup>	5.06 ± 0.23 <sup>AB</sup>	4.72± 0.23 <sup>ABC</sup>	4.50 ± 0.23 <sup>BCD</sup>	4.05 ± 0.23 <sup>CD</sup>	3.66 ± 0.23 <sup>D</sup>
<i>Salmonella</i> Typhimurium	5.63 ±0.20 <sup>A</sup>	4.90 ±0.20 <sup>AB</sup>	4.64 ±0.20 <sup>B</sup>	4.68 ±0.20 <sup>AB</sup>	4.33 ±0.20 <sup>B</sup>	3.92 ±0.20 <sup>B</sup>
<i>Salmonella</i> Enteritidis	5.63 ± 0.20 <sup>A</sup>	4.62 ±0.20 <sup>B</sup>	4.39 ± 0.20 <sup>B</sup>	4.12 ± 0.20 <sup>B</sup>	3.90 ± 0.20 <sup>B</sup>	3.73 ± 0.20 <sup>B</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	5.57 ±0.24 <sup>A</sup>	4.57 ±0.22 <sup>AB</sup>	4.27 ±0.22 <sup>B</sup>	4.53 ±0.22 <sup>AB</sup>	4.19 ±0.22 <sup>B</sup>	4.06 ±0.22 <sup>B</sup>

560

---

<sup>1</sup> For a given strain, value significance is shown by different superscript letters (P < 0.0005)

561 **Table 2:** Estimated bacterial survival (log CFU/mL) of five strains, in contact with increasing concentrations of total buttermilk  
 562 peptide extracts.

Bacterial strains	Peptide concentrations (mg/mL)					
	0	0.3	0.6	1.3	2.5	5
<i>Escherichia coli</i> O78:H80	5.73 ± 0.15 <sup>A1</sup>	5.41 ± 0.15 <sup>AB</sup>	4.89 ± 0.15 <sup>BC</sup>	4.58 ± 0.15 <sup>BC</sup>	4.54 ± 0.15 <sup>C</sup>	3.76 ± 0.15 <sup>D</sup>
<i>Escherichia coli</i> Tk3 O1 :K1	5.83 ± 0.19 <sup>A</sup>	5.60 ± 0.19 <sup>A</sup>	5.38 ± 0.19 <sup>AB</sup>	5.31 ± 0.19 <sup>AB</sup>	5.09 ± 0.19 <sup>AB</sup>	4.57 ± 0.19 <sup>B</sup>
<i>Salmonella</i> Typhimurium	5.54 ± 0.17 <sup>A</sup>	5.27 ± 0.17 <sup>AB</sup>	5.16 ± 0.17 <sup>AB</sup>	4.95 ± 0.17 <sup>AB</sup>	4.89 ± 0.17 <sup>AB</sup>	4.69 ± 0.17 <sup>B</sup>
<i>Salmonella</i> Enteritidis	5.57 ± 0.16 <sup>A</sup>	5.17 ± 0.16 <sup>AB</sup>	4.94 ± 0.16 <sup>ABC</sup>	4.78 ± 0.16 <sup>ABC</sup>	4.56 ± 0.16 <sup>BC</sup>	4.34 ± 0.16 <sup>C</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	5.47 ± 0.16	5.53 ± 0.18	5.04 ± 0.18	5.31 ± 0.18	5.07 ± 0.18	4.91 ± 0.18

563

---

<sup>1</sup> For a given strain, value significance is shown by different superscript letters (P < 0.0005)

564 **Table 3:** Estimated bacterial survival (log CFU/mL) of five strains, in contact with increasing concentrations of cationic lactoferrin  
 565 peptide extracts.

Bacterial strains	Peptide concentrations (mg/mL)					
	0	0.3	0.6	1.3	2.5	5
<i>Escherichia coli</i> O78:H80	6.07 ±0.73 <sup>A1</sup>	1.43 ±0.73 <sup>B</sup>	0.07 ±0.73 <sup>B</sup>	0.00 ±0.73 <sup>B</sup>	0.00 ±0.73 <sup>B</sup>	0.00 ±0.73 <sup>B</sup>
<i>Escherichia coli</i> Tk3 O1 :K1	6.07 ±0.66 <sup>A</sup>	3.74 ±0.66 <sup>AB</sup>	2.44 ±0.66 <sup>BC</sup>	1.22±0.66 <sup>BCD</sup>	0.59 ±0.66 <sup>CD</sup>	0.00 ±0.66 <sup>D</sup>
<i>Salmonella</i> Typhimurium	6.05 ±0.67 <sup>A</sup>	4.45 ±0.67 <sup>AB</sup>	4.04 ±0.67 <sup>AB</sup>	3.52 ±0.67 <sup>AB</sup>	3.14 ±0.67 <sup>B</sup>	2.88 ±0.67 <sup>B</sup>
<i>Salmonella</i> Enteritidis	6.06 ±0.54 <sup>A</sup>	4.17 ±0.54 <sup>AB</sup>	3.19 ±0.54 <sup>B</sup>	1.91 ±0.54 <sup>BC</sup>	0.30 ±0.54 <sup>C</sup>	0.03 ±0.54 <sup>C</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.05 ±0.88 <sup>A</sup>	4.08 ±0.88 <sup>AB</sup>	1.89 ±0.88 <sup>BC</sup>	1.38 ±0.88 <sup>BC</sup>	0.78 ±0.88 <sup>C</sup>	0.78 ±0.88 <sup>C</sup>

566

---

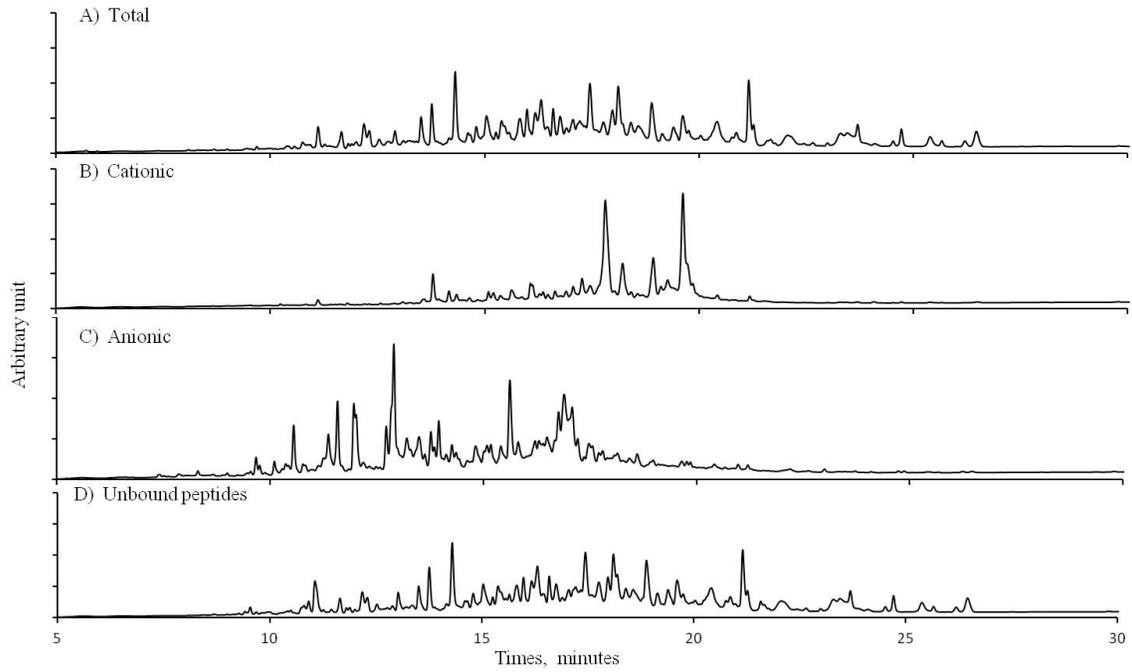
<sup>1</sup> For a given strain, value significance is shown by different superscript letters (P < 0.0005)

567 **Table 4:** Estimated bacterial survival (log CFU/mL) of five strains, in contact with increasing concentrations of total  
 568 lactoferrinpeptide extracts.

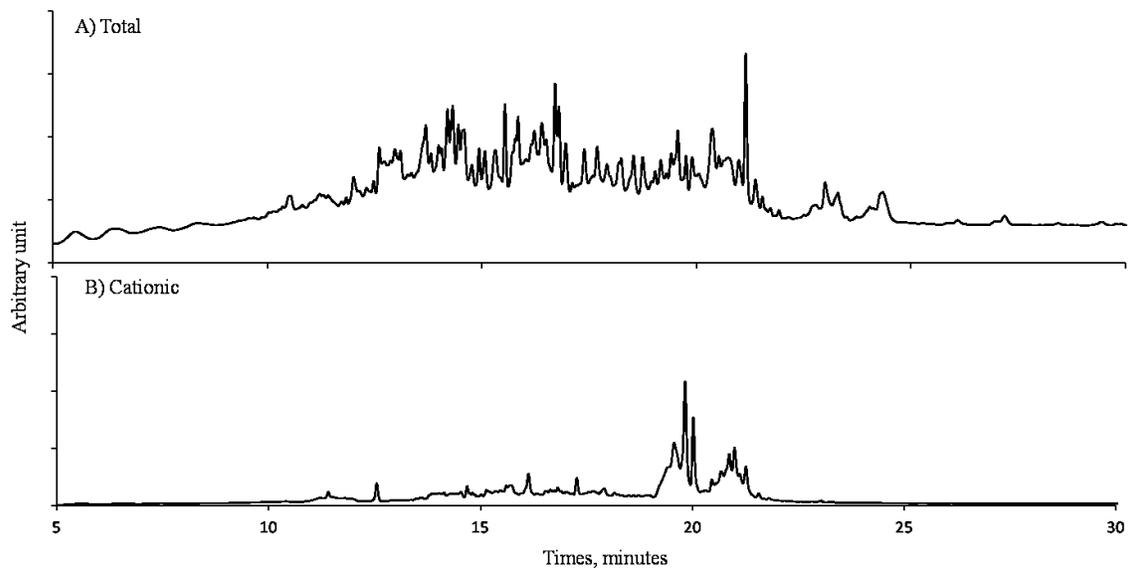
Bacterial strains	Peptide concentrations (mg/mL)					
	0	0.3	0.6	1.3	2.5	5
<i>Escherichia coli</i> O78:H80	6.16 ±0.88 <sup>A1</sup>	5.81 ±0.88 <sup>A</sup>	2.42 ±0.88 <sup>B</sup>	0.20 ±0.88 <sup>BC</sup>	0.00 ±0.88 <sup>C</sup>	0.00 ±0.88 <sup>C</sup>
<i>Escherichia coli</i> Tk3 O1 :K1	6.12 ±0.68 <sup>A</sup>	4.94 ±0.68 <sup>AB</sup>	4.25 ±0.68 <sup>AB</sup>	3.10 ±0.68 <sup>BC*</sup>	2.26 ±0.68 <sup>BC*</sup>	2.19 ±0.68 <sup>C</sup>
<i>Salmonella</i> Typhimurium	5.96 ±0.66	5.54 ±0.66	4.68 ±0.66	4.12 ±0.66	3.68 ±0.66	3.46 ±0.66
<i>Salmonella</i> Enteritidis	6.03 ±0.51 <sup>A</sup>	5.79 ±0.51 <sup>A</sup>	4.52 ±0.51 <sup>AB</sup>	3.01 ±0.51 <sup>B</sup>	1.96 ±0.51 <sup>BC</sup>	0.18 ±0.51 <sup>C</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	5.90 ±0.90 <sup>A</sup>	5.43 ±0.90 <sup>AB</sup>	4.59 ±0.90 <sup>AB</sup>	2.88 ±0.90 <sup>BC</sup>	1.43 ±0.90 <sup>C</sup>	0.82 ±0.90 <sup>C</sup>

---

<sup>1</sup> For a given strain, value significance is shown by different superscript letters (P < 0.0005)



**Figure 1:** RP-HPLC profile (C<sub>18</sub>) from buttermilk peptide extracts.



**Figure 2:** RP-HPLC profile (C<sub>18</sub>) from lactoferrin peptide extracts.

## CHAPITRE 3: DISCUSSION GÉNÉRALE

### 1 Peptides antimicrobiens

#### 1.1 Production et extraction des extraits peptidiques totaux

La méthode de production des peptides utilisée lors de ce projet de recherche comporte de nombreuses étapes. Un travail de mise au point a dû être effectué avant d'en arriver à un protocole permettant de produire des peptides ayant une activité antimicrobienne. Les différentes étapes de la production et de l'extraction des peptides ont été les suivantes : dialyse, hydrolyse et ultrafiltration. La dialyse, dans l'eau, permet d'éliminer les composantes de faible poids moléculaire (sels, sucres). L'étape d'hydrolyse des protéines a été effectuée à l'aide de la pepsine à un ratio de 1 pour 20 (p/p). Finalement, la dernière étape de production des peptides a consisté en l'ultrafiltration. Celle-ci a permis de recueillir la fraction contenant les peptides ayant un poids moléculaire inférieur à 10 kDa. La diafiltration, ou étape de l'ultrafiltration, permet donc de récupérer le maximum de peptides.

#### 1.2 Fractionnement et préparation des extraits peptidiques

Dans le cadre du projet, le fractionnement a dû être mis au point. L'élution des peptides des cartouches échangeuses d'ions cationiques s'effectuait initialement avec de l'acétate d'ammonium 3M à pH 10. La concentration élevée utilisée provoquait des problèmes lors de la lyophilisation. En effet, il était très difficile, voire impossible de conserver les échantillons sous forme congelée durant la lyophilisation à cause des sels, ce qui empêchait une lyophilisation optimale. Des tests ont été effectués, durant lesquels les échantillons étaient dilués dans de très grands volumes d'eau, afin de réduire la concentration d'acétate d'ammonium présente. De plus, même après 2 lyophilisations, les échantillons conservaient toujours une odeur d'acétate d'ammonium, nous laissant croire qu'il restait des traces à l'intérieur de ceux-ci. Pour toutes ces raisons, l'acétate d'ammonium, initialement utilisé comme éluant, a été remplacé par du NaCl. Le NaCl était également plus efficace pour éluer la lactoferrine, le peptide cationique actif de la lactoferrine. Par contre, cette modification au protocole nous a obligés à ajouter des étapes à la préparation des peptides, c'est-à-dire le dessalage. Étant donné la présence

d'éthanol dans les échantillons suite au dessalage, une étape d'évaporation des échantillons est ajoutée. La présence de sels inhibe l'activité antimicrobienne des peptides antimicrobiens *in vitro*, tel que rapporté en littérature (Bellamy, Takase et al. 1992).

Le protocole de production des peptides est donc composé de plusieurs étapes. Après l'ultrafiltration, les cartouches sont ajustées pour avoir 10 mM d'acétate d'ammonium, à un pH 5. La capacité de la colonne est d'environ 240 de densité optique, mesurée à 280 mM. La cartouche est lavée jusqu'à l'obtention d'une densité optique inférieure à 1 (environ 20 volume de cartouche). Les peptides sont finalement élués avec du NaCl 1M. La solution non retenue a été ajustée à un pH 9, diluée avec de l'eau pour diminuer la conductivité à 2  $\Omega$ ohm (environ 3 volumes d'eau) et appliquée sur la cartouche Mustang Q. Après lavage avec de l'eau, les peptides retenus ont été élués avec du NaCl 1M, également. Les peptides ont été fractionnés par des cartouches échangeuses d'ions, Mustang S pour les peptides cationiques et Mustang Q pour les peptides anioniques. Les extraits ne s'étant liés à aucune cartouche sont considérés comme des extraits peptidiques non liés. Suite au fractionnement, le dessalage s'est effectué par RP-HPLC en phase inverse sur une colonne C<sub>12</sub>. Lors de cette étape, les extraits peptidiques élués des cartouches étaient directement appliqués sur la colonne C<sub>12</sub> et ont été élués avec de l'éthanol, qui devait être évaporé, sous flux d'azote, avant la congélation et la lyophilisation. Une fois la lyophilisation terminée, les poudres ont été suspendues dans un volume d'eau, variant entre 1 et 2 mL selon la consistance et la quantité de poudre, puis dosées par le test de Pierce<sup>TM</sup> *BCA protein Assay kit*. Des profils chromatographiques au RP-HPLC sur colonne C<sub>18</sub> et des cinétiques d'hydrolyse ont été effectuées.

### 1.3 Rendement du fractionnement des peptides

Tout au long du processus de fractionnement, des lectures de densité optique (DO) à 280 nm ont été prises, dans le but d'estimer les rendements peptidiques obtenus après le passage des échantillons dans chaque cartouche, mustang S pour les peptides cationiques et Mustang Q pour ceux anioniques. Les rendements ont été calculés à partir de la DO initiale, c'est-à-dire celle de l'hydrolysats total, avant fractionnement. En ce qui concerne les rendements de la production des peptides provenant du babeurre, uniquement 13% de

l'ensemble de peptides ont été récupérés lors du fractionnement en peptides cationiques et anioniques (Annexe 1, Tableau 4). En ce qui concerne la lactoferrine, 32% de l'ensemble des peptides ont été récupérés (Annexe 1, Tableau IV). Finalement, pour les peptides provenant des protéines de pois, 24% des peptides étaient soit de nature cationique ou anionique (Annexe 1, Tableau IV). En résumé, seul un nombre limité de peptides peut se lier aux cartouches dû à leur charge, soit sur la Mustang S, soit sur la Mustang Q. Le rendement est quelque peu sous-estimé, considérant que le dessalage fait perdre environ 15% des composantes retenues, estimé par absorbance à 280 nm.

La lactoferrine a un point isoélectrique (pI) d'environ 9 (Farnaud and Evans 2003). Conséquemment, une proportion importante des peptides produits sont cationiques et couvrent une grande proportion de la séquence (Chan and Li-Chan 2007). Le rendement théorique en lactoferrine, un peptide très cationique, serait autour de 4%. Les protéines laitières ont un  $pI \leq 6$  (par exemple les caséines  $pI = 4.6$  environ). La proportion de peptides cationiques attendus est faible. Chan and Li-Chan (2007) ont purifié, par chromatographie par échange ionique sur une colonne, des hydrolysats de lactoferrine. Un rendement de 35% de lactoferrine a été obtenu.

#### 1.4 Cinétique d'hydrolyse

L'hydrolyse des peptides a été mesurée sur plusieurs productions de peptides, par la technique de spectrophotométrie utilisant l'o-phthalaldehyde, comme décrit par Church, Swaisgood et al. (1983), dans le but de valider le temps nécessaire à l'hydrolyse maximale des protéines (Annexe 2). Il était également intéressant de vérifier si l'hydrolyse est reproductible entre les différentes productions de peptides provenant d'une même source.

##### 1.4.1 Babeurre

Les productions de babeurre utilisées lors des analyses sont les productions numérotées 5 et 6. Les productions 1 à 4 ont été utilisées pour mettre au point la méthode de production des peptides ainsi que pour faire des analyses microbiologiques préliminaires. Il y a malheureusement des données manquantes à 0 et 3 heures pour la production 5 (Annexe 2, Tableau V). C'est pour cette raison que la cinétique d'hydrolyse d'une septième production a été effectuée. Les productions 5, 6 et 7 ont été produites suivant le même

protocole de préparation tel que décrit dans le matériel et méthodes de l'article ci-joint. Considérant une hydrolyse par la pepsine de 100% après 6 heures (Annexe 2, Tableau V), après 3 heures d'incubation, celle-ci permet d'estimer une hydrolyse d'environ 82% des liens peptidiques potentiellement attaqués par la pepsine. Il est raisonnable de penser qu'entre 3 et 6 heures, l'hydrolyse des protéines restantes, c'est-à-dire environ 20%, sera complète.

#### 1.4.2 Lactoferrine

La lactoferrine utilisée lors des essais microbiologiques est la production dite 34, c'est-à-dire un mélange des productions numéros 3 et 4, afin d'obtenir une quantité suffisante de peptides pour effectuer les analyses sur toutes les souches et à des concentrations plus élevées. Les productions 1 et 2 ont été utilisées pour des mises au point des méthodes de production et d'analyses microbiologiques. La cinétique d'hydrolyse de la lactoferrine a démontré une hydrolyse complète après environ 3 heures en contact avec la pepsine (Annexe 2, Tableau VI) Après 6 heures, il a été considéré que l'hydrolyse était de 100%. Les résultats semblent similaires pour les 3 productions différentes aux temps 0, 3 et 6 heures.

#### 1.4.3 Pois

La cinétique d'hydrolyse du pois a été effectuée sur les productions numéros 3 et 4. Comme pour la lactoferrine, ces 2 productions ont été mélangées et utilisées ensemble, dans le but d'avoir une quantité assez élevée de peptides pour effectuer toutes les analyses. Après 3 heures d'hydrolyse à la pepsine, environ 88% des liens peptidiques sont hydrolysés. Il est donc possible de considérer qu'après 6 heures d'hydrolyse, 100% des protéines sont hydrolysées (Annexe 2, Tableau VII).

En comparaison, l'hydrolyse par la pepsine des protéines de pois et du babeurre est similaire après 3 heures en contact avec l'enzyme de digestion. En ce qui concerne la lactoferrine, son hydrolyse semble plus rapide étant donné qu'après 3 heures en contact avec la pepsine, son hydrolyse est complète.

## 1.5 Analyses des profils HPLC

Les différents échantillons de peptides ont tous été analysés par RP-HPLC (Annexe 3), afin d'obtenir des profils de chacun d'eux. Des différences entre les fractions totales, cationiques, anioniques et non liées ont pu être identifiées à travers les différents profils. Ces analyses sont qualitatives et des étapes de caractérisation plus poussées devront être effectuées dans le but de caractériser et d'identifier précisément les peptides présentant un effet antimicrobien.

### 1.5.1 Babeurre

Quatre fractions provenant du babeurre ont été analysées au HPLC (Annexe 3, Figure V), soit totale (A), cationique (B), anionique (C) et non liée (D). Les analyses microbiologiques des extraits anioniques ( $p > 0,0004$ ) et des extraits peptidiques non liés ( $p > 0,0008$ ) n'ont pas démontré d'effets antimicrobiens significatifs importants (Annexe 5, Tableau X et XI; Annexe 3, figure V). Le profil HPLC des peptides non liés est très similaire au profil des peptides totaux. Effectivement, la fraction peptidique non liée correspond aux peptides qui ne se sont pas liés aux 2 cartouches échangeuses d'ions (Mustang S et Mustang Q). Leur absence dans l'extrait peptidique non lié pourrait expliquer pourquoi aucun effet antimicrobien n'est visible. Certains peptides, tels les peptides cationiques ne sont probablement plus présents dans l'extrait de peptides non liés. L'activité antimicrobienne est associée principalement à la fraction cationique. En ce qui concerne la fraction anionique, qui présente peu d'effets antimicrobiens, les peptides majeurs sont présents approximativement entre 10 et 17 minutes d'élution suite au procédé HPLC (Annexe 3, Figure V). Ils ne correspondent pas aux peptides cationiques, qui sont plutôt présents entre 18 et 20 minutes. Les fractions totales et cationiques ont démontré une activité antimicrobienne, tel que décrit à l'intérieur de l'article (Annexe 5, Tableau VIII et IX). En effet, les résultats qui concernent la fraction totale, pour les 2 productions combinées, ont démontré des effets antimicrobiens. Pour les 5 souches utilisées dans cette étude, l'extrait cationique a été plus efficace que l'extrait total ( $p < 0,0001$ ), montrant que le fractionnement des fractions totales en fractions cationiques permettrait d'augmenter l'efficacité des peptides. Les peptides ayant des activités antimicrobiennes sont purifiés dans la fraction cationique en comparaison avec la fraction total.

### 1.5.2 Lactoferrine

Les extraits de lactoferrine sont composés de plusieurs peptides différents, comme le montre l'extrait total à la figure 6A (Annexe 3). Comme présenté dans l'article, l'hydrolysate total de lactoferrine ainsi que l'extrait cationique ont démontré un effet antimicrobien sur les bactéries pathogènes testées (Annexe 8, Tableau XV et XVI). En effet, nous avons observé chez toutes les souches, à l'exception de *Salmonella* Typhimurium, une diminution de leur population à 0.6 mg/mL pour *E.coli* O78 :H80 et à 1.3mg/mL pour *E.coli* Tk3 O1:K1, *Salmonella* Enteritidis et *Staphylococcus aureus*, et ce pour l'hydrolysate total. En ce qui concerne l'extrait cationique, une diminution de population est également observable à 0.3 mg/mL pour *E.coli* O78 :H80, 0.6 mg/mL pour *E.coli* Tk3 O1:K1, *Salmonella* Enteritidis et *Staphylococcus aureus* et finalement à 2.5 mg/mL pour *Salmonella* Typhimurium. L'extrait total, c'est-à-dire l'ensemble des peptides, serait moins efficace que l'extrait cationique pour les souches suivantes : *E.coli* O78 :H80 ( $p=0,0001$ ), *E.coli* Tk3 O1:K1 ( $p<0,0001$ ) et *Staphylococcus aureus* ( $p<0,0001$ ). Pour *Salmonella* Typhimurium et Enteritidis les résultats ne sont pas en mesure de démontrer une différence significative d'efficacité entre les extraits. Une plus grande taille d'échantillons serait nécessaire pour valider cette différence. Par contre, dans le cas de *Salmonella* Typhimurium, il est possible de voir une tendance dans l'efficacité des peptides totaux et cationiques. En effet, à 5 mg/mL, la survie bactérienne pour l'extrait cationique est de 2.88 log UFC/mL en comparaison avec une survie de 3.46 log UFC/mL pour l'extrait total. En ce qui concerne *Salmonella* Enteritidis, pour obtenir une perte de 3 log, 1.3 mg/mL de peptide total en comparaison avec 0.6 mg/mL de peptides cationiques sont nécessaires (Annexe 8, Tableau XV et XVI). Il est possible de supposer qu'il existe une différence dans l'efficacité antimicrobienne des extraits et un enrichissement en AMP par chromatographie par échange cationique.

Ces différences entre extraits pourraient être expliquées par les profils chromatographiques différents au HPLC (Annexe 3, Figure VI). En effet, l'extrait total se compose de plusieurs peptides différents, expliquant un effet moindre que l'extrait cationique, où il y a la présence de seulement quelques peptides majeurs. En purifiant l'extrait cationique à partir du total, ce sont un ou plusieurs peptides qui seraient isolés et possiblement antimicrobiens. Ces mêmes peptides se retrouveraient aussi dans

l'échantillon total, mais dilué avec plusieurs autres peptides, ce qui diminuerait leur efficacité. Le ratio peptides antimicrobiens versus peptides total est plus élevé dans l'extrait cationique comparativement à l'extrait total. Des peptides jouant des rôles antagonistes pourraient également se retrouver dans le mélange. Il serait possible éventuellement d'identifier les peptides, présents dans nos mélanges, qui ont une activité antimicrobienne, à l'aide d'une méthode RP-HPLC spécifique et de séquençage.

### 1.5.3 Pois

Selon les profils chromatographiques obtenus, il semble y avoir une grande quantité de peptides à l'intérieur de la fraction peptidique non liée (Annexe 3, Figure VII). La récupération de peptides cationiques avec les extraits de pois a été plus grande que celle obtenue avec le babeurre. La quantité de peptides anioniques obtenue avec l'extrait de pois, en pourcentage, est en effet similaire à ce qui est obtenu à partir de la lactoferrine et deux fois plus importante que ce qui est obtenu avec le babeurre. De plus, contrairement aux profils HPLC de la lactoferrine cationique (Annexe 3, Figure VIB) et du babeurre cationique (Annexe 4, Figure VB), les peptides cationiques du pois sont présents vers 15 minutes. La lactoferrine et le babeurre cationique, qui présente des effets antimicrobiens, sont retrouvés dans les profils vers 20 minutes. Ce sont les peptides anioniques, ayant peu d'effet antimicrobien qui se trouvaient aux alentours de 15 minutes, ce qui expliquerait l'efficacité moins grande des peptides de pois. Des peptides ayant des rôles antagonistes peuvent aussi être présents dans les échantillons, inhibant l'effet antimicrobien que les peptides pourraient avoir.

### 1.6 Chromatographie d'exclusion stérique (SEC-HPLC)

Les résultats d'analyses de SEC-HPLC (Annexe 4, Figure VIII) nous permettent de confirmer l'efficacité du processus d'ultrafiltration, c'est-à-dire qu'uniquement les peptides ayant un poids moléculaire inférieur à 10 kDa se retrouvent dans le perméat de l'ultrafiltration. En effet, autant pour les peptides de babeurre que pour ceux de la lactoferrine et du pois, les profils chromatographiques sont inférieurs à la myoglobuline (<17 kDa) de la courbe standard, confirmant que l'ultrafiltration a été efficace.

## 2 Effet antimicrobien

### 2.1 Babeurre

Les extraits anioniques et peptidiques non liés, provenant du babeurre ont démontré une faible efficacité (Annexe 5, Tableau X et XI). La perte maximale obtenue à 5 mg/mL pour les peptides anioniques est d'environ 0.5 log d'UFC/mL pour *E.coli* O78 :H80 et *Salmonella* Enteritidis. En ce qui concerne les peptides non liés, une perte maximale de 0.6 log de UFC/mL est atteinte à 5 mg/mL pour *E.coli* Tk3 O1 :K1. Des études pourraient être menées concernant l'utilisation des extraits comme supplément alimentaire chez la volaille ou leur utilisation comme facteurs de croissance afin de favoriser la croissance d'espèces bactériennes bénéfiques lorsque présentes dans le système gastro-intestinal du poulet. Selon Thomke and Elwinger (1998), les probiotiques sont une alternative à l'utilisation des promoteurs de croissance en élevage aviaire. En effet, ils sont en mesure de contrôler l'excrétion et la diffusion des bactéries pathogènes chez la volaille (Gaggia, Mattarelli et al. 2010).

### 2.2 Pois

Étant donné les résultats peu prometteurs obtenus concernant le pois, ils n'ont pas été inclus dans l'article scientifique. Des concentrations jusqu'à 44 mg/mL d'hydrolysats totaux de peptides ont été testées et ce, sans avoir d'effet bactéricide sur les populations de *Salmonella* Enteritidis. Les peptides de pois ont donc été mis de côté afin que nous concentrions nos efforts sur la production et la mise en évidence d'activité antibactérienne chez les peptides de babeurre. Les différents échantillons de pois ont été conservés pour des analyses plus poussées, afin de comprendre pourquoi aucune activité n'a pu être mise en évidence. Des analyses portant sur des biofilms et sur de la culture cellulaires pourront être effectuées. Il serait également nécessaire d'augmenter la taille de l'échantillon afin de valider ou d'infirmer leur activité.

Selon le Tableau 13 (Annexe 7), il ne semble pas y avoir d'effet des hydrolysats totaux, cationiques, anioniques et non liés sur *E.coli* O78 :H80 (n=2). En effet, les données de population moyenne sont sensiblement les mêmes à 0 mg/mL qu'en présence d'une concentration de 5 mg/mL de peptides. Effectivement, à toutes les concentrations et pour tous les extraits, la perte de population est presque nulle (Annexe 7, Tableau XIII). Une

seule répétition a été effectuée sur *Salmonella* Enteritidis (n=1), montrant des résultats similaires à *E. coli* O78 :H80. Les populations moyennes bactériennes en contact avec 5 concentrations différentes de peptides sont similaires à la population bactérienne initiale, en absence de peptides de pois. Les extraits cationiques et anioniques semblent plus efficaces, avec une perte de population bactérienne de 1 log à 5 mg/mL (Annexe 7, Tableau XIV). Des répétitions supplémentaires devront être effectuées, dans le but de confirmer leur efficacité.

Quelques études ont déjà été effectuées sur des peptides provenant de pois (Rehman and Khanum (2011)). Par exemple, ces chercheurs ont isolé et mesuré l'activité antimicrobienne de peptides provenant de *Pisum Sativum* (pois) par une méthode de diffusion par disque. Les peptides sont produits par une précipitation avec du sulfate d'ammonium. Une activité antimicrobienne élevée a été obtenue à 20 µg/mL sur les souches bactériennes suivantes : *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhi*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus epidermis* (Rehman and Khanum 2011). Niehues, Euler et al. (2010) ont produit des peptides provenant du pois par une hydrolyse à la trypsine tandis que Ndiaye, Vuong et al. (2012) ont utilisé la thermolysine comme enzyme. Dans cette étude, la pepsine a été utilisée pour l'hydrolyse, contrairement à ces deux études. De plus, la majorité des études utilisent des peptides isolés et purifiés (Niehues, Euler et al. 2010, Ndiaye, Vuong et al. 2012), contrairement à ce qui a été fait dans cette recherche, soit des groupes de peptides ayant une même charge nette. Le but de l'étude présentée dans ce mémoire n'était pas de purifier un seul peptide, mais bien d'utiliser un ensemble de peptides, ce qui est plus réaliste et moins coûteux en industrie. Par contre, en ayant plusieurs peptides dans un même mélange, l'effet antimicrobien peut être réduit par les peptides n'ayant pas d'effet. En isolant un seul peptide, son effet antimicrobien est purifié et possiblement plus élevé.

### 2.3 Lactoferricine

La lactoferricine (Annexe 8, Tableau XV) a été utilisée comme contrôle positif pour tous les tests effectués, car son efficacité à réduire la croissance bactérienne a déjà été démontrée dans plusieurs études (Bellamy, Takase et al. 1992). La lactoferricine est cationique et isolée à partir de la lactoferrine. Dans cette étude, de la lactoferricine

commerciale a été utilisée (*Gen Script Lactoferrin* (17-41), Pureté 95%), dans le but de valider les essais. Les concentrations testées dans cette étude ont été de 0, 0.003, 0.006, 0.01, 0.025 et 0.05 mg/mL, sur 5 souches différentes de bactéries pathogènes.

*E.coli* O78 :H80 a démontré une réduction de la survie bactérienne significative à partir de 0.025 mg/mL en comparaison avec la population initiale ( $p < 0.0001$ ) (Annexe 8, Tableau XV). La population bactérienne à 0.05 mg/mL était significativement inférieure pour toutes les autres concentrations ( $p < 0.0001$ ). La même tendance est remarquée avec *E.coli* Tk3 O1 :K1 et *Salmonella* Typhimurium, avec une réduction significative à partir de 0.025 mg/mL, comparativement à la population initiale ( $p < 0.0001$ ). La lactoferricine à 0.05 mg/mL diminue significativement la population bactérienne, en comparaison avec les autres concentrations ( $p < 0.0001$ ).

En ce qui concerne la population bactérienne de *Salmonella* Enteritidis, la population bactérienne était significativement inférieure à la population initiale à partir de la concentration 0.025 mg/mL ( $p = 0.0002$ ). Par contre, à 0.025 mg/mL, la population bactérienne n'était pas différente des concentrations 0.003, 0.006 et 0.01 mg/mL. À 0.05 mg/mL, la population bactérienne était significativement inférieure à celle des autres concentrations ( $p < 0.0001$ ).

Pour *Staphylococcus aureus*, il y a une réduction de population bactérienne significative à partir de 0.05 mg/mL, en comparaison avec la population initiale et les concentrations 0.003, 0.006 et 0.01 mg/mL ( $p = 0.0001$ ).

À 0.05 mg/mL, la population bactérienne de *Salmonella* Enteritidis est significativement supérieure à celle de *E.coli* Tk3 O1 :K1, suggérant que cette souche est plus sensible à la lactoferricine que *Salmonella* Enteritidis ( $p = 0.0001$ ).

Un objectif visé pour l'étude était d'atteindre une perte de 2 log de population bactérienne. Pour la lactoferricine, cette perte a été atteinte à partir de la concentration 0.025 mg/mL pour l'ensemble des souches bactériennes.

## SUITE DU PROJET

L'étude présentée dans ce mémoire fait partie d'un projet de recherche ayant comme objectif de tester les AMP comme alternatives aux antibiotiques en production aviaire. En ayant démontré un effet antimicrobien des peptides de babeurre et de lactoferrine, il sera intéressant de poursuivre la caractérisation de ces peptides. En effet, l'isolement des différents peptides de l'extrait cationique par HPLC sera effectué dans le but d'identifier précisément le ou les peptides actifs. Des études sur l'encapsulation des peptides seront effectuées, puisque le but est de les administrer via l'alimentation de la volaille. Ceux-ci devront être protégés contre l'acidité du proventricule et la protéolyse extensive par les enzymes digestives, pour être en mesure de se rendre à l'endroit ciblé, soit le petit intestin. De plus, des essais en milieu gastro-intestinal artificiel *in vitro* seront effectués, afin d'analyser comment les peptides résisteront aux conditions du milieu et si leur action envers les bactéries reste la même. Finalement, il sera intéressant de tester *in vivo* l'effet des peptides de babeurre et de lactoferrine sur la volaille, en présence de bactéries pathogènes.

## CONCLUSION

En conclusion, cette étude a permis de développer et de mettre au point une méthode de production d'extraits peptidiques provenant du babeurre, de la lactoferrine et du pois. Cette technique utilise des membranes échangeuses d'ions dans le but de séparer les peptides cationiques et anioniques. Des analyses des profils HPLC montrent que le fractionnement a été efficace. Les extraits peptidiques cationiques et totaux, provenant du babeurre et de la lactoferrine, ont démontré un effet antimicrobien sur différentes souches de bactéries pathogènes : *E.coli* O78 :H80, *E.coli* Tk3 O1 :K1, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis et *Staphylococcus aureus*. L'activité des peptides cationiques s'est avérée significativement supérieure à celle des peptides totaux. En ce qui concerne les peptides provenant des protéines de pois, aucune activité antimicrobienne n'a pu être mise en évidence. Il sera intéressant de tester les peptides ayant démontré une activité antimicrobienne dans un modèle *in vivo*, dans le but de valider leur activité. Ces sous-produits pourront être utilisés comme alternatives ou suppléments aux antibiotiques pour améliorer la santé de la volaille. Ce sont des nouveaux produits avec un grand potentiel pour les années à venir.

## RÉFÉRENCES

### 1- Livres

Janson, J. C. (2012). *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications*, États-Unis, Wiley. 532p.

### 2- Sites internet

Gaucher, ML et Y Brodeur. (2013). AQINAC-Rendez-vous avicole. Poulets de chair élevés sans antibiotiques : aspects scientifiques et conséquences économiques. Consulté le 12 août 2014. Repéré à :

[http://www.aqinac.com/client/publications/RV\\_Avicole\\_AQINAC\\_2013\\_MLGAucher\\_et\\_YBrodeur.pdf](http://www.aqinac.com/client/publications/RV_Avicole_AQINAC_2013_MLGAucher_et_YBrodeur.pdf)

MAPAQ - Agriculture, Pêcherie et Alimentation. Gouvernement du Québec. (2014). Propriétaire d'animaux d'élevage. Consulté le 21 août 2015. Repéré à :

[http://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Productions/santeanimale/maladies/antibio/Pages/utilisation\\_antibiotiques.aspx](http://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Productions/santeanimale/maladies/antibio/Pages/utilisation_antibiotiques.aspx)

The antimicrobial Peptide Database. (2015). Consulté le 21 août 2015. Repéré à :

<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>

### 3- Articles scientifiques

Aarestrup, F. M., A. M. Seyfarth, H. D. Emborg, K. Pedersen, R. S. Hendriksen and F. Bager (2001). "Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**(7): 2054-2059.

Alleman, F., I. Gabriel, V. Dufourcq, F. Perrin and J. F. Gabarrou (2013). "Essential oils in poultry feeding. 1. Growth performances and regulation aspects." *Productions Animales* **26**(1): 3-12.

Almeida, M. S., K. M. S. Cabral, R. B. Zingali and E. Kurtenbach (2000). "Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds." Archives of Biochemistry and Biophysics **378**(2): 278-286.

Atterbury, R. J. (2007). "Bacteriophage Therapy To Reduce Salmonella Colonization of Broiler Chickens." Applied and Environmental Microbiology ( Formerly : Applied Microbiology ) **73**(14): 4543.

Bahar, A. and D. Ren (2013). "Antimicrobial Peptides." Pharmaceuticals **6**(12): 1543-1575.

Bahar, A. A. and D. Ren (2013). "Antimicrobial Peptides." Pharmaceuticals **6**(12): 1543-1575.

Bellamy, W., M. Takase, H. Wakabayashi, K. Kawase and M. Tomita (1992). "Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin." Journal of Applied Bacteriology **73**(6): 472-479.

Bellamy, W., M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, K. Kawase and M. Tomita (1992). "Identification of the bactericidal domain of lactoferrin." Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology **1121**(1-2): 130-136.

Bellamy, W., M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, K. Kawase and M. Tomita (1992). "Identification of the bactericidal domain of lactoferrin." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology **1121**(1-2): 130-136.

Benkerroum, N. (2010). "Antimicrobial peptides generated from milk proteins: A survey and prospects for application in the food industry. A review." International Journal of Dairy Technology **63**(3): 320-338.

Bernardeau, M. and J. P. Vernoux (2013). "Overview of differences between microbial feed additives and probiotics for food regarding regulation, growth promotion effects and health properties and consequences for extrapolation of farm animal results to humans." Clinical Microbiology and Infection **19**(4): 321-330.

Brenes, A. and E. Roura (2010). "Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action." Animal Feed Science and Technology **158**(1-2): 1-14.

Brewster, J. D. (2003). "A simple micro-growth assay for enumerating bacteria." Journal of Microbiological Methods **53**(1): 77-86.

Brogden, K. A. (2005). "Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?" Nature Reviews Microbiology **3**(3): 238-250.

Brown, S., J. P. Santa Maria Jr and S. Walker (2013). Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. Annual Review of Microbiology. **67**: 313-336.

Butaye, P., L. A. Devriese and F. Haesebrouck (2003). "Antimicrobial growth promoters used in animal feed: Effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria." Clinical Microbiology Reviews **16**(2): 175-188.

Campagna, S., A. G. Mathot, Y. Fleury, J. M. Girardet and J. L. Gaillard (2004). "Antibacterial Activity of Lactophoricin, a Synthetic 23-Residues Peptide Derived from the Sequence of Bovine Milk Component-3 of Proteose Peptone." Journal of Dairy Science **87**(6): 1621-1626.

Chan, J. C. K. and E. C. Y. Li-Chan (2007). "Production of Lactoferricin and Other Cationic Peptides from Food Grade Bovine Lactoferrin with Various Iron Saturation Levels." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**(2): 493-501.

Church, F. C., H. E. Swaisgood, D. H. Porter and G. L. Catignani (1983). "Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins." J. Dairy Sci. **66**(6): 1219-1227.

Clare, D. A., Z. Zheng, H. M. Hassan, H. E. Swaisgood and G. L. Catignani (2008). "Antimicrobial properties of milkfat globule membrane fractions." Journal of Food Protection **71**(1): 126-133.

Corpet, D. E. (2000). "Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les additifs alimentaires antibiotiques." Revue de Medecine Veterinaire **151**(2): 99-104.

Dahiya, J. P., D. C. Wilkie, A. G. Van Kessel and M. D. Drew (2006). "Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era." Animal Feed Science and Technology **129**(1-2): 60-88.

de Lima Procópio, R. E., I. R. da Silva, M. K. Martins, J. L. de Azevedo and J. M. de Araújo (2012). "Antibiotics produced by Streptomyces." The Brazilian Journal of Infectious Diseases **16**(5): 466-471.

Demers-Mathieu, V., S. F. Gauthier, M. Britten, I. Fliss, G. Robitaille and J. Jean (2013). "Antibacterial activity of peptides extracted from tryptic hydrolyzate of whey protein by nanofiltration." International Dairy Journal **28**(2): 94-101.

Dewettinck, K., R. Rombaut, N. Thienpont, T. T. Le, K. Messens and J. Van Camp (2008). "Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material." International Dairy Journal **18**(5): 436-457.

Diarra, M. S. and F. Malouin (2014). "Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives." Frontiers in Microbiology **5**(JUN).

Dionysius, D. A. and J. M. Milne (1997). "Antibacterial Peptides of Bovine Lactoferrin: Purification and Characterization." Journal of Dairy Science **80**(4): 667-674.

Drulis-Kawa, Z., G. Majkowska-Skrobek, B. Maciejewska, A. S. Delattre and R. Lavigne (2012). "Learning from Bacteriophages - Advantages and limitations of Phage and Phage-Encoded protein Applications." Current Protein and Peptide Science **13**(8): 699-722.

Dubos, R. J. (1939). "Studies on a bactericidal Agent extracted from a soil Bacillus." Hospital of The Rockefeller Institute for Medical Research.

Ernst, C. M., P. Staubitz, N. N. Mishra, S.-J. Yang, G. Hornig, H. Kalbacher, A. S. Bayer, D. Kraus and A. Peschel (2009). "The Bacterial Defensin Resistance Protein MprF Consists of Separable Domains for Lipid Lysinylation and Antimicrobial Peptide Repulsion." PLoS Pathog **5**(11): e1000660.

Ernst, C. M., P. Staubitz, N. N. Mishra, S. J. Yang, G. Hornig, H. Kalbacher, A. S. Bayer, D. Kraus and A. Peschel (2009). "The bacterial defensin resistance protein MprF consists of separable domains for lipid lysinylation and antimicrobial peptide repulsion." PLoS Pathogens **5**(11).

Farnaud, S. and R. W. Evans (2003). "Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial properties." Molecular Immunology **40**(7): 395-405.

Gaggia, F., P. Mattarelli and B. Biavati (2010). "Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production." International Journal of Food Microbiology **141**, **Supplement**(0): S15-S28.

Gifford, J. L., H. N. Hunter and H. J. Vogel (2005). "Lactoferricin: A lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties." Cellular and Molecular Life Sciences **62**(22): 2588-2598.

Giroux, H. J., S. Constantineau, P. Fustier, C. P. Champagne, D. St-Gelais, M. Lacroix and M. Britten (2013). "Cheese fortification using water-in-oil-in-water double emulsions as carrier for water soluble nutrients." International Dairy Journal **29**(2): 107-114.

Hancock, R. E. W. and D. S. Chapple (1999). "Peptide Antibiotics." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **43**(6): 1317-1323.

Haq, I. U., W. N. Chaudhry, M. N. Akhtar, S. Andleeb and I. Qadri (2012). "Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review." Virology journal **9**: 9.

Harris, F., S. R. Dennison and D. A. Phoenix (2011). "Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms and their Mechanisms of Action." Current Chemical Biology **5**(2): 142-153.

Harwig, S. S. L., K. M. Swiderek, V. N. Kokryakov, L. Tan, T. D. Lee, E. A. Panyutich, G. M. Aleshina, O. V. Shamova and R. I. Lehrer (1994). "Gallinacins: cysteine-rich antimicrobial peptides of chicken leukocytes." FEBS Letters **342**(3): 281-285.

Hoek, K. S., J. M. Milne, P. A. Grieve, D. A. Dionysius and R. Smith (1997). "Antibacterial activity of bovine lactoferrin-derived peptides." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **41**(1): 54-59.

Joerger, R. D. (2003). "Alternatives to antibiotics: Bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages." Poultry Science **82**(4): 640-647.

Jozala, A. F., L. C. de Lencastre Novaes, P. G. Mazzola, L. Oliveira-Nascimento, T. C. Vessoni Penna, J. A. Teixeira, L. A. Passarinha, J. A. Queiroz and A. Pessoa Júnior "Low-cost purification of nisin from milk whey to a highly active product." Food and Bioproducts Processing(0).

Kaur, I. P., A. Kuhad, A. Garg and K. Chopra (2009). "Probiotics: Delineation of prophylactic and therapeutic benefits." Journal of Medicinal Food **12**(2): 219-235.

Keyburn, A. L., R. W. Portela, M. E. Ford, T. L. Bannam, X. X. Yan, J. I. Rood and R. J. Moore (2013). "Maternal immunization with vaccines containing recombinant NetB

toxin partially protects progeny chickens from necrotic enteritis." Veterinary Research **44**(1).

Lacasse, P., K. Lauzon, M. S. Diarra and D. Petitclerc (2008). "Utilization of lactoferrin to fight antibiotic-resistant mammary gland pathogens." Journal of animal science **86**(13 Suppl): 66-71.

Lahov, E. and W. Regelson (1996). "Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: Casecidin, isracidin peptides." Food and Chemical Toxicology **34**(1): 131-145.

Lin, J., A. A. Hunkapiller, A. C. Layton, Y.-J. Chang and K. R. Robbins (2013). "Response of Intestinal Microbiota to Antibiotic Growth Promoters in Chickens." Foodborne Pathogens and Disease **10**(4): 331-337.

Lin, J., A. A. Hunkapiller, A. C. Layton, Y. J. Chang and K. R. Robbins (2013). "Response of intestinal microbiota to antibiotic growth promoters in Chickens." Foodborne Pathogens and Disease **10**(4): 331-337.

Marshall, B. M. and S. B. Levy (2011). "Food animals and antimicrobials: Impacts on human health." Clinical Microbiology Reviews **24**(4): 718-733.

McCann, K. B., B. J. Shiell, W. P. Michalski, A. Lee, J. Wan, H. Roginski and M. J. Coventry (2005). "Isolation and characterisation of antibacterial peptides derived from the f(164–207) region of bovine  $\alpha$ S2-casein." International Dairy Journal **15**(2): 133-143.

McDonnell, M. J., L. Rivas, C. M. Burgess, S. Fanning and G. Duffy (2012). "Inhibition of verocytotoxigenic Escherichia coli by antimicrobial peptides caseicin A and B and the factors affecting their antimicrobial activities." International Journal of Food Microbiology **153**(3): 260-268.

Mitra, S., B. C. Mukhopadhyay and S. R. Biswas (2011). "Potential application of the nisin Z preparation of *Lactococcus lactis* W8 in preservation of milk." Letters in Applied Microbiology **53**(1): 98-105.

Mot, D., L. Timbermont, F. Haesebrouck, R. Ducatelle and F. Van Immerseel (2014). "Progress and problems in vaccination against necrotic enteritis in broiler chickens." Avian Pathology **43**(4): 290-300.

Murata, M., H. Wakabayashi, K. Yamauchi and F. Abe (2013). "Identification of milk proteins enhancing the antimicrobial activity of lactoferrin and lactoferricin." Journal of Dairy Science **96**(8): 4891-4898.

Musikasang, H., A. Tani, A. H-kittikun and S. Maneerat (2009). "Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract." World Journal of Microbiology and Biotechnology **25**(8): 1337-1345.

Ndiaye, F., T. Vuong, J. Duarte, R. E. Aluko and C. Matar (2012). "Anti-oxidant, anti-inflammatory and immunomodulating properties of an enzymatic protein hydrolysate from yellow field pea seeds." European Journal of Nutrition **51**(1): 29-37.

Niehues, M., M. Euler, G. Georgi, M. Mank, B. Stahl and A. Hensel (2010). "Peptides from *Pisum sativum* L. enzymatic protein digest with anti-adhesive activity against *Helicobacter pylori*: Structure-activity and inhibitory activity against BabA, SabA, HpaA and a fibronectin-binding adhesin." Molecular Nutrition and Food Research **54**(12): 1851-1861.

Nikaido, H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. Annual Review of Biochemistry. **78**: 119-146.

Pantosti, A., M. D. Grosso, S. Tagliabue, A. Macrì and A. Caprioli (1999). "Decrease of vancomycin-resistant enterococci in poultry meat after avoparcin ban." Lancet **354**(9180): 741-742.

Pihlanto-Leppälä, A., P. Marnila, L. Hubert, T. Rokka, H. J. T. Korhonen and M. Karp (1999). "The effect of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysates on the metabolic activity of *Escherichia coli* JM103." Journal of Applied Microbiology **87**(4): 540-545.

Pownall, T. L., C. C. Udenigwe and R. E. Aluko (2010). "Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) Enzymatic protein hydrolysate fractions." Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**(8): 4712-4718.

Rehman, S. and A. Khanum (2011). "Isolation and characterization of peptide (s) from *Pisum sativum* having antimicrobial activity against various bacteria." Pak J Bot **43**: 2971-2978.

Rubio, L. A., A. Pérez, R. Ruiz, M. A. Guzmán, I. Aranda-Olmedo and A. Clemente (2014). "Characterization of pea (*Pisum sativum*) seed protein fractions." Journal of the Science of Food and Agriculture **94**(2): 280-287.

Shai, Y. (2002). "Mode of action of membrane active antimicrobial peptides." Biopolymers - Peptide Science Section **66**(4): 236-248.

Sibel Akalin, A. (2014). "Dairy-derived antimicrobial peptides: Action mechanisms, pharmaceutical uses and production proposals." Trends in Food Science and Technology **36**(2): 79-95.

Sibel Akalin, A. (2014). "Dairy-derived antimicrobial peptides: Action mechanisms, pharmaceutical uses and production proposals." Trends in Food Science & Technology **36**(2): 79-95.

Smolenski, G., S. Haines, F. Y. S. Kwan, J. Bond, V. Farr, S. R. Davis, K. Stelwagen and T. T. Wheeler (2007). "Characterisation of Host Defence Proteins in Milk Using a Proteomic Approach." Journal of Proteome Research **6**(1): 207-215.

Stern, N. J., E. A. Svetoch, B. V. Eruslanov, Y. N. Kovalev, L. I. Volodina, V. V. Perelygin, E. V. Mitsevich, I. P. Mitsevich and V. P. Levchuk (2005). "Paenibacillus polymyxa purified bacteriocin to control *Campylobacter jejuni* in chickens." Journal of Food Protection **68**(7): 1450-1453.

Taherian, A. R., M. Mondor, J. Labranche, H. Drolet, D. Ippersiel and F. Lamarche (2011). "Comparative study of functional properties of commercial and membrane processed yellow pea protein isolates." Food Research International **44**(8): 2505-2514.

Teeters, M. A., T. W. Root and E. N. Lightfoot (2002). "Performance and scale-up of adsorptive membrane chromatography." Journal of Chromatography A **944**(1-2): 129-139.

Théolier, J., I. Fliss, J. Jean and R. Hammami (2014). "Antimicrobial Peptides of Dairy Proteins: From Fundamental to Applications." Food Reviews International **30**(2): 134-154.

Théolier, J., R. Hammami, P. Labelle, I. Fliss and J. Jean (2013). "Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate." Journal of Functional Foods **5**(2): 706-714.

Thomke, S. and K. Elwinger (1998). "Growth promotants in feeding pigs and poultry. III. Alternatives to antibiotic growth promotants." Ann. Zootech. **47**(4): 245-271.

Tiihonen, K., H. Kettunen, M. H. L. Bento, M. Saarinen, S. Lahtinen, A. C. Ouwehand, H. Schulze and N. Rautonen (2010). "The effect of feeding essential oils on broiler performance and gut microbiota." British Poultry Science **51**(3): 381-392.

Tomita, M., H. Wakabayashi, K. Yamauchi, S. Teraguchi and H. Hayasawa (2002). "Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: Production and applications." Biochemistry and Cell Biology **80**(1): 109-112.

Vanderghem, C., P. Bodson, S. Danthine, M. Paquot, C. Deroanne and C. Blecker (2010). "Milk fat globule membrane and buttermilks: From composition to valorization." La membrane du globule gras du lait et les babeurres: De leur composition à leur valorisation **14**(3): 485-500.

Waewdee, P., P. Sukon, P. Chaveerach, P. Surachon and C. Soikum (2012). "Effect of a single dose of *Lactobacillus salivarius* on prevention of *Salmonella enteritidis* infection in young broilers." Journal of Animal and Veterinary Advances **11**(7): 955-961.

Wittebole, X., S. De Roock and S. M. Opal (2014). "A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens." Virulence **5**(1): 209-218.

Wong, C. L., C. C. Sieo, W. S. Tan, N. Abdullah, M. Hair-Bejo, J. Abu and Y. W. Ho (2014). "Evaluation of a lytic bacteriophage,  $\Phi$  st1, for biocontrol of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in chickens." International Journal of Food Microbiology **172**: 92-101.

Yamauchi, K., M. Tomita, T. J. Giehl and R. T. Ellison (1993). "Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment." Infection and Immunity **61**(2): 719-728.

Yen, C. C., C. J. Shen, W. H. Hsu, Y. H. Chang, H. T. Lin, H. L. Chen and C. M. Chen (2011). "Lactoferrin: An iron-binding antimicrobial protein against *Escherichia coli* infection." BioMetals **24**(4): 585-594.

Zhao, S., S. Qaiyumi, S. Friedman, R. Singh, S. L. Foley, D. G. White, P. F. McDermott, T. Donkar, C. Bolin, S. Munro, E. J. Baron and R. D. Walker (2003). "Characterization of *Salmonella enterica* Serotype Newport Isolated from Humans and Food Animals." Journal of Clinical Microbiology **41**(12): 5366-5371.

## ANNEXE 1 : Production des peptides

**Tableau IV :** Pourcentage de rendement des différents types de peptides lors du fractionnement par colonnes échangeuses d'ions par rapport aux extraits peptidiques totaux.

	<b>Cationique-Mustang S (%)</b>	<b>Anionique-Mustang Q (%)</b>
<b>Babeurre</b>	6.3 ± 1.8 (n=5)	7.0 ± 3.5 (n=4)
<b>Lactoferrine</b>	15.4 ± 3.8 (n=2)	16.2 (n=1)
<b>Pois</b>	7.8 ± 0.2 (n=2)	15.8 (n=1)

## ANNEXE 2 : Résultats de la mesure de la cinétique d'hydrolyse par la pepsine pour les peptides de lactoferrine, babeurre et pois.

**Tableau V** : Cinétique d'hydrolyse (%) du babeurre par la pepsine, pour 6 productions différentes de peptides.

Temps (heures)	Production 2	Production 3	Production 4	Production 5	Production 6	Production 7	Moyenne
0	6.4	2.7	4.5	DM*	0.0	1.1	0.0
3	90.6	77.2	79.0	DM*	82.0	83.1	82.4
6	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

\*DM : Données manquantes

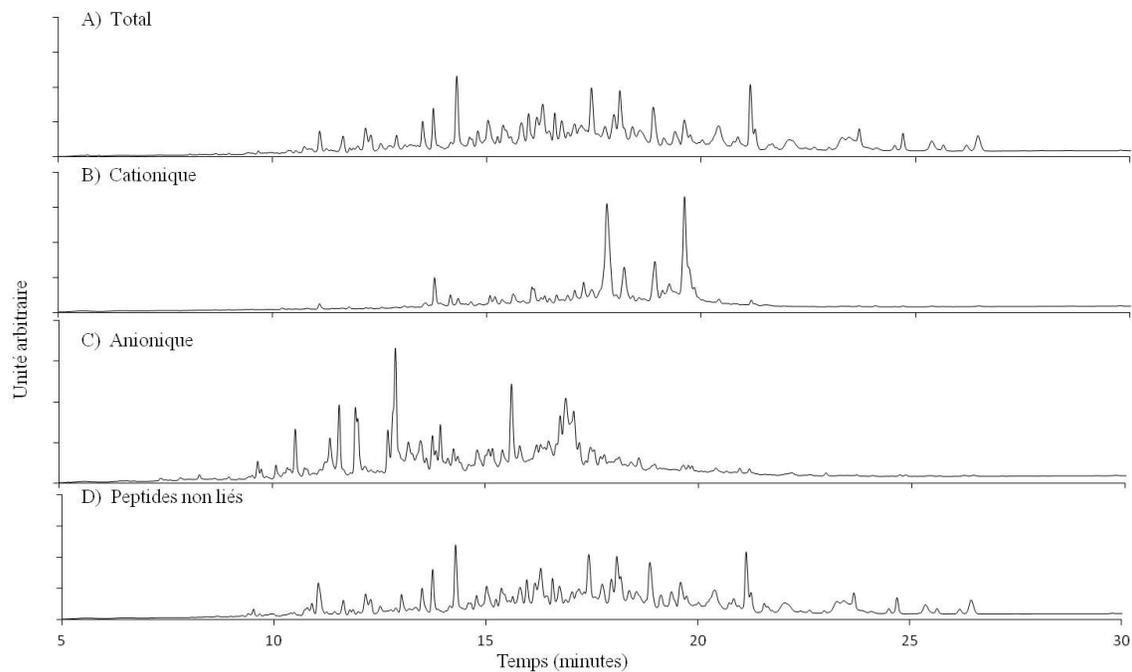
**Tableau VI**: Cinétique d'hydrolyse (%) pour la lactoferrine par la pepsine, sur 3 productions différentes.

Temps (heures)	Production 2	Production 3	Production 4	Moyenne
0	3.6	4.5	4.1	4.1
3	106.7	102.1	93.4	100.7
6	100.0	100.0	100.0	100.0

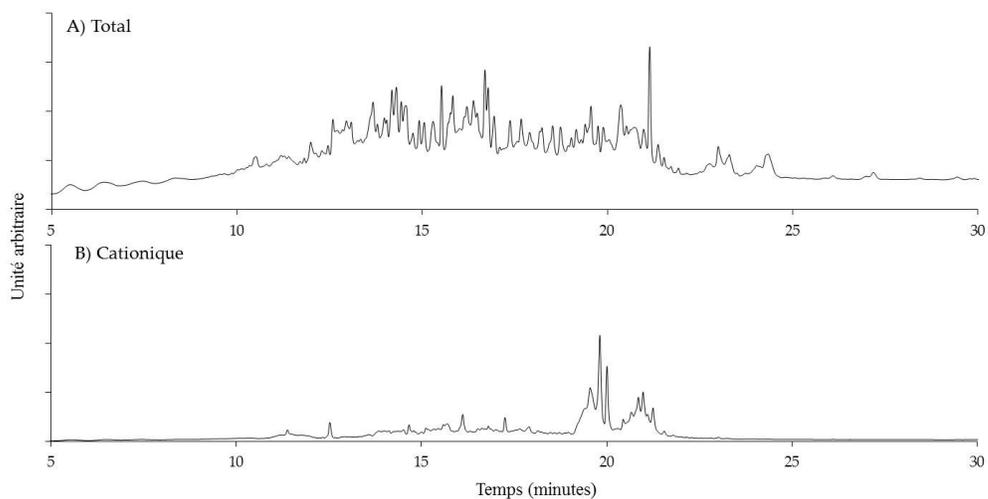
**Tableau VII** : Cinétique d'hydrolyse (%) du pois par la pepsine, pour 2 productions différentes.

<b>Temps (hres)</b>	<b>Production 3</b>	<b>Production 4</b>	<b>Moyenne</b>
0	7.0	6.8	6.9
3	81.1	95.4	88.2
6	100.0	100.0	100.0

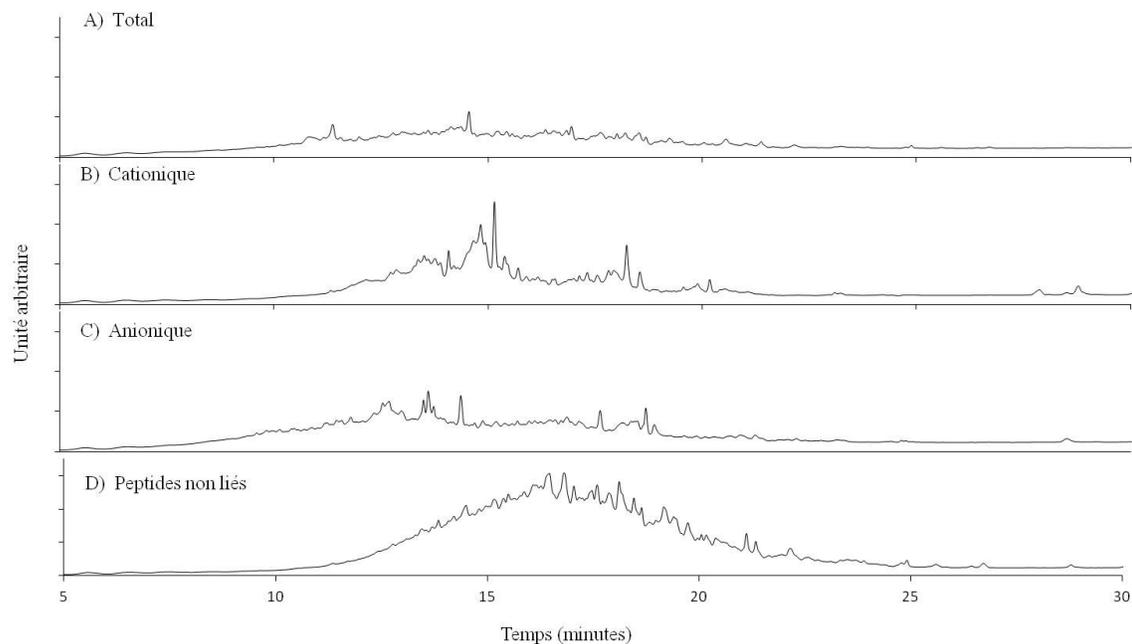
### ANNEXE 3 : Profils RP-HPLC des peptides de babeurre, lactoferrine et pois



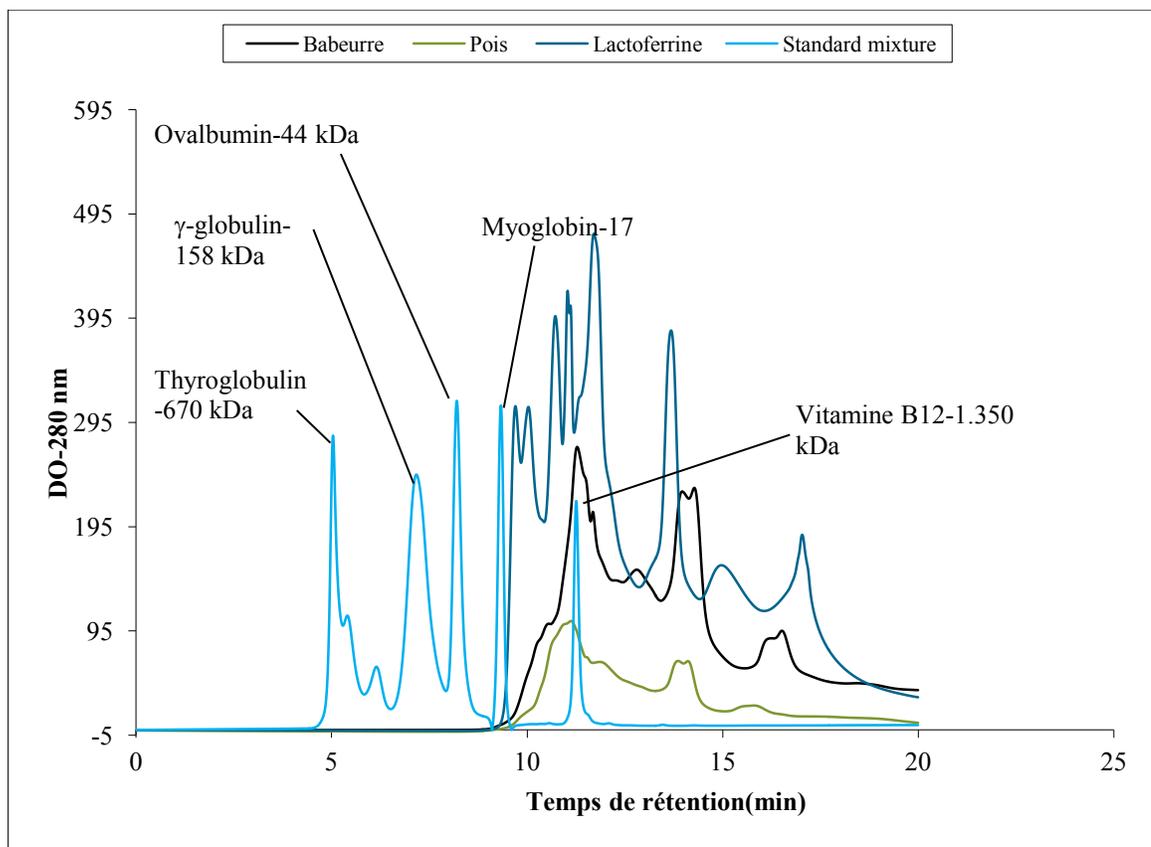
**Figure 5:** Profils chromatographiques au RP-HPLC (colonne C<sub>18</sub>) des échantillons de babeurre A) Total B) Cationique C) Anionique D) Peptides non liés.



**Figure 6 :** Profils chromatographiques au RP-HPLC (colonne C<sub>18</sub>) des échantillons de lactoferrine production 34. A) Total B) Cationique.



**Figure 7:** Profils chromatographiques au RP-HPLC (colonne C<sub>18</sub>) des échantillons de Pois. A) Total B) Cationique C) Anionique D) Peptides non liés.

**ANNEXE 4 : Chromatographie d'exclusion stérique (SEC-HPLC)**

**Figure 8:** SEC-HPLC des échantillons de babeurre, pois et lactoferrine.

## ANNEXE 5 : Effet des peptides antimicrobiens provenant du babeurre

**Tableau VIII** : Survie et perte bactériennes causées par les peptides totaux de babeurre, sur 5 souches de bactéries pathogènes aviaires.

Concentrations de peptides (mg/mL)	0	0.3	0.6	1.3	2.5	5
	<b><i>E.coli</i> O78:H80</b>					
Survie bactérienne (log UFC/mL)	5.73 ± 0.15 <sup>A</sup>	5.41 ± 0.15 <sup>AB</sup>	4.89 ± 0.15 <sup>BC</sup>	4.58 ± 0.15 <sup>BC</sup>	4.54 ± 0.15 <sup>C</sup>	3.76 ± 0.15 <sup>D</sup>
Perte bactérienne (log UFC/mL)	-	0.19 ± 0.17 <sup>A</sup>	0.71 ± 0.17 <sup>A</sup>	1.03 ± 0.17 <sup>B</sup>	1.07 ± 0.17 <sup>B</sup>	1.85 ± 0.17 <sup>BC</sup>
	<b><i>E.coli</i> Tk3 O1 :K1</b>					
Survie bactérienne (log UFC/mL)	5.83 ± 0.19 <sup>A</sup>	5.60 ± 0.19 <sup>A</sup>	5.38 ± 0.19 <sup>AB</sup>	5.31 ± 0.19 <sup>AB</sup>	5.09 ± 0.19 <sup>AB</sup>	4.57 ± 0.19 <sup>B</sup>
Perte bactérienne (log UFC/mL)	-	-0.01 ± 0.22 <sup>A</sup>	0.21 ± 0.22 <sup>AB</sup>	0.28 ± 0.22 <sup>AB</sup>	0.50 ± 0.22 <sup>AB</sup>	1.01 ± 0.22 <sup>B</sup>
	<b><i>Salmonella</i> Typhimurium</b>					
Survie bactérienne (log UFC/mL)	5.54 ± 0.17 <sup>A</sup>	5.27 ± 0.17 <sup>AB</sup>	5.16 ± 0.17 <sup>AB</sup>	4.95 ± 0.17 <sup>AB</sup>	4.90 ± 0.17 <sup>AB</sup>	4.69 ± 0.17 <sup>B</sup>
Perte bactérienne (log UFC/mL)	-	0.38 ± 0.18	0.49 ± 0.18	0.69 ± 0.18	0.75 ± 0.18	0.95 ± 0.18
	<b><i>Salmonella</i> Enteritidis</b>					
Survie bactérienne (log UFC/mL)	5.57 ± 0.16 <sup>A</sup>	5.17 ± 0.16 <sup>AB</sup>	4.94 ± 0.16 <sup>ABC</sup>	4.78 ± 0.16 <sup>ABC</sup>	4.56 ± 0.16 <sup>BC</sup>	4.34 ± 0.16 <sup>C</sup>
Perte bactérienne (log UFC/mL)	-	0.47 ± 0.18 <sup>A</sup>	0.70 ± 0.18 <sup>AB</sup>	0.86 ± 0.18 <sup>AB</sup>	1.08 ± 0.18 <sup>AB</sup>	1.30 ± 0.18 <sup>B</sup>
	<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>					
Survie bactérienne (log UFC/mL)	5.47 ± 0.16	5.53 ± 0.18	5.04 ± 0.18	5.31 ± 0.18	5.07 ± 0.18	4.91 ± 0.18
Perte bactérienne (log UFC/mL)	-	0.13 ± 0.20	0.62 ± 0.20	0.35 ± 0.20	0.59 ± 0.20	0.75 ± 0.20

\* : La perte est calculée à partir de données ajustées par la méthode de Benjamini-Hochberg (ne correspond pas aux données de survie bactérienne).

**Tableau IX** : Survie et perte bactériennes causées par les peptides cationiques de babeurre, sur 5 souches de bactéries pathogènes aviaires.

Concentrations de peptides (mg/mL)	0	0.3	0.6	1.3	2.5	5
	<b><i>E.coli</i> O78 :H80</b>					
Survie bactérienne (log UFC/mL)	5.60 ±0.18 <sup>A</sup>	4.52 ±0.18 <sup>B</sup>	3.96 ±0.18 <sup>BC</sup>	3.09 ±0.18 <sup>CD</sup>	3.35 ±0.18 <sup>CD</sup>	2.68 ±0.18 <sup>D</sup>
Perte bactérienne* (log UFC/mL)	-	1.13 ±0.20 <sup>A</sup>	1.69 ±0.20 <sup>AB</sup>	2.56 ±0.20 <sup>B</sup>	2.30 ±0.20 <sup>B</sup>	2.97 ±0.20 <sup>BC</sup>
	<b><i>E.coli</i> Tk3 O1 :K1</b>					
Survie bactérienne (log UFC/mL)	5.64 ±0.23 <sup>A</sup>	5.06 ±0.23 <sup>AB</sup>	4.72 ±0.23 <sup>ABC</sup>	4.50 ±0.23 <sup>BCD</sup>	4.05 ±0.23 <sup>CD</sup>	3.66 ±0.23 <sup>D</sup>
Perte bactérienne (log UFC/mL)	-	0.58 ±0.26 <sup>A</sup>	0.92 ±0.26 <sup>A</sup>	1.15 ±0.26 <sup>AB</sup>	1.60 ±0.26 <sup>AB</sup>	1.99 ±0.26 <sup>B</sup>
	<b><i>Salmonella</i> Typhimurium</b>					
Survie bactérienne (log UFC/mL)	5.63 ±0.20 <sup>A</sup>	4.90 ±0.20 <sup>AB</sup>	4.64 ±0.20 <sup>B</sup>	4.68 ±0.20 <sup>AB</sup>	4.33 ±0.20 <sup>B</sup>	3.92 ±0.20 <sup>B</sup>
Perte bactérienne (log UFC/mL)	-	0.72 ±0.22	0.98 ±0.22	0.94 ±0.22	1.29 ±0.22	1.70 ±0.22
	<b><i>Salmonella</i> Enteritidis</b>					
Survie bactérienne (log UFC/mL)	5.63 ±0.20 <sup>A</sup>	4.62 ±0.20 <sup>B</sup>	4.39 ±0.20 <sup>B</sup>	4.12 ±0.20 <sup>B</sup>	3.90 ±0.20 <sup>B</sup>	3.73 ±0.20 <sup>B</sup>
Perte bactérienne (log UFC/mL)	-	1.00 ±0.21	1.24 ±0.21	1.51 ±0.21	1.73 ±0.21	1.90 ±0.21
	<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>					
Survie bactérienne (log UFC/mL)	5.57 ±0.24 <sup>A</sup>	4.57 ±0.22 <sup>AB</sup>	4.27 ±0.22 <sup>B</sup>	4.53 ±0.22 <sup>AB</sup>	4.19 ±0.22 <sup>B</sup>	4.06 ±0.22 <sup>B</sup>
Perte bactérienne (log UFC/mL)	-	1.10 ±0.24	1.40 ±0.24	1.14 ±0.24	1.48 ±0.24	1.61 ±0.24

\* : La perte est calculée à partir de données ajustées par la méthode de Benjamini-Hochberg (ne correspond pas aux données de survie bactérienne).

**Tableau X:** Survie bactérienne causée par les peptides anioniques de babeurre, sur 5 souches de bactéries pathogènes aviaires.

Concentrations de peptides (mg/mL)	0	0.3	0.6	1.3	2.5	5
Survie bactérienne (log UFC/mL)	<b><i>E.coli</i> O78 :H80</b>					
	5.68 ±0.14	5.63 ±0.14	5.43 ±0.14	5.06 ±0.14	5.32 ±0.14	5.22 ±0.14
	<b><i>E.coli</i> Tk3 O1 :K1</b>					
	5.78 ± 0.19 <sup>A</sup>	5.44 ± 0.19 <sup>AB</sup>	5.16 ± 0.19 <sup>AB</sup>	4.87 ± 0.19 <sup>B</sup>	5.22 ± 0.19 <sup>AB</sup>	5.39 ± 0.19 <sup>AB</sup>
	<b><i>Salmonella</i> Typhimurium</b>					
	5.56 ±0.16	5.49 ±0.16	5.33 ±0.16	5.39 ±0.16	5.29 ±0.16	5.18 ±0.16
<b><i>Salmonella</i> Enteritidis</b>						
5.58 ± 0.16	5.30 ±0.16	5.24 ± 0.16	5.07 ± 0.1	5.13 ± 0.16	5.13± 0.16	
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>						
5.51 ±0.17	4.71 ±0.17	5.41 ±0.17	5.32 ±0.17	5.25 ±0.17	5.17 ±0.17	

**Tableau XI:** Survie bactérienne causée par les peptides non liés de babeurre, sur 5 souches de bactéries pathogènes aviaires.

Concentrations de peptides (mg/mL)	0	0.3	0.6	1.3	2.5	5
Survie bactérienne (log UFC/mL)	<b><i>E.coli</i> O78 :H80</b>					
	5.83 ± 0.09 <sup>A</sup>	5.78 ± 0.09 <sup>AB</sup>	5.47 ± 0.09 <sup>ABC</sup>	5.42 ± 0.09 <sup>ABC</sup>	5.37 ± 0.09 <sup>BC</sup>	5.32 ± 0.09 <sup>C</sup>
	<b><i>E.coli</i> Tk3 O1 :K1</b>					
	5.89 ± 0.11 <sup>A</sup>	5.88 ± 0.11 <sup>A</sup>	5.82 ± 0.11 <sup>A</sup>	5.71 ± 0.11 <sup>AB</sup>	5.49 ± 0.11 <sup>AB</sup>	5.26 ± 0.11 <sup>B</sup>
	<b><i>Salmonella</i> Typhimurium</b>					
	5.37 ± 0.10	5.29 ± 0.10	5.30 ± 0.10	5.25 ± 0.10	5.15 ± 0.10	5.55 ± 0.10
<b><i>Salmonella</i> Enteritidis</b>						
5.55 ± 0.10	5.43 ± 0.10	5.38 ± 0.10	5.21 ± 0.10	5.09 ± 0.10	5.09 ± 0.10	
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>						
5.43 ± 0.11	5.33 ± 0.11	5.33 ± 0.11	5.25 ± 0.11	5.25 ± 0.11	5.16 ± 0.11	

## ANNEXE 6 : Effet des peptides antimicrobiens provenant de la lactoferricine

**Tableau XII** : Survie et perte bactériennes causées par la lactoferricine commerciale, sur 5 souches de bactéries pathogènes aviaires.

Concentrations de peptides (mg/mL)	0	0.003	0.006	0.01	0.025	0.05
	<i>E.coli</i> O78 :H80					
Survie bactérienne (log UFC/mL)	5.77 ±0.25 <sup>A</sup>	5.18 ±0.25 <sup>A</sup>	5.25 ±0.25 <sup>A</sup>	5.58 ±0.25 <sup>A</sup>	2.98 ±0.25 <sup>B</sup>	0.65 ±0.25 <sup>C</sup>
Perte bactérienne* (log UFC/mL)	-	0.51 ±0.27 <sup>A</sup>	0.45 ±0.27 <sup>A</sup>	0.11 ±0.27 <sup>A</sup>	2.71 ±0.27 <sup>B</sup>	5.04 ±0.27 <sup>BC</sup>
	<i>E.coli</i> Tk3 O1 :K1					
Survie bactérienne (log UFC/mL)	5.92 ±0.33 <sup>A</sup>	6.00 ±0.33 <sup>A</sup>	5.71 ±0.33 <sup>A</sup>	4.60 ±0.33 <sup>A</sup>	2.95 ±0.33 <sup>B</sup>	0.15 ±0.33 <sup>C</sup>
Perte bactérienne (log UFC/mL)	-	-0.33 ±0.36 <sup>A</sup>	-0.04 ±0.36 <sup>A</sup>	1.06 ±0.36 <sup>A</sup>	2.72 ±0.36 <sup>B</sup>	5.52 ±0.36 <sup>BC</sup>
	<i>Salmonella</i> Typhimurium					
Survie bactérienne (log UFC/mL)	5.63 ±0.32 <sup>A</sup>	5.55 ±0.32 <sup>A</sup>	5.47 ±0.32 <sup>A</sup>	5.47 ±0.32 <sup>A</sup>	2.99 ±0.32 <sup>B</sup>	0.38 ±0.32 <sup>C</sup>
Perte bactérienne (log UFC/mL)	-	0.17 ±0.36 <sup>A</sup>	0.25 ±0.36 <sup>A</sup>	0.25 ±0.36 <sup>A</sup>	2.73 ±0.36 <sup>B</sup>	5.35 ±0.36 <sup>BC</sup>
	<i>Salmonella</i> Enteritidis					
Survie bactérienne (log UFC/mL)	5.65 ±0.27 <sup>A</sup>	5.46 ±0.27 <sup>AB</sup>	5.39 ±0.27 <sup>AB</sup>	5.16 ±0.27 <sup>AB</sup>	4.22 ±0.27 <sup>B</sup>	1.85 ±0.27 <sup>C</sup>
Perte bactérienne (log UFC/mL)	-	0.26 ±0.30 <sup>A</sup>	0.33 ±0.30 <sup>AB</sup>	0.55 ±0.30 <sup>AB</sup>	1.50 ±0.30 <sup>B</sup>	3.87 ±0.30 <sup>C</sup>
	<i>Staphylococcus aureus</i>					
Survie bactérienne (log UFC/mL)	5.54 ±0.33 <sup>A</sup>	5.36 ±0.33 <sup>A</sup>	5.16 ±0.33 <sup>A</sup>	4.98 ±0.33 <sup>A</sup>	4.26 ±0.33 <sup>A</sup>	1.13 ±0.33 <sup>B</sup>
Perte bactérienne (log UFC/mL)	-	0.38 ±0.36 <sup>A</sup>	0.58 ±0.36 <sup>A</sup>	0.76 ±0.36 <sup>A</sup>	1.49 ±0.36 <sup>A</sup>	4.61 ±0.36 <sup>B</sup>

\* : La perte est calculée à partir de données ajustées par la méthode de Benjamini-Hochberg (ne correspond pas aux données de survie bactérienne).

## ANNEXE 7 : Effet antimicrobien des peptides provenant du pois

**Tableau XIII:** Effet des peptides de pois, production 34, sur *E. coli* O78 :H80 (n=2)

Concentrations de peptides (mg/mL)	0	0.3	0.6	1.3	2.5	5
	Population moyenne (Log UFC/mL)					
<b>Total</b>	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
<b>Cationique</b>	4.4	4.2	4.2	4.2	4.5	4.5
<b>Anionique</b>	4.5	4.4	4.2	4.2	4.4	4.4
<b>Peptides non liés</b>	4.5	4.4	4.2	4.2	4.2	4.4

**Tableau XIV :** Effet des peptides de pois, production 34, sur *Salmonella* Enteritidis (n=1)

Concentration de peptides (mg/mL)	0	0.3	0.6	1.3	2.5	5
	Population moyenne (Log UFC/mL)					
<b>Total</b>	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4
<b>Cationique</b>	5.4	5.0	4.7	4.7	4.5	4.3
<b>Peptides non liés</b>	5.4	5.4	5.2	5.2	5.2	5.2
<b>Anionique</b>	5.4	5.2	5.2	5.2	5.0	4.3

## ANNEXE 8 : Effet antimicrobien des peptides provenant de la lactoferrine

**Tableau XV** : Survie et perte bactériennes causées par les peptides totaux de lactoferrine, sur 5 souches de bactéries pathogènes aviaires.

Concentration de peptides (mg/mL)	0	0.3	0.6	1.3	2.5	5
	<b><i>E.coli</i> O78 :H80</b>					
Survie bactérienne (log UFC/mL)	6.16 ±0.88 <sup>A</sup>	5.81 ±0.88 <sup>A</sup>	2.42 ±0.88 <sup>B</sup>	0.20 ±0.88 <sup>BC</sup>	0.00 ±0.88 <sup>C</sup>	0.00 ±0.88 <sup>C</sup>
Perte bactérienne* (log UFC/mL)	-	0.20 ±1.02 <sup>A</sup>	3.59 ±1.02 <sup>B</sup>	5.80 ±1.02 <sup>B</sup>	6.61 ±1.02 <sup>BC</sup>	6.61 ±1.02 <sup>BC</sup>
	<b><i>E.coli</i> Tk3 O1 :K1</b>					
Survie bactérienne (log UFC/mL)	6.12 ±0.68 <sup>A</sup>	4.94 ±0.68 <sup>AB</sup>	4.25 ±0.68 <sup>AB</sup>	3.10 ±0.68 <sup>BC</sup>	2.26 ±0.68 <sup>BC</sup>	2.19 ±0.68 <sup>C</sup>
Perte bactérienne (log UFC/mL)	-	1.08 ±0.78	1.77 ±0.78	2.92 ±0.78	3.75 ±0.78	3.83 ±0.78
	<b><i>Salmonella</i> Typhimurium</b>					
Survie bactérienne (log UFC/mL)	5.96 ±0.66	5.54 ±0.66	4.68 ±0.66	4.12 ±0.66	3.68 ±0.66	3.46 ±0.66
Perte bactérienne (log UFC/mL)	-	0.50 ±0.76	1.37 ±0.76	1.93 ±0.76	2.36 ±0.76	2.55 ±0.76
	<b><i>Salmonella</i> Enteritidis</b>					
Survie bactérienne (log UFC/mL)	6.03 ±0.51 <sup>A</sup>	5.79 ±0.51 <sup>A</sup>	4.52 ±0.51 <sup>AB</sup>	3.01 ±0.51 <sup>B</sup>	1.96 ±0.51 <sup>BC</sup>	0.18 ±0.51 <sup>C</sup>
Perte bactérienne (log UFC/mL)	-	0.24 ±0.56 <sup>A</sup>	1.51 ±0.56 <sup>A</sup>	3.02 ±0.56 <sup>A</sup>	4.07 ±0.56 <sup>B</sup>	5.86 ±0.56 <sup>B</sup>
	<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>					
Survie bactérienne (log UFC/mL)	5.90 ±0.90 <sup>A</sup>	5.43 ±0.90 <sup>AB</sup>	4.59 ±0.90 <sup>AB</sup>	2.88 ±0.90 <sup>BC</sup>	1.43 ±0.90 <sup>C</sup>	0.82 ±0.90 <sup>C</sup>
Perte bactérienne (log UFC/mL)	-	0.63 ±1.06 <sup>A</sup>	1.47 ±1.06 <sup>A</sup>	3.19 ±1.06 <sup>AB</sup>	4.63 ±1.06 <sup>B</sup>	5.25 ±1.06 <sup>B</sup>

\* : La perte est calculée à partir de données ajustées par la méthode de Benjamini-Hochberg (ne correspond pas aux données de survie bactérienne).

**Tableau XVI** : Survie et perte bactériennes causées par les peptides cationiques de lactoferrine, sur 5 souches de bactéries pathogènes aviaires.

Concentrations de peptides (mg/mL)	0	0.3	0.6	1.3	2.5	5
	<b><i>E.coli</i> O78 :H80</b>					
Survie bactérienne (log UFC/mL)	6.07 ±0.73 <sup>A</sup>	1.43 ±0.73 <sup>B</sup>	0.07 ±0.73 <sup>B</sup>	0.00 ±0.73 <sup>B</sup>	0.00 ±0.73 <sup>B</sup>	0.00 ±0.73 <sup>B</sup>
Perte bactérienne* (log UFC/mL)	-	4.63 ±0.84	5.99 ±0.84	6.63 ±0.84	6.69 ±0.84	6.69 ±0.84
	<b><i>E.coli</i> Tk3 O1 :K1</b>					
Survie bactérienne (log UFC/mL)	6.07 ±0.66 <sup>A</sup>	3.74 ±0.66 <sup>AB</sup>	2.44 ±0.66 <sup>BC</sup>	1.22±0.66 <sup>BCD</sup>	0.59 ±0.66 <sup>CD</sup>	0.00 ±0.66 <sup>D</sup>
Perte bactérienne (log UFC/mL)	-	2.32 ±0.75 <sup>A</sup>	3.62 ±0.75 <sup>A</sup>	4.84 ±0.75 <sup>A</sup>	5.47 ±0.75 <sup>B</sup>	6.49 ±0.75 <sup>B</sup>
	<b><i>Salmonella</i> Typhimurium</b>					
Survie bactérienne (log UFC/mL)	6.05 ±0.67 <sup>A</sup>	4.45 ±0.67 <sup>AB</sup>	4.04 ±0.67 <sup>AB</sup>	3.52 ±0.67 <sup>AB</sup>	3.14 ±0.67 <sup>B</sup>	2.88 ±0.67 <sup>B</sup>
Perte bactérienne (log UFC/mL)	-	1.61 ±0.77	2.02 ±0.77	2.55 ±0.77	2.93 ±0.77	3.19 ±0.77
	<b><i>Salmonella</i> Enteritidis</b>					
Survie bactérienne (log UFC/mL)	6.06 ±0.54 <sup>A</sup>	4.17 ±0.54 <sup>AB</sup>	3.19 ±0.54 <sup>B</sup>	1.91 ±0.54 <sup>BC</sup>	0.30 ±0.54 <sup>C</sup>	0.03 ±0.54 <sup>C</sup>
Perte bactérienne (log UFC/mL)	-	1.90 ±0.59 <sup>A</sup>	2.87 ±0.59 <sup>A</sup>	4.15 ±0.59 <sup>AB</sup>	5.76 ±0.59 <sup>B</sup>	6.03 ±0.59 <sup>B</sup>
	<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>					
Survie bactérienne (log UFC/mL)	6.05 ±0.88 <sup>A</sup>	4.08 ±0.88 <sup>AB</sup>	1.89 ±0.88 <sup>BC</sup>	1.38 ±0.88 <sup>BC</sup>	0.78 ±0.88 <sup>C</sup>	0.78 ±0.88 <sup>C</sup>
Perte bactérienne (log UFC/mL)	-	1.99 ±1.02 <sup>A</sup>	4.18 ±1.02 <sup>A</sup>	4.68 ±1.02 <sup>A</sup>	5.28 ±1.02 <sup>B</sup>	5.28 ±1.02 <sup>B</sup>

\* : La perte est calculée à partir de données ajustées par la méthode de Benjamini-Hochberg (ne correspond pas aux données de survie bactérienne)

**ANNEXE 9 : Analyses statistiques**

**Tableau XVII :** Valeurs de P provenant des ANOVA ajustées avec la méthode de Benjamini-Hochberg pour les extraits peptidiques de la lactoferrine.

	[mg/mL]	Total						Cationique					
		0	0,3	0,6	1,3	2,5	5	0	0,3	0,6	1,3	2,5	5
<i>Escherichia coli</i> O78:H80	0	.	0,6265	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	.	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	0,3	0,6265	.	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	.	0,0438	0,0036	0,0028	0,0028
	0,6	<0,0001	<0,0001	.	0,0034	0,0001	0,0001	<0,0001	0,0438	.	0,3391	0,2978	0,2978
	1,3	<0,0001	<0,0001	0,0034	.	0,2704	0,2704	<0,0001	0,0036	0,3391	.	0,9313	0,9313
	2,5	<0,0001	<0,0001	0,0001	0,2704	.	1	<0,0001	0,0028	0,2978	0,9313	.	1
	5	<0,0001	<0,0001	0,0001	0,2704	1	.	<0,0001	0,0028	0,2978	0,9313	1	.
<i>Escherichia coli</i> Tk3 O1:K1	0	.	0,11	0,0126	0,0001	<0,0001	<0,0001	.	0,0034	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	0,3	0,11	.	0,3449	0,014	0,0005	0,0003	0,0034	.	0,0941	0,0016	0,0001	<0,0001
	0,6	0,0126	0,3449	.	0,1192	0,0082	0,0061	<0,0001	0,0941	.	0,115	0,0184	0,0004
	1,3	0,0001	0,014	0,1192	.	0,2523	0,2115	<0,0001	0,0016	0,115	.	0,4146	0,0348
	2,5	<0,0001	0,0005	0,0082	0,2523	.	0,9153	<0,0001	0,0001	0,0184	0,4146	.	0,1868
	5	<0,0001	0,0003	0,0061	0,2115	0,9153	.	<0,0001	<0,0001	0,0004	0,0348	0,1868	.
<i>Salmonella</i> Typhimurium	0	.	0,5719	0,0836	0,0138	0,0027	0,0012	.	0,0405	0,0106	0,0015	0,0003	<0,0001
	0,3	0,5719	.	0,2382	0,0537	0,0129	0,0064	0,0405	.	0,5893	0,2256	0,0904	0,0431
	0,6	0,0836	0,2382	.	0,44	0,1749	0,1073	0,0106	0,5893	.	0,4985	0,2438	0,1332
	1,3	0,0138	0,0537	0,44	.	0,5536	0,3945	0,0015	0,2256	0,4985	.	0,6218	0,404
	2,5	0,0027	0,0129	0,1749	0,5536	.	0,7942	0,0003	0,0904	0,2438	0,6218	.	0,7317
	5	0,0012	0,0064	0,1073	0,3945	0,7942	.	<0,0001	0,0431	0,1332	0,404	0,7317	.
<i>Salmonella</i> Enteritidis	0	.	0,7413	0,0412	0,0001	<0,0001	<0,0001	.	0,0159	0,0004	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	0,3	0,7413	.	0,0844	0,0003	<0,0001	<0,0001	0,0159	.	0,2069	0,0045	<0,0001	<0,0001
	0,6	0,0412	0,0844	.	0,0423	0,0008	<0,0001	0,0004	0,2069	.	0,0998	0,0003	0,0001
	1,3	0,0001	0,0003	0,0423	.	0,152	0,0002	<0,0001	0,0045	0,0998	.	0,039	0,0165
	2,5	<0,0001	<0,0001	0,0008	0,152	.	0,0169	<0,0001	<0,0001	0,0003	0,039	.	0,7232
	5	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0002	0,0169	.	<0,0001	<0,0001	0,0001	0,0165	0,7232	.
<i>Saphylococcus aureus</i>	0	.	0,5222	0,0772	0,0001	<0,0001	<0,0001	.	0,0122	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	0,3	0,5222	.	0,2528	0,0008	<0,0001	<0,0001	0,0122	.	0,0057	0,0008	<0,0001	<0,0001
	0,6	0,0772	0,2528	.	0,0212	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0057	.	0,5131	0,1537	0,1537
	1,3	0,0001	0,0008	0,0212	.	0,051	0,0062	<0,0001	0,0008	0,5131	.	0,4348	0,4348
	2,5	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,051	.	0,4001	<0,0001	<0,0001	0,1537	0,4348	.	1
	5	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0062	0,4001	.	<0,0001	<0,0001	0,1537	0,4348	1	.

**Tableau XVIII** : Valeurs de P provenant des ANOVA ajustées avec la méthode de Benjamini-Hochberg pour les extraits peptidiques de la lactoferricine.

	[mg/mL]	0	0,003	0,006	0,01	0,025	0,05
<i>Escherichia coli</i> O78:H80	0	.	0,093	0,1329	0,585	<0,0001	<0,0001
	0,003	0,093	.	0,8584	0,2555	<0,0001	<0,0001
	0,006	0,1329	0,8584	.	0,3374	<0,0001	<0,0001
	0,01	0,585	0,2555	0,3374	.	<0,0001	<0,0001
	0,025	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	.	<0,0001
	0,05	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	.
<i>Escherichia coli</i> Tk3 O1:K1	0	.	0,093	0,1329	0,585	<0,0001	<0,0001
	0,003	0,093	.	0,8584	0,2555	<0,0001	<0,0001
	0,006	0,1329	0,8584	.	0,3374	<0,0001	<0,0001
	0,01	0,585	0,2555	0,3374	.	<0,0001	<0,0001
	0,025	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	.	<0,0001
	0,05	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	.
<i>Salmonella</i> Typhimurium	0	.	0,8721	0,7326	0,7326	<0,0001	<0,0001
	0,003	0,8721	.	0,8566	0,8566	<0,0001	<0,0001
	0,006	0,7326	0,8566	.	1	<0,0001	<0,0001
	0,01	0,7326	0,8566	1	.	<0,0001	<0,0001
	0,025	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	.	<0,0001
	0,05	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	.
<i>Salmonella</i> Enteritidis	0	.	0,6122	0,492	0,204	0,0002	<0,0001
	0,003	0,6122	.	0,8569	0,4443	0,0014	<0,0001
	0,006	0,492	0,8569	.	0,5587	0,0026	<0,0001
	0,01	0,204	0,4443	0,5587	.	0,0144	<0,0001
	0,025	0,0002	0,0014	0,0026	0,0144	.	<0,0001
	0,05	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	.
<i>Saphylococcus aureus</i>	0	.	0,6867	0,4043	0,2217	0,0053	<0,0001
	0,003	0,6867	.	0,6665	0,4123	0,0168	<0,0001
	0,006	0,4043	0,6665	.	0,697	0,0492	<0,0001
	0,01	0,2217	0,4123	0,697	.	0,1138	<0,0001
	0,025	0,0053	0,0168	0,0492	0,1138	.	<0,0001
	0,05	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	.

**Tableau XIX :** Valeurs de P provenant des ANOVA ajustées avec la méthode de Benjamini-Hochberg pour les extraits peptidiques du babeurre.

	[mg/mL]	Total						Cationique					
		0	0,3	0,6	1,3	2,5	5	0	0,3	0,6	1,3	2,5	5
<i>Escherichia coli</i> O78:H80	0	.	0,1244	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	.	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0001
	0,3	0,1244	.	0,0111	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	.	0,0234	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	0,6	<0,0001	0,0111	.	0,1201	0,0774	<0,0001	<0,0001	0,0234	.	0,0005	0,0128	<0,0001
	1,3	<0,0001	<0,0001	0,1201	.	0,8284	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0005	.	0,2884	0,0954
	2,5	<0,0001	<0,0001	0,0774	0,8284	.	0,0002	<0,0001	<0,0001	0,0128	0,2884	.	0,0071
	5	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0002	.	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0954	0,0071	.
<i>Escherichia coli</i> Tk3 O1:K1	0	.	0,2971	0,044	0,0215	0,0013	<0,0001	.	0,0354	0,0011	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	0,3	0,2971	.	0,3234	0,2002	0,0254	<0,0001	0,0354	.	0,2164	0,0408	0,0003	<0,0001
	0,6	0,044	0,3234	.	0,7668	0,2043	0,0005	0,0011	0,2164	.	0,409	0,0144	0,0002
	1,3	0,0215	0,2002	0,7668	.	0,3292	0,0015	<0,0001	0,0408	0,409	.	0,0996	0,0025
	2,5	0,0013	0,0254	0,2043	0,3292	.	0,0237	<0,0001	0,0003	0,0144	0,0996	.	0,1516
	5	<0,0001	<0,0001	0,0005	0,0015	0,0237	.	<0,0001	<0,0001	0,0002	0,0025	0,1516	.
<i>Salmonella</i> Typhimurium	0	.	0,2336	0,0961	0,0107	0,0054	0,0003	.	0,0087	0,0004	0,0008	<0,0001	<0,0001
	0,3	0,2336	.	0,6311	0,1636	0,1024	0,0117	0,0087	.	0,3393	0,4234	0,0393	0,0005
	0,6	0,0961	0,6311	.	0,3587	0,2459	0,0393	0,0004	0,3393	.	0,8761	0,2615	0,0093
	1,3	0,0107	0,1636	0,3587	.	0,8067	0,2459	0,0008	0,4234	0,8761	.	0,2016	0,006
	2,5	0,0054	0,1024	0,2459	0,8067	.	0,3587	<0,0001	0,0393	0,2615	0,2016	.	0,1305
	5	0,0003	0,0117	0,0393	0,2459	0,3587	.	<0,0001	0,0005	0,0093	0,006	0,1305	.
<i>Salmonella</i> Enteritidis	0	.	0,0786	0,0066	0,0007	0,0001	0,0001	.	0,0004	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0001
	0,3	0,0786	.	0,3191	0,0873	0,0078	0,0004	0,0004	.	0,3875	0,0655	0,0087	0,0013
	0,6	0,0066	0,3191	.	0,4694	0,0894	0,0081	<0,0001	0,3875	.	0,3219	0,073	0,0166
	1,3	0,0007	0,0873	0,4694	.	0,3248	0,51	<0,0001	0,0655	0,3219	.	0,4159	0,1519
	2,5	0,0001	0,0078	0,0894	0,3248	.	0,3264	<0,0001	0,0087	0,073	0,4159	.	0,5319
	5	0,0001	0,0004	0,0081	0,51	0,3264	.	<0,0001	0,0013	0,0166	0,1519	0,5319	.
<i>Saphylococcus aureus</i>	0	.	0,7753	0,0479	0,4541	0,062	0,0104	.	0,001	<0,0001	0,0006	<0,0001	<0,0001
	0,3	0,7753	.	0,0322	0,3269	0,0417	0,0071	0,001	.	0,2744	0,8719	0,1696	0,0638
	0,6	0,0479	0,0322	.	0,2375	0,913	0,5641	<0,0001	0,2744	.	0,3508	0,7766	0,4397
	1,3	0,4541	0,3269	0,2375	.	0,2832	0,0804	0,0006	0,8719	0,3508	.	0,2247	0,0899
	2,5	0,062	0,0417	0,913	0,2832	.	0,493	<0,0001	0,1696	0,7766	0,2247	.	.
	5	0,0104	0,0071	0,5641	0,0804	0,493	.	<0,0001	0,0638	0,4397	0,0899	0,6242	0,6242

**Tableau XIX** : Valeurs de P provenant des ANOVA ajustées avec la méthode de Benjamini-Hochberg pour les extraits peptidiques du babeurre (suite)

	[mg/mL]	Anionique						Non lié					
		0	0,3	0,6	1,3	2,5	5	0	0,3	0,6	1,3	2,5	5
<i>Escherichia coli</i> O78:H80	0	.	0,7948	0,1905	0,0019	0,0664	0,0182	.	0,616	0,0023	0,0006	0,0001	<0,0001
	0,3	0,7948	.	0,2929	0,0042	0,1137	0,0347	0,616	.	0,0098	0,0029	0,0007	0,0002
	0,6	0,1905	0,2929	.	0,0638	0,5912	0,2805	0,0023	0,0098	.	0,6738	0,3939	0,2042
	1,3	0,0019	0,0042	0,0638	.	0,1846	0,4315	0,0006	0,0029	0,6738	.	0,6651	0,3939
	2,5	0,0664	0,1137	0,5912	0,1846	.	0,5861	0,0001	0,0007	0,3939	0,6651	.	0,6738
	5	0,0182	0,0347	0,2805	0,4315	0,5861	.	<0,0001	0,0002	0,2042	0,3939	0,6738	.
<i>Escherichia coli</i> Tk3 O1:K1	0	.	0,1138	0,0048	<0,0001	0,0102	0,0703	.	0,9523	0,6189	0,1867	0,0031	<0,0001
	0,3	0,1138	.	0,1982	0,0102	0,3074	0,8152	0,9523	.	0,6616	0,2072	0,0037	<0,0001
	0,6	0,0048	0,1982	.	0,1885	0,7881	0,2912	0,6189	0,6616	.	0,4082	0,0127	<0,0001
	1,3	<0,0001	0,0102	0,1885	.	0,1142	0,019	0,1867	0,2072	0,4082	.	0,0907	0,0009
	2,5	0,0102	0,3074	0,7881	0,1142	.	0,4305	0,0031	0,0037	0,0127	0,0907	.	0,0889
	5	0,0703	0,8152	0,2912	0,019	0,4305	.	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0009	0,0889	.
<i>Salmonella</i> Typhimurium	0	.	0,7395	0,2993	0,4324	0,2156	0,0838	.	0,2658	0,0876	0,1063	0,0451	0,0067
	0,3	0,7395	.	0,4794	0,6502	0,3656	0,1606	0,2658	.	0,5457	0,6105	0,3643	0,1017
	0,6	0,2993	0,4794	.	0,7992	0,8395	0,4831	0,0876	0,5457	.	0,9242	0,761	0,2981
	1,3	0,4324	0,6502	0,7992	.	0,6478	0,3399	0,1063	0,6105	0,9242	.	0,6897	0,2565
	2,5	0,2156	0,3656	0,8395	0,6478	.	0,6176	0,0451	0,3643	0,761	0,6897	.	0,4604
	5	0,0838	0,1606	0,4831	0,3399	0,6176	.	0,0067	0,1017	0,2981	0,2565	0,4604	.
<i>Salmonella</i> Enteritidis	0	.	0,1906	0,1162	0,02	0,0395	0,0395	.	0,3614	0,1841	0,0111	0,0008	0,0008
	0,3	0,1906	.	0,7898	0,2976	0,4437	0,4437	0,3614	.	0,6748	0,0974	0,0128	0,0128
	0,6	0,1162	0,7898	.	0,4373	0,6169	0,6169	0,1841	0,6748	.	0,2132	0,0368	0,0368
	1,3	0,02	0,2976	0,4373	.	0,7815	0,7815	0,0111	0,0974	0,2132	.	0,3895	0,3895
	2,5	0,0395	0,4437	0,6169	0,7815	.	1	0,0008	0,0128	0,0368	0,3895	.	1
	5	0,0395	0,4437	0,6169	0,7815	1	.	0,0008	0,0128	0,0368	0,3895	1	.
<i>Saphylococcus aureus</i>	0	.	0,0004	0,6636	0,4013	0,2522	0,1224	.	0,4789	0,4789	0,1729	0,1729	0,0446
	0,3	0,0004	.	0,0016	0,0054	0,0128	0,0357	0,4789	.	1	0,5093	0,5093	0,1884
	0,6	0,6636	0,0016	.	0,6852	0,4759	0,2645	0,4789	1	.	0,5093	0,5093	0,1884
	1,3	0,4013	0,0054	0,6852	.	0,7579	0,4759	0,1729	0,5093	0,5093	.	1	0,5093
	2,5	0,2522	0,0128	0,4759	0,7579	.	0,6852	0,1729	0,5093	0,5093	1	.	0,5093
	5	0,1224	0,0357	0,2645	0,4759	0,6852	.	0,0446	0,1884	0,1884	0,5093	0,5093	.

